

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**İNFERTİL ENDOMETRİOZİS OLGULARIN KLOTHO
SEVİYELERİ VE KÜMÜLÜS HÜCRELERİNDEKİ DNA
HASARLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA BÜŞRA DURDU

TEZ DANIŞMANI
Dr.Öğr. Üyesi SELMA YAZAR

İSTANBUL, 2023

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**İNFERTİL ENDOMETRİOZİS OLGULARIN KLOTHO
SEVİYELERİ VE KÜMÜLÜS HÜCRELERİNDEKİ DNA
HASARLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA BÜŞRA DURDU

TEZ DANIŞMANI
Dr.Öğr. Üyesi SELMA YAZAR

İSTANBUL,2023

DESTEKLEYEN KURUM VE KURULUŞLAR

Bu tez projesi İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: İYYÜ BAP-AP- 2022-14



ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tezde;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

11 /10 / 2023

Esra Büşra DURDU

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımı destekleyen İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine; bilgi, deneyim ve önerileri ile bana yol gösteren değerli hocam ve danışmanım Dr. Öğr.Üyesi Selma Yazar'a ve tez çalışmamın laboratuvar aşamalarını gerçekleştirme imkanı tanıyandeğerli hocam Op. Dr. Erbil Yağmur'a ve Pınar Horozal'a, istatistiksel analiz uygulamalarını bana titizlikle öğreten ve yardımlarını esirgemeyen Burçin Şeyda Zorlu'ya, tüm hayatım boyunca her koşulda beni destekleyen sevgili babam Atilla Durdu'ya, annem Türkan Durdu'ya tez çalışmamda destek oldukları için teşekkürü borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

DESTEKLEYEN KURUM VE KURULUŞLAR	V
ETİK BEYAN	V
ÖNSÖZ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
ÖZET	11
ABSTRACT	13
EVALUATION OF KLOTHO LEVELS AND DNA DAMAGES IN CUMULUS CELLS OF INFERTILE ENDOMETRIOSIS CASES	13
1.GİRİŞ	15
2.GENEL BİLGİLER.....	17
2.1 İnfertilite.....	17
2.2 Endometriozis	18
2.3 Oosit Kalitesi.....	19
2.4 Oksidatif Stres	20
2.5 KümüLüs Hücreleri ve DNA Hasarı.....	22
2.6 Klotho.....	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1.Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları ve Özellikleri	25
3.2 Örneklerin Toplanması	25
3.2.1 Serum örnekleri	26
3.2.2 KümüLüs hücreleri	26
3.3 Kimyasal Maddeler	26
3.4 Kullanılan Alet ve Cihazlar	27
3.5 Kullanılan Sarf Malzemeler	27

3.6.Çalışmada Kullanılan Yöntemler	28
3.6.1. Comet Assay Yöntemi	28
3.6.2.Serumda Klotho Analizi	30
3.6.3.İstatistiksel Analizler	30
4.BULGULAR.....	31
4.1 Demografik Sonuçlar	31
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	37
KAYNAKLAR	41
7-EKLER	53



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1 : Hastaların Demografik Özellikleri-1

Tablo 4.2: Comet ve Klotho Düzeylerine Ait Tanımlayıcı İstatistikler

Tablo 4.3: Fertil ve İnfertil Endometriozis Olan Hastaların Genel Özelliklerinin Dağılımı ve Karşılaştırılması-1

Tablo 4.4: Fertil ve İnfertil Endometriozis Olan Hastaların Genel Özelliklerinin Dağılımı ve Karşılaştırılması-2

Tablo 4.5: Hastaların Skorlamalarına Göre Grupların Karşılaştırılması

Tablo 4.6: İnfertil Hastaların Demografik Özelliklerine Göre Klotho ve Comet Skorlarının Karşılaştırılması-1,

Tablo 4.7: İnfertil Hastaların Demografik Özelliklerine Göre Klotho ve Comet Skorlarının Karşılaştırılması-2

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL2.1: Yumurtalık Anatomisi

ŞEKİL 4.1: Kümülüs Hücreleri Comet Işımları Bilgisayar Görüntü Analizi I

ŞEKİL 4.2: Kümülüs Hücreleri Comet Işımları Bilgisayar Görüntü Analizi II



KISALTMALAR LİSTESİ

BMI: Vücut kitle indeksi

COC: Kümülüs-Oosit kompleksi

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DOR: Düşük Over Rezervi ROS: Reaktif oksijen türleri

FF: Foliküler sıvı

GC: Granüloza hücresi

HCG: İnsan koriyonikgonadotropin

ICSI: Intrastoplazmik sperm enjeksiyonu

IVF: Invitro fertilizasyon

OPU: Yumurta toplama işlemi (Oocyte Pick-up)

PKOS: Polikistikover sendromu

ROS: Reaktif oksijen türleri

TAS: Total antioksidan sistem

TCS: Total cometscores

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri

ÖZET

İNFERTİL ENDOMETRİOZİS OLGULARIN KLOTHO SEVİYELERİ VE KÜMÜLÜS HÜCRELERİNDEKİ DNA HASARLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Endometriya implantların uterus boşluğu dışında bulunması ve büyümesi ile karakterize edilen endometriozis, sıklıkla infertilite ile ilişkilidir ve üreme çağındaki kadınların %10-15'ini ve infertil kadınların ise yaklaşık %30'unu etkilemektedir. Endometriozisin erken bir aşamasında bile kadınların doğurganlığını bozulabilmektedir. İnsanların oosit yaşlanması, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı gibi farklı çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Yumurtalık mikroçevresi oosit yaşlanmasına ve ömrünün uzamasına katkıda bulunmaktadır. Oksidatif stres, hücresel yaşlanmanın altında yatan en kritik mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir Endometriozis oosit kalitesini bozabilen ve böylece embriyo gelişimini riske atabilecek bir faktör olan oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir.

Özellikle, endometriozisli kadınlarda artmış oksidatif stresin klotho düzeylerini düşürebileceği ve inflamasyonunklotho protein sentezini bozabileceği öne sürülmektedir. Kadınlarda, serum klotho düzeylerinin infertilite ile ilişkisi üzerine yapılan araştırmalar sınırlıdır. Ancak, bazı çalışmalar, düşük serum klotho düzeylerinin kadınlarda infertilite riskini artırabileceğini göstermektedir. İnfertilendometriozis hastalarının kümülüs hücrelerindeki DNA hasarına karşı klothonun potansiyel koruyucu rolü, bilimsel çalışmalarda kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır.

Bu tez projesinde; infertilendometriozis hastaların serum klotho düzeyleri ile kümülüs hücrelerindeki DNA hasarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışma İstanbul Momartİnfertilitekliniğine tedavi için başvuran endometriozis tanısı alan 35infertil ve endometriozis tanısı almayan 32fertil (kontrol grubu) kadın olgularından alınan serum ve kümülüs örnekleri toplanmıştır. Serum örneklerinde α -klotho düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. IVF sikluslarında elde edilen kümülüs hücrelerindeki DNA hasarı Cometassay analizi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmanın sonuçları; infertilendometriozis hastalarında serum klotho seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi.

Tek ve çok değişkenli regresyon analizine göre infertil endometriozis olgularında klotho düzeylerini etkilediği saptandı. Kümölüs hücrelerindeki DNA hasarının infertil endometriozis hastalarında saptanan DNA Tail (%)’nin daha yüksek olduğu belirlendi. Serum klotho seviyeleri ile kümölüs hücrelerindeki DNA hasarı arasında anlamlı olmayan negatif bir ilişki belirlendi. Sonuç olarak endometriozisli hastalarda ki düşük serum klotho seviyelerinin infertilite riskini artırabileceği düşünölmektedir.



Anahtar Kelimeler:Endometriyoz (çikolata kisti),Klotho,DNA hasarı,kümölüs hücreleri,İnfertilite (Kısırlılık)

Esra Büşra DURDU, 2023

ABSTRACT

EVALUATION OF KLOTHO LEVELS AND DNA DAMAGES IN CUMULUS CELLS OF INFERTILE ENDOMETRIOSIS CASES

Endometriosis, characterized by the presence and growth of endometrial implants outside the uterine cavity, is frequently associated with infertility and affects 10-15% of women of reproductive age and approximately 30 years of age. Percentage of infertile women. Even in the early stages of endometriosis, it can impair women's fertility. People's oocytes are affected by different environmental factors such as aging, nutritional habits and lifestyle. The ovarian microenvironment contributes to oocyte aging and longevity. Oxidative stress is considered one of the most critical mechanisms underlying cellular aging. Endometriosis is associated with oxidative stress, a factor that can impair oocyte quality and therefore compromise embryo development.

It has been suggested that increased oxidative stress, especially in women with endometriosis, may reduce Klotho levels and inflammation may disrupt Klotho protein synthesis. Research on the relationship between serum Klotho levels and infertility in women is limited. However, some studies suggest that low serum Klotho levels may increase the risk of infertility in women. The potential protective role of Klotho against DNA damage in cumulus cells of infertile endometriosis patients has not been extensively investigated in scientific studies. In this thesis project; It is aimed to determine DNA damage in cumulus cells according to serum Klotho levels of infertile endometriosis patients.

In this study, serum and cumulus samples were collected from 35 infertile women diagnosed with endometriosis and 32 fertile (control group) women without endometriosis who applied to Istanbul Momart Infertility Clinic for treatment. α -Klotho levels in serum samples were measured using the ELISA method. DNA damage in cumulus cells obtained in in vitro fertilization cycles was evaluated by Comet assay analysis.

The results of the study; It was determined that serum klotho levels in infertile endometriosis patients were significantly lower than in the control group.

According to univariate and multivariate regression analysis, it was found to affect klotho levels in infertile Endometriosis cases. It was determined that DNA damage in cumulus cells was higher in the DNA Tail (%) detected in infertile endometriosis patients. A non-significant negative relationship was determined between serum Klotho levels and DNA damage in cumulus cells. As a result, it is thought that low serum klotho levels may increase the risk of infertility in patients with endometriosis.



Keywords: Endometriosis (chocolatecyst), Klotho, DNA damage, cumulus cells, Infertility

Esra Büşra DURDU, 2023

1.GİRİŞ

İnfertilite, ‘tıbbi öykü, psikososyal ve ekonomik yönleriyle alınan, herhangi bir korunma yöntemi kullanılmadan, 12 ay veya daha fazla korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebe kalamama’ olarak tanımlanan bir hastalıktır. İnfertilite tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunudur ve infertilite oranının ülkemizde %10-15 olduğu ve her altı çiftten birinin de bu sorunu yaşadığı bildirilmektedir. Kadın faktörü tek başına tüm infertilite vakalarının en az %35’ini oluşturmaktadır. İnfertil kadınların yaklaşık %25-50’sine endometriozis (çikolata kisti) tanısı konurken, endometriozisli kadınların da %30-50’sinin infertil olduğu görülmektedir. İnfertil kadınların endometriozise sahip olma olasılığı fertil kadınlardan 6 ila 8 kat daha fazladır (Agarwal,2005;Bullett vd.,2010; Sezgin vd.,2014).

Endometriozis, endometriyal epitelyal ve/veya stromal hücrelerinin uteruskavitesi dışında başka bölgelerde büyümesi sonucu gelişen, üreme çağındaki kadınların yaklaşık %10’nu etkileyen, pelvik ağrı, dismenore (ağrılı adet görme) ile kendini gösteren östrojene duyarlı bir hastalıktır (Giudice vd., 2004; Zondervan vd.,2018).

Endometriozisli kadınlarda, hastalığın erken aşamasında bile (minimal/hafif endometriozisli) doğurganlık sıklıkla bozulabilmektedir. Endometriozis ile infertilite ilişkisini destekleyenpek çok çalışma bulunmasına rağmen infertiliteye bağlı endometriozisin altında yatan mekanizmalar konusunda çalışmaların hala sınırlı olduğu görülmektedir(Da Broi, 2018; Fan vd.,2016).

Kümüls hücrelerinin kadın üreme sisteminde yumurta gelişimini nasıl etkilediğini ve oositi zararlı sistemik hastalıklardan nasıl koruduğunu anlamak infertilitenin tedavisi açısından oldukça önemli bir role sahiptir. Bu nedenle bu hücrelerde oksidatif hasarın belirlenmesi hem kadın üreme sisteminin biyolojik potansiyelinin değerlendirilmesi için bir test hem de çevredeki toksik maddeleri için biyobelirteç olarak gösterilmektedir (Sinkó vd.,2005; Lin vd., 2020).

Son yıllarda yapılan çalıřmalar, endometriozisli kadınlarda antioksidan ve anti-inflamatuar etkisi olan klotho proteininin dūřuk seviyelerde olduėunu gōstermiřtir. Bu durum, endometriozisin patogenezinde klotho proteininin olası bir rol oynayabileceėini dūřündürmektedir. Endometriozisli kadınlarda artmıř oksidatif stresin klotho dūzeylerini dūřūrebileceėi bildirilmekle birlikte, kadınlardaki serum klotho dūzeylerinin infertilite ile iliřkisi ve mekanizmaları konusunda daha fazla arařtırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Badosa vd.,2023; Takemura vd., 2016).

Bu tez projesi ile; İstanbul Momart infertilite kliniėine In vitro fertilization (IVF) tedavi için bařvuran endometriozis tanısı alan infertil ve endometriozis tanısı almayan fertil (kontrol grubu) kadın olgularından alınan serum örneklerindeki α-Klotho dūzeyleri ile IVF sikluslarında elde edilen kūmūlū hūcrelerindeki DNA hasarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalıřmadan elde edilecek bulgular; infertil endometriozis ve endometriozis olmayan fertil olgularda ilk defa serum klotho dūzeylerinin belirlenmesi ile gerekli olan literatūr açıėına katkı saėlayacaktır. Elde edilen verilerin bundan sonraki çalıřmalara ncūlūk etmesi beklenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1İnfertilite

İnfertilite, 12 aylık düzenli, korumasız cinsel ilişkiden sonra veya bir kişinin yeniden üretme kapasitesinin bozulmasından dolayı klinik bir hamilelikoluşturulmaması ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Zegers vd.,2017). İnfertilite problemi hayatı tehdit eden bir hastalık olarak değerlendirilmese de hem bireyi hem de toplumu etkileyen biyolojik, sosyal, kültürel ve psikolojik boyutları olan bir sağlık sorunudur (Upkong vd., 2006). İnfertilite her iki cinsiyette de bazı nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilmekte ve prevalansı da her geçen gün artmaktadır. Diyabet, obezite, hipertansiyon gibi kronik hastalıklarkötü beslenme alışkanlıkları, ağır metallere ve pestisitlere gibi çevresel kirleticilere maruz kalmak infertiliteye neden olabilir ayrıca, stres, sigara, kronik alkol tüketimi, çeşitli katkı maddeleri içeren kafeinli içecekler ve aşırı fiziksel aktivite gibi değişken yaşam tarzı alışkanlıkları da kadınlarda infertiliteyeneden olabilmektedir (Broughton vd., 2017; Guo, D vd., 2017; Piché vd., 2018). İnfertilitenin etiyojisi incelendiğinde çiftlerin %30'unda izole erkek faktörü %20'de hem kadın hem de erkek faktörü, %40-50'sinde ise izole kadın faktöründen kaynaklandığı görülmektedir (Borghat vd.,2018;Cabler vd.,2010; Dohle vd.,2010).

İnfertilite modern toplumda üreme çağındaki kadın nüfusunun %20-35'ini etkileyen küresel bir sağlık sorunu olduğu bildirilmektedir (World Fertility Patterns, 2015).

Üreme çağındaki kadınlarda infertiliteprevalansının, Batı dünyasındaki her 7 çiftten birinde ve gelişmekte olan ülkelerde ise her 4 çiftten biri olduğu görülmektedir (Mascarenhas vd.,1990).

İnfertilite birincil (primer) veya ikincil infertiliteolarak sınıflandırılmaktadır. Primerinfertil kadın, hiç klinik gebelik tanısı konmamış olarak sınıflandırılırken, sekonder kadın infertilitesi, klinik gebelik oluşturamayan ancak daha önce klinik gebelik tanısı almış kadınlar için kullanılmaktadır (Zegers vd.,2017).

Nöroendokrin ve uterin faktörlere rağmen, yumurtalıkların ve yumurtalık foliküllerinin üreme yaşlanmasında önde gelen düzenleyicilerinin olduğu bilinmektedir (Faddy, 2000).

Bu hipotez yaşı bağılı infertiliteyi araştıran çalışmalarda genç kadınlardan alınan oositlerin kalitesiyle de doğrulanmaktadır (Sauer vd.,1990; VeldevePearson, 2002). Olgun bir oositin büyümesi, tüm yumurtalık bölmeleri arasındaki iletişime bağlı olup multifaktöriyel bir süreçtir. Folikül/oosit yaşlanmasını etkileyen faktörlerin ve yaşlanma mekanizmalarının belirlenmesi infertilite açısından oldukça önemlidir. (Hamet ve Tremblay, 2003).

2.2 Endometriozis

Endometriozis, kadınları etkileyen en yaygın görülen üreme bozukluklarından biridir (Domínguez vd.,2018). Endometriozis endometriyal epitelyal ve/veya stromal hücrelerinin uterus kavitesi dışında yumurtalıklarda, fallop tüplerinde, vajina veya uterusun diğer kısımlarında, nadiren de karın ve akciğerlerde büyümesi sonucu gelişen ve üreme çağındaki kadınların yaklaşık %10'unu etkileyen, pelvik ağrı, dismenore ve infertiliteye neden olan östrojen hormonuna duyarlı kronik inflamatuvar bir hastalıktır (Giudice vd.,2004; Peiris vd.,2018). Endometriozis, kadınları etkileyen en yaygın görülen üreme bozukluklarından biridir (Domínguez vd.,2018).

İnfertil kadınların yaklaşık %25-50'si endometriozisli iken, endometriozisli kadınların %30-50'sinin de infertil olduğu ayrıca infertil kadınların endometriozise sahip olma olasılığının fertil kadınlara göre daha fazla olduğu bildirilmektedir (Agarwal vd.,2005; Bullettı vd.,2010; Sezgin vd., 2014). 35 yaşın altındaki endometriozisli kadınlarda infertilite görülme oranı, endometriozis tanısı olmayan kadınlara kıyasla iki kat arttığı bildirilmektedir (Prescott vd.,2016). Bu nedenle endometriozis, kendi başına veya diğer doğurganlığı etkileyen faktörlerle infertilitenin önemli nedenleri arasında gösterilmektedir (Tanbo ve Fedorcsak, 2016).

IVF'te yapılan çalışmalarda endometriozisli kadınlarda fertil kadınlardan daha düşük implantasyon ve gebelik oranları gözlenmiştir. Bu durum endometriozis ve endometriyal kısımlarda bozulma olan hastalarda düşük oosit kalitesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda endometriozisli kadınlardan alınan oositler sağlıklı kadınlardan alınan oositlerle karşılaştırıldığında daha olumsuz sonuçlar vermiştir (Marcellin vd., 2015).

Bu oositlerde anormal gelişim gösterme oranının sağlıklı kadınlardan alınanlara göre daha fazla olduğu ve gelişen blastomer sayısının da daha az olduğu tespit edilmiştir (Marcellin vd., 2015).

Endometriozisle ilgili yapılan epidemiyolojik açıdan yapılan çalışmalarda, farklı etiyolojik hipotezleri önermek veya desteklemek için çeşitli risk faktörleri incelenmiştir. Sosyal sınıf ve aile öyküsü bir yana, endometriozis ile en tutarlı şekilde ilişkili faktörler, erken menarş yaşı ve uzun ve ağır adet döngüleridir. Diğer ana risk faktörleri, alkol alımı, oral kontraseptif kullanımı ve poliklorlubifeniller ve dioksinmaruziyeti gibi çevresel kirleticilere maruziyet endometriozis patogeneğinde rol oynamaktadır (Parazzini vd.,2014; Mcleod vd.,2010).

Bazı çalışmalar dioksinlere maruz kalmanın endometriozise neden olabileceğini öne sürmektedir. Son kanıtlar ayrıca diğer çevresel toksik maddelerin (ftalatlar, bisfenol A veya organoklorlu kirleticiler gibi) endometriozis gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir (Buck vd.,2013)

2.3 Oosit Kalitesi

Oosit kalitesi, bir yumurtanın içsel gelişim potansiyelini yansıtmaktadır. Bu, olgun bir oositin döllenmesine ve bir embriyoya gelişmesine izin veren biyokimyasal ve moleküler durumu ifade etmektedir, düşük oosit kalitesi ya polispermi (bir yumurta hücreğine birden daha fazla sayıda spermle döllenmesi) ve/veya durmuş embriyonik gelişim ya da spontan kürtaj ile sonuçlanabilmektedir. Ayrıca embriyo ve fetüslerin çevresel faktörlerle gelişimsel olarak programlanmasının oosit gelişim potansiyeline aracılık ettiği öne sürülmektedir (Fleming vd., 2004; Maloney ve Rees 2005, Thompson vd.,2006).

Oosit gelişim yeterliliği (veya kalitesi), gebelik başarısı için hız sınırlayıcıdır; çünkü oositler, embriyogenez sırasında gerekli olan mitokondri dahil olmak üzere hemen hemen tüm hücresel yapı taşları için temel oluşturmaktadır. Oosit kalitesinin kötü olmasının en yaygın nedeni, oosit mitokondriyal verimliliğinin azalması ve oksidatif stresin artmasıyla güçlü bir şekilde bağlantılı olan doğal yaşlanmadır. Yaş artışının fetüsteki kromozomal anormallikler ile ilişkisinde primer oositlerin yaşlandıkça DNA hasarına duyarlı oldukları bilinmektedir (Sadler, 2011).

Bununla birlikte genç kadınlarda oosit ve embriyo gelişimi sırasında ciddi bozukluklara neden olan hızlı yaşlanma veya genetik mutasyonlar nedeniyle de oosit kalitesi bozulabilmektedir (Homer, 2020).

2.4 Oksidatif Stres

İnsan oosit yaşlanması, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı gibi farklı çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Yumurtalık mikroçevresi oosit yaşlanmasına ve ömrünün uzamasında önemli rol oynamaktadır (Toka vd.,2019).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) moleküllerde ve DNA da hasara yol açabilen reaktif kimyasal bileşenlerdir. ROS fazlalığı veya antioksidan eksikliği oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Normalde vücut, antioksidanlar gibi serbest radikalleri dengelemek için koruyucu mekanizmalara sahiptir. Oksidatif stres, hücresel yaşlanmanın altında yatan en kritik mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir (Toka vd.,2019;Younis vd.,2022). Oksidatif stres, ROS üretimi ve antioksidanların süpürücü etkileri dengesiz hale geldiğinde ortaya çıkmaktadır. Bu dengesizlik, normal metabolizma sırasında üretilen ROS'un birikmesine neden olmaktadır. Yumurtalıkta oluşan oksidatif stres foliküler atreziye ve oositlerin sayı ve kalitesinde azalmaya yol açabilmektedir (Toka vd.,2019). Oksidatif stres telomer kısalmasını ve kromozomal ayrışma bozukluklarını arttırarak mayoz, fertilizasyon, embriyo gelişimini,oosit kalitesini bozarak infertiliteye neden olabilmektedir. Bu nedenle antioksidanlar, yumurtalık fonksiyonunun ve doğurganlığın korunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Devine vd.,2011; Agarwalvd.,2005).

DNA hasarı, mutasyonlara ve genetik değişikliklere yol açabilmektedir. Bu durum hücrelerin normal işlevlerini engellemesine ve çeşitli hastalıkların gelişmesine neden olmaktadır. Endometriozis,genetik hormonal ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşiminin sonucu olarak ortaya çıkmasıyla birlikte oksidatif stres ve dna hasarı endometriozisin patogenizinde önemli rol oynamaktadır (Carvalho vd., 2012).

Al-Saleh ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada IVF tedavisi gören 599 çiftte oksidatif stres durumu, üreme hormonları, sigara kullanımı ve sonuçları ile ilişkisi incelenmiş ve bu faktörlerin IVF tedavisinin başarısını etkileyip etkilemeyeceğini araştırılmıştır. Çalışma sonuçları, yumurtayı çevreleyen sıvıdaki yüksek antioksidan seviyelerinin yüksek dölleme oranı ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur (Al-Saleh vd., 2021).

Hem erkeklerde hem de kadınlarda subfertilitenin etiyolojisinde önemli bir rolü olan oksidatif stresin endometriozisli hastalar ile arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan çalışmalarda en çok kullanılan biyolojik örneklerin serum, peritoneal sıvı, folliküler sıvı, yumurtalık korteksi ve endometriyal dokular olabileceği rapor edilmektedir (Gusti vd.,2022).

Kadın üreme sisteminde granüloza ve teka hücreleri tarafından salgılanan foliküler sıvı, folikülogenezi ve oosit büyümesini ve olgunlaşmasını bozabilen ROS dahil olmak üzere kan plazmasından türetilen faktörler içermektedir (Da Broi vd.,2018).

Yapılan çalışmalar da endometriozisli kadınların folikülersıvısındaki oksidatif stres yaygın olarak değerlendirmiştir. Foliküler sıvıdaki ROS ve antioksidan sistemler arasındaki dengesizlik, DNA sitoskelet ve hücre zarı hasarına neden olarak daha düşük yumurta kalitesi, düşük kaliteli embriyolar ve endometriozis ile ilişkili infertiliteye neden olabilmektedir (Marcellin vd.,2015; Singh vd., 2014;Da Broi vd.,2018).

Memelilerde yumurtalık içi ROS artışı, birçok faktör tarafından indüklenmektedir. Oositlerdeki hasarlı mitokondri, in vivo olarak artan ROS'un ana nedenidir. Yaşa bağlı yumurtalık yaşlanması, mitokondriyal işlev bozukluğu ve ROS agregasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Hou vd., 2019).

Vücutta ROS birikimine ek olarak sigara içmek, sağlıksız beslenme alışkanlığı egzersiz eksikliği, çevresel kirlenmelerinde in vitro olarak oosit olgunlaşması sırasında bir ROS kaynağı olarak hiperoksik ortam oluşturup aşırı inflamasyon sonucu oksidatif stres ve DNA hasarına neden olabileceği bildirilmektedir (Dattilo vd.,2016;Zhang vd.,2021;Asadi vd.,2017).

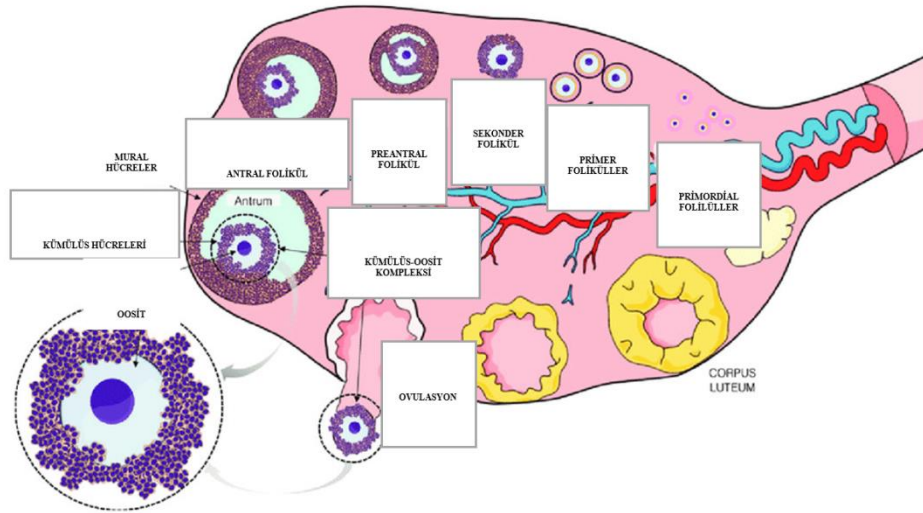
Son yapılan çalışmalarda foliküler sıvıdaki ROS ve antioksidan sistemler arasındaki dengesizlik araştırılarak endometriozisli kadınların serumundaki total antioksidan sistem (TAS) düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu ve antioksidan tedavilerin yumurta kültürü ortamının takviyesi veya oral uygulama yoluyla yumurta kalitesini iyileştirebileceği bildirilmektedir (Zhang vd.,2021; Türkyılmaz vd.,2016; Turgut vd., 2013).

Sonuç olarak antioksidan takviyesi, ROS aracılı oosit hasarını azaltmakta ve yaşanan oosit ve foliküllerin kalitesini korumaktadır (Piątek vd.,2016).

2.5 Kümülüs Hücreleri ve DNA Hasarı

Memeli oositleri, bitişik somatik hücrelerle karşılıklı bağımlı bir ilişki içinde gelişmektedir. Oosit büyümesinin büyük kısmı, yumurtanın nispeten farklılaşmamış granüloza hücreleri ile yakından ilişkili olduğu preantral foliküllerde meydana gelmektedir. Yaklaşık olarak oosit büyüme fazının sonuna karşılık gelen folikülerantrum oluşumu üzerine, granüloza hücreleri anatomik ve fonksiyonel olarak farklı iki gruba ayrılır: folikül duvarını kaplayan ve esas olarak steroidojenik bir role sahip olan muralgranuloza hücreler ve oosit ile yakın bir ilişki oluşturan kümülüs hücreleridir. Kümülüs hücreleri zona pellucidaya nüfuz eden ve oosit ile uçlarında boşluk kavşakları oluşturan ve kümülüs-oosit kompleksi adı verilen trans-zonalsitoplazmik yapıya sahiptir (Albertini vd., 2001; Da Broivd.,2018). Embriyonik gelişim kapasitesiniarttırmak için antralfoliküler gelişim sürecinde oosit yavaş yavaş ve sıralı olarak mayotik ve gelişimsel yeterlilik kazanmaktadır (Gilchrist vd.,1997).

Oogenez (yumurta farklılaşması) aşamasında,oosit embriyo gelişiminin moleküler ve sitolazmik mekanizması **Şekil 1'de** gösterilmektedir (Sirard vd., 2006). Bu süreç 'oosit kapasitasyonu' olarak adlandırılmaktadır (Hyttelvd.,1997).



ŞEKİL2.1: Yumurtalık anatomisi olgun antralfolikülde oosit, antrum içindeki foliküler sıvı ile temas halinde olan, kümülüs hücreleri adı verilen özelleşmiş granüloza hücreleri ile çevrilidir (Von Mengden vd. 2020).

Farklılaşmamış granüloza hücrelerinden köken alan kümülüs hücreleri, oosit kalitesini ve embriyonik gelişim sürecini ve infertilitede tedavisinde gebelik sonuçlarını tahmin etmede önemli rol oynayan hücrelerdir. (Da Broi vd.,2018; Bongkoch vd.,2021). Kümülüs hücrelerinde ROS üretiminin endoplazmik retikulum (ER) stresini uyandırma yoluyla endometriozis over kümülüs/granüloza hücrelerinin yaşlanmasını indüklediğini ve bunun da endometriozis ile ilişkili infertiliteye katkıda bulunduğunu göstermiştir (Xiang vd.,2020).

DNA hasarının, doğurganlık üzerinde olumsuz etkileri olabilir. Kümülüs hücrelerindeki DNA hasarı veya apoptozun belirlenmesi oosit kalitesini yansıtmaması nedeniyle, DNA hasarının belirlenmesi hem kadın üreme sisteminin biyolojik potansiyelinin değerlendirilmesi için bir test, hem de çevredeki toksik maddeleri için biyobelirteç olarak gösterilmektedir (Ildikó vd., 2005). Endometriozisli hastaların patofizyolojisinin altında yatan mekanizmalarının daha çok araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Carvalho vd.,2012).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, DNA hasarının fertilite üzerindeki etkilerini incelemekte ve kümülüs hücrelerindeki DNA hasarının belirlenmesi de önem kazanmaktadır.

2.6 Klotho

Adını Yunan kader tanrıçasından alan klotho yakın zamanda keşfedilen ve vücutta çeşitli organlarda üretilen α , β ve g-Klotho izoformlarını içeren tek geçişli transmembran proteinleridir (Xu vd.,2020). İnsanlarda, α -klotho çoğunlukla böbreklerde, paratiroid bezinde, yağ dokusunda ve koroid pleksusta eksprese edilerek membrana bağlı ve çözünür formlarda var olan yaşa bağlı süreçleri düzenlemektedir. Ayrıca prostat, ince bağırsak, plasenta ve göbek kordon kanında da bulunduğu bilinmektedir. Çözünür α -klotho, dolaşımdaki ana fonksiyonel formdur ve kan, idrar ve beyin omurilik sıvısında tespit edilebilmektedir (Neyra ve Hu,2017; Makoto 2011; Guo vd.,2018).

Klotho'nun temel işlevleri arasında fosfat dengesini düzenlemek, antioksidan aktivite göstermek, inflamasyonu azaltmak ve yaşlanma sürecinin etkilenmesi sayılabilmektedir (Hu vd.,2013).

Böbrek, beyin ve üreme sistemi gibi organlarda klotho proteininin düzgün çalışması, sağlıklı üreme fonksiyonları için önemli olduğu bilinmektedir. (Xu vd.,2020). Yapılan çalışmalarda klotho eksikliği veya klotho geninin susturulmasının anormal fosfat ve mineral regülasyonu sergileyerek hızlandırılmış yaşlanma ve kısa ömre yol açtığı aşırı ekspresyonun ise ömrü uzattığı ve birçok metabolik yola katılarak böbreklerde, koroid pleksusta ve nöronlarda yüksek oranda ifade edildiği bildirilmektedir (Makoto, 2008; Makoto vd.,1997).

Böbrek, beyin ve üreme sistemi gibi organlarda klotho proteininin düzgün çalışması, sağlıklı üreme fonksiyonları için önemli olduğu bilinmektedir (Xu vd.,2020).

Kadın üreme sisteminde, α -klotho meme dokusunda, yumurtalıkta, salpinks ve uterusu ifade edilmektedir. Son zamanlarda klotho geni tarafından kodlanan bir doku enzimi olan klothonunhipotalamus-hipofiz-yumurtalık aksı ile yakından ilişkili olduğu,östrojende dahil çeşitli hormonal fonksiyonları etkileyebildiği, kadın üreme hastalıklarının gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir.Ayrıca ilerleyen yaşla birlikte de klotho gen anlatımı azalmaktadır (Xu ve vd.,2020; Takemura ve Okabe 2016; Lu vd., 2008; Bıyık vd., 2021).

Klotho geni,hamilelik sırasında ağırlıklı olarak plasentada eksprese edilmektedir.Gebe kadınların gebe olmayan kadınlardan daha yüksek plazma α -klotho seviyesine sahip olduğu ve plazma α -klotho seviyesinin gebelik yaşının artmasıyla birlikte arttığı görülmektedir (Loichingervd., 2016).

Zenghui Mao ve diğerlerinin yaptığı çalışmada klothoile tedavi edilen dişi sıçanlardaklothonun gebelik oranın arttığı ve yumurtalık fonksiyonunu normalleştirerek ve kistik foliküllerin oluşumunu azaltarak yeni doğanların vücut ağırlığını arttırdığı bildirilmektedir (Mao vd.,2018).

Kadınlardaki düşük serum klotho düzeyleri infertilite riskini artırabilmektedir. Kadınlarda yumurtalıklarda anormal folikül gelişimi ve hormonal düzensizliklerle karakterize edilen polikistikover sendromu (PKOS) hastalarında serum klotho düzeylerinin azaldığı ve bu durumun infertilite ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Serum klotho düzeylerinin infertilite üzerindeki etkisinin ve mekanizmalarının anlaşılması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Fan vd.,2016; Xu vd.,2020).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları ve Özellikleri

Çalışmaya katılan tüm hastaların klinik bilgileri mevcuttur. Çalışmamız için İstanbul Yeni Yüzyıl Klinik Araştırmalar Etik Kurulunda 09.12.2021 tarih ve 39 sayılı yazısı ile etik kurul onayı alınmıştır. Etik Kurulu’ndan onay alındıktan sonra 2022-2023 yılları arasında İstanbul Momart kliniğine başvuran toplam 88 hasta ile görüşüldü. Çalışmaya onay veren 61 gönüllü hastalara bilgilendirilmiş onam formu okutuldu ve onaylatıldı. Çalışmaya katılan her bir kişiden örnekler alınmadan önce hastalarla yüz-yüze sosyo-demografik verileri içeren bir anket doldurması istendi. Hastaların primer tanısı, yaşı, kilosu, boyu, sigara alışkanlığı, beslenme alışkanlıkları, günlük yaşamda veya çalışma ortamlarında herhangi bir kimyasala maruz kalıp kalmadıkları, ek hastalıkları, eğitim bilgileri, mesleğine ilişkin bilgileri sorgulandı. Ayrıca tüm katılımcıların örnek toplamadan birkaç ay önce yaşam tarzlarının ve ortamlarının değişmediği onayı da alındı.

Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- Laporoskopik ve ultrasonografik olarak endometriozis tanısı almış ve infertilite sebebiyle başvuran,
- En az bir yıllık evli olan,
- Önceden tanı almış kronik karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp hastalığı olmayan,
- Kalıtsal bir hastalığı bulunmayan,

Hastaların çalışmaya dahil edilmeme kriterleri;

- Endometriozis dışı sebeplerle başvuran infertil hastalardan,
- IVF/ICSI (Intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) endikasyonu uygun görülen çiftler.

3.2 Örneklerin Toplanması

Çalışmaya katılan her bir kişiden alınan kan örnekleri ve folikülersıvı (FF) uygun koşullarda toplandı.

3.2.1 Serum örnekleri

İnfertilite kliniğine infertilite nedeniyle başvuran çiftlerden endometriozisi olan infertil ve endometriozisi olmayan fertil kadınlardan 5 ml kan örneklerijelli serum ayırma tüplerine alındı. Kan örnekleri, toplandıktan sonra 30 dakika içinde 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek serumları klotho analizi yapılincaya kadar -20°C’de klinikte muhafaza edildi. Analizlerin yapılması için tüm örnekler İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Yaşam Bilimleri Laboratuvarına transfer edildi.

3.2.2 Kümülüs hücreleri

Kümülüs hücreleri, oosit içermeyen ve IVF için gerekli olmayan atılmış foliküler aspiratlardan elde edildi. Oosit toplama işlemi İnsan Koryonik Gonadotropini (HCG) dozundan itibaren 35-36. saatte gerçekleştirildi (Mehri vd.,2017). Her bir hasta için yapılan yumurta toplama (OPU) işlemiyle hastalara ait oositler folikül sıvısından uzaklaştırıldıktan sonra yaklaşık olarak 2-2.5 saate varan inkübasyon sonrası kümülüs hücreleriyle sarılan oositler hyaluronidaz içeren droplarda 37°C’lik ortamda 2-5 dakika bekletildi (Totey vd., 1993). Oositlerden ayrılan kümülüs hücreleri fosfat tamponlu salin (PBS) içinde yıkanarak eppendorf tüpünde toplandı (Vireque vd., 2017).

3.3 Kimyasal Maddeler

- Etidyumbromür (ETBR),SigmaAldrich, E8751
- Dimetilsülfoksit (DMSO),Sigma
- Fosfat tamponlu salin (PBS), Sigma
- Sodyum klorür (NaCl), Merck
- Potasyum klorür (KCl), Merck
- Triton X-100, Merck
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)Sigma
- Trisaminometan(Trisbase), Sigma
- Düşük Kaynama Dereceli Agaroza (LMA), Sigma
- Yüksek Kaynama Dereceli Agaroza (HMA), Sigma

- Disodyum fosfat (Na_2HPO_4), Merck
- Sodyum hidroksit (NaOH), Merck
- Human (Kl) KlothoElisa Kit, ELABSCIENCE, E-EL-H5451

3.4 Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Ayarlanabilir otomatik pipetler (2-20 μL ; 20-200 μL ; 100-1000 μL)
- Buzdolabı (+4°C)
- Derin Dondurucu (-20 C)
- Elektroforez (Elite 300-Wealtech)
- Su banyosu (Wisebath-Wisdlab)
- Laminarkabin
- Sıcak alan (Hot plateStirrer-Dathan MSH-20A)
- Vortex (Isolab)
- Hassas terazi (Radwag-AS220)
- pHMetre(Hanna Instruments HI 221)
- Soğutmalı Santrifüj (Nüve Nf 800R)
- ELISA reader (ThermoScientificMultiskan GO)
- Floresans Mikroskop (Zeiss)

3.5 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Otoklav bandı
- Otoklavlanabilirschott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)
- Pastör pipeti (2 mL)
- Pipet ucu (2-20 μL ; 20-200 μL ; 100-1000. μL)
- Lateks eldiven
- Filtre kâğıdı
- Falkon tüp (15 mL; 50 mL)
- Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)

3.6.Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.6.1.CometAssay Yöntemi

DNA sarmal kırıklarının tespiti için ‘CometAssay’ olarak adlandırılan (Single Cell Gel Electrophoresis-SCGE) yöntem kullanılarak kümülüs hücrelerinde DNA hasarı araştırıldı (Singh vd.,1988).

3.6.1.1 CometAnalizinde Kullanılan Çözelti ve Tamponların Hazırlanması

Fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4, 1000 mL); Bir beher içerisine ayrı ayrı tartılmak suretiyle; 136 mMNaCl, 2,7 mMKCl, 10 mMNa₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄ konulduktan ve üzerlerine 600 Ml distile su ile çözünmeleri sağlandı. pH metrenin kalibrasyonu yapılarak çözelti pH’sı 7,4’e ayarlanmış ve cam şişeye aktarılarak son hacim distile su ile 1L’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 2-8 °C’de buzdolabında kullanılmak üzere saklandı. (Singh vd.,1988)

Lizis çözeltisi (pH 10, 500 mL); bir beher içerisine ayrı ayrı tartılmak suretiyle; 136 mMNaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris tartıldıktan sonra üzerlerine 350 mLdistile su eklendi ve karıştırıcı yardımıyla çözünmeleri sağlandı. pH metrenin kalibrasyonu yapılarak çözelti pH’sı 10’a ayarlanmış ve cam şişeye aktarılarak son hacim distile su ile 500 mL’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti +4 °C’de kullanılmak üzere saklanmıştır. Çözeltimiz kullanılmadan bir saat önce; 1mL %1’lik Triton-X100’dan 1 mL, %10’luk DMSO’dan 10 mL alınmış ve son hacim 100 mL olacak şekilde lizis çözeltisi ile mezürde tamamlanmıştır. Sonrasında soğuk lizis için buzdolabında bekletilmiştir. DMSO kullanılmasının amacı hemoglobinlerde üretilen serbest demir radikallerinin temizlenmesidir (Singh vd.,1988).

Elektroforez tamponu (pH 13,1, 1000 mL); farklı beherler içerisine ayrı ayrı tartılarak,

Stok 1: 10 N NaOH ile 500 mLdistile su,

Stok 2: 200 mM EDTA ile 200 mLdistile su karıştırıldı.

Çözeltinin pH13’ten büyük olması sağlandı ve elektroforez tankının hacmine göre toplam hacim ayarlandı (Singh vd.,1988).

Nötralizasyon çözeltisi (pH 7,5, 250 mL); 0,4 M Tristartılarak bir beher içerisine konulmuş, üzerine 150 mL distile su eklenerek magnet yardımıyla karıştırıldı, pHmetrenin kalibrasyonu yapılarak çözeltinin pH'sı 7,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kapaklı cam bir şişeye aktararak distile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Analize kadar 2- 8°C'de buzdolabında saklanmıştır (Singh vd.,1988).

Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA); LMA'dan 0,75 g tartılarak üzerine 10 mL PBS (10 mM, pH 7,4) eklenmiş, mikrodalgada kaynatılmış ve analize kadar 2-8 °C'de buzdolabında saklanmıştır (Singh vd.,1988).

Normal kaynama dereceli agaroz (NMA); NMA'dan 1 g tartılarak üzerine 100 mL PBS (10 mM, pH 7,4) eklenmiş, mikrodalgada kaynatılmış ve analize kadar 2- 8 °C'de buzdolabında saklanmıştır (Singh vd.,1988)

Boyama çözeltileri; nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra comet gözlenmesi için floresan bir boya olan toz etidyumbromid (ETBR)'den 20 µL alınmış ve üzerine 10 µL distile su eklenerek cam bir şişeye konulmuş, cam şişenin yüzeyi ışık almaması amacıyla alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır (Singh vd.,1988). Çalışmamızda Hyaluronidase işlemi sonrası izole edilen kümülüs hücrelerinde bu adımlar izlenerek ETBR floresan boya kullanılarak DNA hasar seviyesi belirlenmiştir.

3.6.1.2.DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda hazırlanan preparatları floresan mikroskopunda X40 büyütmede; DNA hasarı için, her alanda en az 100 hücre sayıldı. Görsel olarak analiz işleminde Comet, DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride sınıflandırılır ve insan gözüyle kolaylıkla ayırt edebilmektedir.

Parlak spot görünüm DNA kuyruk görüntüsü vermemiştir ve 0 kategorisindedir. Çok küçük başlıca cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. kategoridedir. 0 ve 4. kategoriler arasında kalan cometler; 1, 2, 3 olarak sınıflandırıldı. DNA hasarını (TCS) değerlendirmek için toplam kuyruklu yıldız puanı parametresi kullanıldı. Daha sonra toplam kuyruklu yıldız puanı (TCS) aşağıdaki formüle göre hesaplandı: $TCS=0(n)+1(n)+2(n)+3(n)+4(n)$, burada "n" her sınıftaki hücre sayısını göstermektedir.

Comet görüntüleri Zeiss Zen (Blue Edition) programında kaydedilerek hücrelerdeki DNA hasarı TritekCometScoretm 2.0,2012 programı kullanılarak comet başını kuyruktan ayırt edebilmesiyle %DNA tail uzunluğu belirlendi.DNA hasarı yüzde kuyruk DNA'sı olarak ifade edildi, burada yüzde kuyruk DNA= [kuyruk DNA'sı/ (kafa DNA+kuyruk DNA'sı)] 100×. A daha yüksek yüzde kuyruk DNA'sı, daha yüksek bir DNA hasarı seviyesine işaret etmektedir. (McKelvey vd 1993; Green vd.,1996; Collins 2004).

3.6.2.Serumda Klotho Analizi

Serum klotho analizi Human (Kl) Klotho Elisa Kit, ELABSCIENCE, E-El-H5451 ElısaReader'da Optik yoğunluk (OD), 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.6.3.İstatistiksel Analizler

Araştırma verisi IBM SPSS 22 (IBM Statistical PackageforSocialSciences) aracılığıyla bilgisayar ortamına yüklenip ve değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri sayı ve yüzde olarak sunulmuştur. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında çapraz tablolardan yararlanılıp “Pearson Ki-Kare Testi”, “Yates Süreklilik Düzeltmesi” ve” Fisher Kesinlik Testi” uygulanmıştır. Anlamlı çıkan sonuçların alt grup testleri için “Bonferonni Düzeltmesi” uygulanarak yorumlanmıştır. Nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri normal dağılan değişkenler içinortalama ($\pm$)standart sapma, normal dağılmayan değişkenler için ise ortanca (min-maks) şeklinde sunulmuştur. Nümerik değişkenlerin normallik dağılımı “Kolmogorov-Smirnov” veya “Shapiro-Wilk” testleri ile değerlendirilmiştir. İki bağımsız gruplu nümerik değişkenlerin karşılaştırılmasında normal dağılan değişkenler için “Bağımsız Örneklem için T”, normal dağılmayan değişkenler için “Mann-Whitney U” testlerinden yararlanılmıştır. İki den çok nümerik grupların karşılaştırılmasında “Kruskall-Wallis H” veya “Tek yönlü ANOVA” testlerinden yararlanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri ise $p<0.05$ kabul edilip, $p<0.10$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ olacak şekilde de yorumlanmıştır.

4.BULGULAR

4.1 Demografik Sonuçlar

Çalışmaya alınan 67 hastaya ait genel özellikler Tablo 1’de verilmiştir. Buna göre; en çok yaş aralığı 26-33 yaş grubundadır (26 hasta). Vücut kütle indeksi (VKİ-BMI)’sı 32 ve üzeri olan sadece 8 hasta vardır (%11,9). Hastaların çoğu üniversite mezunudur (%56,7). Tüp bebek tedavisi gören 35 hasta vardır ve bu hastaların büyük kısmı 3. IVF tedavisindedir. Hastalardan 20 hasta alkol kullanmaktadır. 38 hasta sigara içmektedir ve sigara içenlerin de çoğu (%63,1) günde 1 paket sigara içmektedir. 10 hasta (%14,9) vitamin takviyesi almaktadır. Tüm hastaların %40,3’ü egzersiz yapmaktadır.

Tablo 4.2 :Hastaların demografik özellikleri-1

Değişkenler	Sayı (%)
Grup	
Fertil	32 (47.8)
İnfertilendometriozis	35 (52.2)
Yaş	
18-25	11 (16.4)
26-33	26 (38.8)
34-41	19 (28.4)
42 ve üstü	11 (16.4)
BMI	
20-23	20 (29.9)
24-27	20 (29.9)
28-31	19 (28.4)
32 üzeri	8 (11.9)
Eğitim	
Ortaokul	5 (7.5)
Lise	24 (35.8)
Üniversite	38 (56.7)
Kaç tüp bebek tedavisi	
1.Deneme	5 (14.3)
2.Deneme	12 (34.3)
3 ve üzeri Deneme	18 (51.4)
Sigara	
Hayır	29 (43.3)
Evet	38 (56.7)
Sigara içme sıklığı	
Günde 1pk	24 (63.1)
Haftada /ayda 1pk	14 (36.8)
Alkol	
Hayır	48 (71.6)
Evet	20 (29.9)
Vitamin takviyesi	
Hayır	57 (85.1)
Evet	10 (14.9)
Kimyasal Maruziyet	
Hayır	64 (95.5)
Evet	3 (4.5)
Psikolojik Stres	
Yok/Bazen	21 (31.3)
Sık Sık/Herzaman	46 (68.7)
Egzersiz	
Hayır	40 (59.7)
Evet	27 (40.3)

Tüm hastalara ait kümülüs Cometskorlarıve serum Klothodüzeylerine ait tanımlayıcı istatistikler **Tablo 4.2**'de verilmiştir.

Tablo 4.2:Comet ve klothodüzeylerine ait tanımlayıcı istatistikler

Değişkenler	Ort± SD	Ortanca (minimum-maksimum)
Comet	104.47 ± 4.2	104 (100 – 123)
Alfa serum klotho	375.23 ± 207.65	280 (83.29 – 970)

SD: standart sapma

67 hastanın 32'si fertil, 35'i infertilendotmetriozis hastalardır. Demografik verilere göre fertil ve infertilendotmetriozis hastaların dağılımı ve karşılaştırılması Tablo 3 ve Tablo 4'te verilmiştir. Infertil hastaların çoğu (%77,1) vitamin takviyesi almamaktadır ve bundan kaynaklı gruplar arasında %90,2 güvenle anlamlı bir farklılık mevcuttur (p=0.057). ‘‘Psikolojik stres yaşıyor musunuz?’’ sorusuna ‘‘sık sık/her zaman yaşıyoruz’’cevabınıheminfertilhemdefertil hastaların verdiği görülmektedirAilede genetik hastalık var mı? sorusuna cevapverenfertil-infertilendotmetriozis hastaları arasında %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı ancak %26'lık zayıf bir saptanmıştır (p=0.037). Çoğunda (%80) güçlü aile öyküsü bulunmamaktadır.

Tablo 4.3:Fertil ve infertilendometriozis olan hastaların genel özelliklerinin dağılımı ve karşılaştırılması-1

Değişkenler	Fertil(n:32)	İnfertilendotmetriozis(n=35)	p değeri
Yaş			
18-25	6 (18.8)	5 (14.3)	0.591 ^a
26-33	10 (31.3)	16 (45.7)	
34-41	11 (34.4)	8 (22.9)	
42 ve üstü	5 (15.6)	6 (17.1)	
BMI			
20-23	10 (31.3)	10 (28.6)	0.547 ^a
24-27	11 (34.4)	9 (25.7)	
28-31	9 (28.1)	10 (28.6)	
32 üzeri	2 (6.3)	6 (17.1)	
Eğitim			
Ortaokul	2 (6.3)	3 (8.6)	0.890 ^a
Lise	11 (34.4)	13 (37.1)	
Üniversite	19 (59.4)	19 (54.3)	
Kaç tüp bebek tedavisi			
1.Deneme	0 (0)	5 (22.7)	0.042 ^{a*}
2.Deneme	3 (23.1)	9 (40.9)	
3 ve üzeri Deneme	10 (76.9)	8 (36.4)	

Kategorik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri sayı (sütun içindeki %'lik) olarak sunulmuştur.a: Pearson Ki-Kare Testi; b: Yates Süreklilik Düzeltmesi; c: Fisher Kesinlik Testi;p<0.05

Tablo 4.4:Fertil ve infertilendotmetrioizis olan hastaların genel özelliklerinin dağılımı ve karşılaştırılması-2

Değişkenler	Fertil(n:32)	İnfertilendotmetrioizis(n=35)	p Değeri
Sigara			
Hayır	15 (46.9)	14 (40)	0.749 ^b
Evet	17 (53.1)	21 (60)	
Sigara içme sıklığı			
Günde 1pk	11 (64.7)	13 (61.9)	0.565 ^c
Haftada veya ayda 1pk	6 (35.3)	8 (38.1)	
Alkol			
Hayır	25 (78.1)	23 (65.7)	0.393 ^b
Evet	7 (21.9)	12 (34.3)	
Vitamin takviyesi			
Hayır	30 (93.8)	27 (77.1)	0.057^{c**}
Evet	2 (6.3)	8 (22.9)	
Kimyasal Maruziyet			
Hayır	31 (96.9)	33 (94.3)	0.534 ^c
Evet	1 (3.1)	2 (5.7)	
Psikolojik Stres			
Yok/Bazen	8 (25)	13 (37.1)	0.564 ^a
Sık Sık/Her zaman	24 (75)	22 (62.9)	
Egzersiz			
Hayır	19 (59.4)	21 (60)	0.958 ^b
Evet	13 (40.6)	14 (40)	

Kategorik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri sayı (sütun içindeki %'lik) olarak sunulmuştur. a: Pearson Ki-Kare Testi; b: Yates Süreklilik Düzeltmesi; c: Fisher Kesinlik Testi; *p<0.05; **p<0.10

Hastaların Comet ve serum klothodüzeylerinin infertil ve infertilendotmetrioizis gruplara göre karşılaştırılması Tablo 4.5’ de verilmiştir. Buna göre; fertil-infertilendotmetrioizis olan hastaların Comet düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamazken (p=0.104), Klothodüzeyleri arasında %99 güvenle istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0.001) ve bu farklılık infertil bireylerdeki Klotho düzeylerinin daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 4.5: Hastaların skorlamalarına göre grupların karşılaştırılması

Değişkenler	Fertil (n:32)	İnfertilendotmetrioizis (n=35)	p Değeri
Comet	103 (100-114)	104 (100-123)	0.104 ^a
Klotho	556.28±149.14	209.69±66.08	<0.001^{b***}

Normal dağılan nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ort±sd; normal dağılmayan nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ise ortanca (min-mak) olarak gösterilmiştir. a: Mann-Whitney U Testi; b: Bağımsız Örneklem T Testi; *:p<0,05; ***:p<0,001.

İnfertilendotmetrioizis hasta grubundaki genel özelliklerin klotho ve comet düzeylerinin karşılaştırılması Tablo-6 ve Tablo-7’de verilmiştir.

Tablo 4.6:İnfertil hastaların demografik özelliklerine göre serum klotho ve Comet skorlarının karşılaştırılması-1

Değişkenler	Serum klotho	P değeri	COMET	P Değeri
Yaş				
18-25	189.75±81.83		107±9.14	0.794 ^a
26-33	210.91±61.24	0.912 ^a	105.18±4.15	
34-41	215.09±59.14		105.37±3.96	
42 ve üstü	215.88±87.73		104±2.97	
BMI				
20-23	219.28±65.83		104.9±3.45	0.773 ^a
24-27	197.04±58.93	0.713 ^a	106±4.36	
28-31	222.97±81.35		106±6.94	
32 üzeri	190.56±56.26		103.67±3.2	
Eğitim				
Ortaokul	267.8±92.93		105±2.65	0.991 ^a
Lise	213.94±62.63	0.227 ^a	105.23±4.07	
Üniversite	197.62±62.8		105.37±5.57	
Kaç tüp bebek tedavisi				
1.Deneme	173.9 (113.5-231)		110.6±8.62	0.049 ^{a*}
2.Deneme	225.8 (138-266)	0.515 ^d	103.89±3.37	
3 ve üzeri Deneme	222.1 (83.29-362.1)		105±3.34	
Genetik				
Hayır	209.31±68.76		105.47±4.78	0.466 ^b
Evet	213.82±30.63	0.912 ^b	103.3±4.93	

Normal dağılan nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ort±SD; normal dağılmayan nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ise ortanca (min-mak) olarak gösterilmiştir. a: Tek Yönlü ANOVA analizi; b: Bağımsız Örneklem için t Testi; c: Mann-Whitney U Testi; d: Kruskall-Wallis H Testi; *p<0.05

Tablo 4.7:İnfertil hastaların demografik özelliklerine göre serum klotho ve comet skorlarının karşılaştırılması-2

Değişkenler	Serum klotho	P değeri	COMET	P Değeri
Sigara				
Hayır	204.41±50.04	0.682 ^b	102.5 (101-109)	0.495 ^c
Evet	213.22±75.92		106 (100-123)	
Sigara içme sıklığı (n=38)				
Günde 1pk	216.72± 82.7	0.891 ^b	104 (100-123)	0.246 ^c
Haftada veya ayda 1pk	207.53±68.43		107.5 (101-114)	
Alkol				
Hayır	211.07±65.63	0.868 ^b	103 (101-123)	0.123 ^c
Evet	207.07±69.8		108 (100-114)	
Vitamin takviyesi				
Hayır	209.77±70.65	0.990 ^b	104 (100-123)	0.832 ^c
Evet	209.44±51.68		104.5 (101-114)	
Kimyasal Maruziyet				
Hayır	204.59±62.28	0.062 ^{b**}	105.45±4.85	0.402 ^b
Evet	293.94±96.38		102.5±0.7	
Psikolojik Stres				
Yok/Bazen	234 (113.5-283.7)	0.353 ^c	104 (100-123)	0.468 ^c
Sık Sık/Her zaman	180.1 (83.3-362.1)		105 (100-114)	
Güçlü Aile Öyküsü				
Hayır	200.25 (83.29-362.1)		104 (100-123)	0.984 ^c
Evet	235 (131-266)	0.281 ^c	105 (101-109)	
Egzersiz				
Hayır	208.35±74.65		104 (100-123)	0.881 ^c
Evet	211.71±53.29	0.885 ^b	104 (101-114)	

Normal dağılan nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ort±SD; normal dağılmayan nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ise ortanca (min-mak) olarak gösterilmiştir. a: Tek Yönlü ANOVA analizi; b: Bağımsız Örneklem için t Testi; c: Mann-Whitney U Testi; d: Kruskall-Wallis H Testi; *p<0.05; **p<0.10

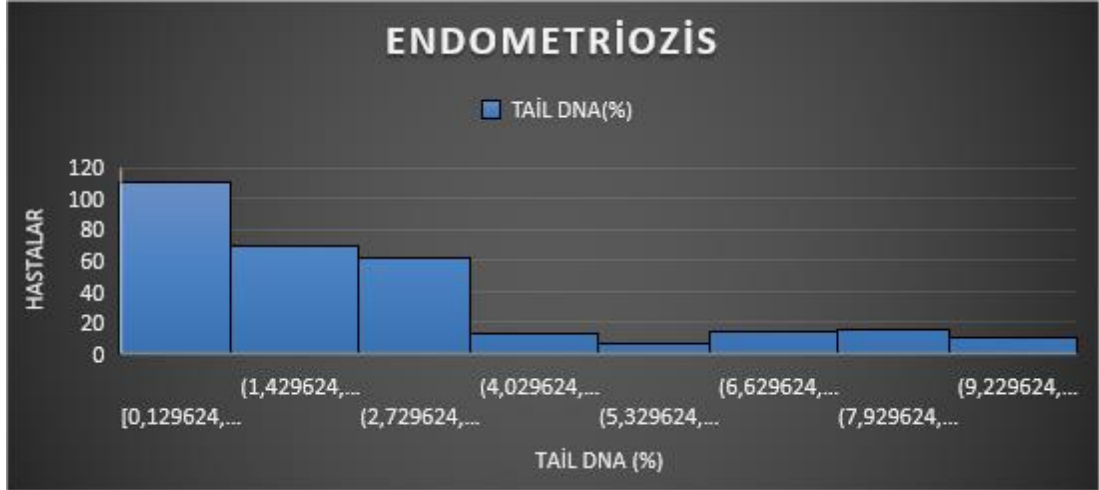
Yaş gruplarına göre hem serum klotho hem de comet düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır.

32 üzeri BMI olan hastaların hemserumklotho hem de comet düzeyleri düşüktür. BMI gruplarına göre bu düzeyler arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Tüp bebek tedavisi gören hastaların görmeyenlere göre klotho düzeyleri daha düşüktür, comet düzeyleri ise benzerdir.

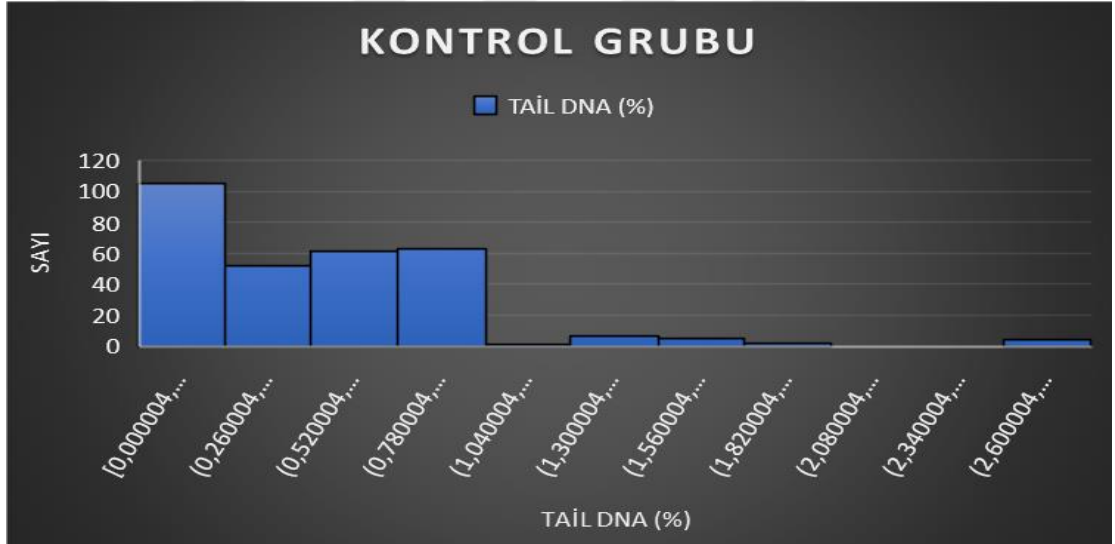
Kaç tüp bebek tedavisi gördüklerine göre serum klotho düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmazken, comet düzeylerine göre %95 güvenle en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu ve bu farklılığın da 1. Denemedeki comet düzeylerinin diğer iki gruba göre yüksek olmasından kaynaklandığı saptanmıştır. Sigara içenlerde serum klotho ve comet düzeyleri daha yüksek olduğu saptansa da bu yükseklik istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Sigara içme sıklığı daha yüksek olanlarda (günde 1 pk) klotho düzeyi yüksek iken, comet düzeyi daha düşüktür ancak bu yükseklik/düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildir. Alkol kullananların serum klotho düzeyleri daha düşük comet düzeyleri ise daha yüksektir.

Vitamin takviyesi alan ve almayanların hem serum klotho hem de comet düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Kimyasal maruziyeti olan hastaların serum klotho düzeyleri daha yüksek ve %90 güvenle istatistiksel olarak maruziyet olan ve olmayan hastalar arasında farklılık vardır. Comet düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmasa da maruziyeti olanların düzeyleri daha düşüktür. Sık sık/her zaman psikolojik stres olanların serum klotho hem düzeyleri nadiren olanlara göre daha yüksek, comet düzeyleri ise değişmemektedir. Hem serum klotho hem de comet düzeylerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

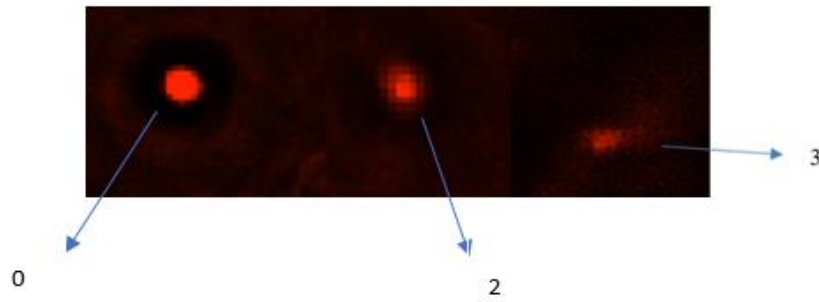
Ailede genetik hastalık olanların serum klotho hem düzeyleri daha yüksektir. Comet düzeyleri ise olmayanlarla benzerdir. Her iki grup arasında da bu düzeylere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Egzersiz yapanların serum klotho hem düzeyleri yapmayanlara göre daha yüksek comet düzeyleri ise birbirine yakındır. Ancak her iki düzeye göre de gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır



ŞEKİL4.1: Kümüls hücreleri cometışmaları bilgisayar görüntü analizi-I (kuyruktaki DNA yüzdesi),CometScore (TriTek 2.0) yazılımı kullanılarak analiz edildi.



ŞEKİL4.2: Kümüls hücreleri cometışmaları bilgisayar görüntü analizi -II (kuyruktaki DNA yüzdesi),CometScore (TriTek 2.0) yazılımı kullanılarak analiz edildi.



5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Infertilite; tıbbi, psikolojik, psikiyatrik, sosyal ve ailesel sorunlar getiren, kültürel, dini ve sınıf yönlerine sahip olan, çiftleri beklenmedik stres faktörleriyle karşılaştıran, cinsellik ile ilgili bir başarısızlık ve yetersizlik duygusu hissetmesine neden olan zorlu bir süreçtir (Hocaoğlu ve Sezgin,2014).

IVF tedavisi, infertilite sorunu yaşayan çiftler için önemli bir tedavi yöntemidir. Ancak, tedavi süreci üreme hormonları, oksidatif stres ve inflamasyon gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Bu tedavi, yumurta toplama, dölleme ve embriyo transferini içeren bir dizi prosedürden oluşmaktadır. IVF tedavisinde, yumurta hücreleriyle birlikte kümülüs hücreleri de toplanmaktadır (Zhuo ve Kimata,2001). Kümülüs hücreleri ve oositler arasında kurulan çift yönlü iletişim oosit canlılığı için gereklidir. Bu iletişimin boşluk bağlantılarında herhangi bir bozulma,oositin hücre içi ATP'sini azaltmaktadır. Kümülüs hücrelerinin oosit enerji seviyelerinin korunması IVF tedavisinde önemli bir faktör olarak görülmektedir (vonMengden vd., 2020). Bu nedenle kümülüs hücreleri, oositi çevreleyen, oositin kalitesi ile ilgili biyolojik belirteç olarak kabul edilmekte ve invaziv olmayan bir değerlendirme aracı olarak gösterilmektedir (Uyar vd.,2013).

Kümülüs hücrelerindeki DNA hasarı doğal olarak oluşabileceği gibi, IVF süreci sırasında yapılan manipölasyonlardan da kaynaklanabilmektedir (Sinkó vd.,2005). Endometriozis ile ilişkili ROS'un oositlerde DNA hasarı oluşturarak oosit olgunlaşmasını bozabileceği ve potansiyel olarak da doğurganlığın azalmasına neden olabileceği bilinmektedir (Raman vd.,2001). Kümülüs hücrelerindeki DNA hasarının belirlenmesi birçok infertilite durumunun nedenlerini anlamak ve tedavi yaklaşımlarını geliştirmek için önemlidir (Bongkoch vd.,2021).

Çalışmamızda fertil-infertil endometriozis olan hastaların toplam comet düzeyleri arasındaki anlamlı olmayan fark, infertil hastaların kimyasal maruziyetlerinin ve alkol kullanımının az olmasından kaynaklanabilir. Raman ve diğerlerinin kümülüs hücrelerindeki DNA hasarını comet assay yöntemi ile belirleyerek, ICSI ile oosit kalitesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir çalışmada kümülüs hücrelerindeki kuyruk momenti ile ICSI sonrası fertilizasyon yüzdesi arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır (Raman vd.,2001). Comet assay gibi tekniklerde; DNA kuyruk momenti, DNA tail %'si gibi parametreler, DNA hasarının

farklı yönlerini (boyutunu,yoğunluğunu) değerlendirmek için kullanılmaktadır (Gajski vd.,2020). İnfertil hastalarımızdaki kuyruktail %'nin yüksek bulunması, infertil endometriozis hastaların kümülüs hücrelerinde DNA hasarının olduğunu göstermektedir. Diaz ve diğerlerinin yaptığı çalışmada ise infertiliteye bağlı olarak endometriozisli hastaların kümülüs hücrelerindeki apoptotik oranlarında artış olduğu gösterilmektedir (Díaz-Fontdevila vd., 2009). Bu çalışmaların sonuçları bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Antioksidanlar oositleri ROS kaynaklı hücresel hasardan korumaktadır. Klotho yaşlanma sürecinde önemli rol oynayan bir protein olup antioksidan ve anti-inflamatuar etkileriyle bilinmektedir. Bu protein yaşlanma süreçleri, üreme organları ve hormonlarla ilişkilidir (Piątek vd.,2016). Son yıllarda klotho proteinin üreme sistemi üzerine etkileri araştırılmaktadır. Klotho proteininin kadın üreme sistemi üzerindeki olası etkilerini inceleyen birkaç çalışma mevcuttur. 2021 yılında PKOS hastalarında yapılan bir çalışmada,hastaların serum klotho düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı görülmektedir (Bıyıkvd.,2021). Bizim çalışma grubumuzda da aynı bulguların görülmesi, kadın üreme sistemi hastalıklarında serum klotho düzeylerinin önemli bir veri olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu mekanizmanın aydınlatılması için farklı üreme sistemi hastalıklarında ve daha geniş çalışma gruplarından elde edilecek verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Serum klotho düzeylerinin PKOS'un önemli öngörücüleri ve tanısal belirteçleri olarak hizmet edebileceği düşünülmektedir (Bednarska vd.,2020). Xu ve diğerlerinin azalmış yumurtalık rezervi olan hastalarla yaptığı çalışmada da klotho ekspresyonu ile bu hastalık arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Azalmış yumurtalık rezervi olan kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerinde ve serumda, klotho ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

İnfertil endometriozis hastalarında serum klotho seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu ilk kez bu çalışmada belirledik. Klothonun kadın üreme sistemi ile ilgili yapılan bu çalışmalar bizim bulgularımızı desteklemektedir. İnfertil endometriozis hastalarda belirlenen düşük serum klotho seviyeleri, infertilite riskini artırabilirken, kümülüs hücrelerindeki yüksek DNA hasarının hastaların infertil olmasına katkıda bulunmuş olabilir (Bıyık vd.,2021; Xu vd., 2020).

Klotho proteininin antioksidan özellikleri sonucu DNA hasarını azaltarak doğurganlık üzerinde pozitif bir etki yaptığı bildirilmektedir (Bıyık vd.,2021; Xu vd., 2020). Yapılan çalışma sonuçları,klotho proteininin oksidatif stresi modüle ederek, yumurtalık doku kriyoprezervasyonunda koruyucu olabileceğini göstermektedir (Kim vd.,2021).

Bununla birlikte klotho proteininin tüp bebek tedavisiyle ilişkisi tam olarak anlaşılmamıştır ve mekanizmalar hala net değildir. Bu nedenle kadın üreme sistemi hastalıklarında kümülüs hücrelerindeki DNA hasarının ve serum klotho düzeylerinin belirlenmesine ilişkin daha çok veriye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda yapılacak olan çalışmalar infertilite tedavisinde klotho proteininin rolünü anlamamıza ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

IVF tedavisi sırasında yaşanan stres DNA hasarını daha fazla arttırmaktadır. Ancak psikolojik stresin oosit ve kümülüs hücrelerindeki üreme değişiklikleri tam olarak tanımlanmamıştır. Kadınlarda kronik stresin östrus döngüsünde değişikliklere neden olduğu, oositin in vivo olgunlaşmasını azalttığı ve anormal oosit yüzdesini arttırdığı gösterilmiştir. 2023 yılında dişi sıçanlarda yapılan çalışmada, stresin kortikosteron serum seviyelerinin artırdığı in vitro olgunlaşmış oositlerin yüzdesinin azalttığı ve kümülüs hücrelerinde DNA'larında hasarına neden olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular stres ve infertilite arasındaki ilişkiyi kısmen açıklayabilir (Casillas vd.,2023). Bizim çalışmamızda da 1. IVF denemesindeki hastaların kümülüs comet düzeylerinin diğer iki gruba göre yüksek olması, ayrıca serum klotho değerinin düşük olması ilk tedavide olan hastaların daha büyük stres altında olduklarını göstermektedir. Bu bulgular bahsi geçen sıçanlarda yapılan çalışmayla desteklenmektedir.

Son çalışmalar diğer çevresel toksik maddelerin (ftalatlar, bisfenol A veya organoklorlu kirleticiler gibi) endometriozis gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir (Buck Louis vd.,2013). Ayrıca poliklorlu bifeniller gibi çevresel kirteticilerin periton sıvısında bulanabileceği ve endometriozise yol açan oksidatif stresi indüklediği rapor edilmektedir (Heilier vd., 2008; Porpora vd.,2006).

Endokrin bozucu etkileri olan bazı çevresel kirteticilerin (Perfloroalkil, polifloroalkil, poliklorlubifeniller,dioksin) oksidatif strese neden olarak endometriozisin patogeneze katkıda bulunabileceği ve bazı kirleticilerin

(perfloroalkil ve polifloroalkil) serum klotho seviyeleri arasında negatif bir ilişki olabileceği rapor edilmektedir (Lin vd.,2020).

Ancak bizim çalışmamızda infertil hastalarda kimyasal maruziyeti fazla olan bireylerin serum klotho seviyelerinin yüksek olması, çalışma grubumuzdaki infertil hastaların çoğunluğunun genç olmasından (33 yaş ve altı) kaynaklanabilir (Parazzini vd., 2017).

Bıyık ve arkadaşlarının yaptığı prospektif vaka kontrol çalışmasında, 19-33 yaş arası PKOS'lu kadınların serum klotho düzeyleri hastaların demografik verileri ile ilişkilendirdi. Hastaların yaşı ve BMI değerleri ile klotho seviyeleri arasında anlamlı olmayan pozitif bir ilişki belirlendi (Bıyık vd.,2021). Bu bulgular da bizim çalışmamızı desteklemektedir

Alkol ve sigara kullanımının yaşlanma sürecini hızlandığı, mortalite ve morbidite riskini arttırdığı bilinmektedir. Alkol tüketiminin serum klotho seviyeleri üzerine etkisi konusundaki bilgilerin sınırlı olduğu görülmektedir. Orta yaşlı kadın popülasyonunda yapılan bir çalışma da alkollü içecek tüketimi ile klotho plazma düzeyleri arasında negatif bir ilişki olduğu görülmektedir (Jurado-Fasolivd., 2018). Bizim çalışmamızda alkol kullanan infertil endometriozis grubunda; comet düzeylerinde anlamlı olmayan bir artış görülürken serum klotho düzeylerinde ise anlamlı olmayan düşüş belirlenmesi bireyler arasındaki farklı enzim düzeyleri ve farklı antioksidan kapasitesinden kaynaklanabilir (Bıyık vd., 2021). Bu konun netleşmesi için daha büyük popülasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

2014 yılında yapılan bir meta-analiz çalışmasında ağır, orta ve hafif derecede sigara içenler ile endometriozis riski arasında bir fark bulunmamıştır (Bravi vd.,2014). Bu veriler çalışmamızdaki infertil endomentriozis hastalar ile fertil grup arasında sigara kullanımı konusundaki anlamlı olmayan ilişkiyi desteklemektedir.

Sonuç olarak infertilendometriozis hastalarında belirlenen serum klotho düzeylerinin kümülüs hücrelerini oksidatif stresten kısmen koruyabileceğini düşündürmektedir. Endometriozis kaynaklı infertilite sorunlarının daha iyi anlaşılabilmesi için daha büyük çalışma gruplarına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılacak çalışmalardan elde edilecek sonuçlar yardımcı üreme tekniklerinde uygulanan rutin analizlerin yanı sıra infertil endometriozis hastalarının IVF tedavi süreçlerinin aydınlatılmasına da kolaylık sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>

Ahmed, T. A., Ahmed, S. M., El-Gammal, Z., Shouman, S., Ahmed, A., Mansour, R., El-Badri, N. (2020). Oocyte Aging: The Role of Cellular and Environmental Factors and Impact on Female Fertility. *Advances in experimental medicine and biology*, 1247, 109–123. https://doi.org/10.1007/5584_2019_456

Albertini, D. F., Combelles, C. M., Benecchi, E., Carabatsos, M. J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(5), 647–653. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210647>

Al-Saleh, I., Coskun, S., Al-Rouqi, R., Al-Rajudi, T., Eltabache, C., Abduljabbar, M., Al-Hassan, S. (2021). Oxidative stress and DNA damage status in couples undergoing in vitro fertilization treatment. *Reproduction fertility*, 2(2), 117–139. <https://doi.org/10.1530/RAF-20-0062>

Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., Rafieian-Kopaei, M. (2017). The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(5), IE01–IE05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23927.9886>

Bednarska, S., Fryczak, J., Siejka, A. (2020). Serum β -Klotho concentrations are increased in women with polycystic ovary syndrome. *Cytokine*, 134, 155188. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155188> Biyik, I., Erten, O., Isiklar, O. O., Ince, O., Soysal, C., Berikten, D., Mammadli, S.,

Oztas, E. (2021). Comparison of serum human Klotho levels and thiol/disulfide homeostasis in women with polycystic ovary syndrome and in healthy women. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 60(3), 487–491. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2021.03.017>

Bravi, F., Parazzini, F., Cipriani, S., Chiaffarino, F., Ricci, E., Chiantera, V., Viganò, P., & La Vecchia, C. (2014). Tobacco smoking and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 4(12), e006325. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006325>

Broughton, D. E., Moley, K. H. (2017). Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertility and sterility*, 107(4), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.017>

Buck Louis, G. M., Peterson, C. M., Chen, Z., Croughan, M., Sundaram, R., Stanford, J., Varner, M. W., Kennedy, A., Giudice, L., Fujimoto, V. Y., Sun, L., Wang, L., Guo, Y., Kannan, K. (2013). Bisphenol A and phthalates and endometriosis: the Endometriosis: Natural History, Diagnosis and Outcomes Study. *Fertility and sterility*, 100(1), 162–9.e92. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.026>

Bulletti, C., Coccia, M. E., Battistoni, S., Borini, A. (2010). Endometriosis and infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(8), 441–447.<https://doi.org/10.1007/s10815-010-9436-1>

Cabler, S., Agarwal, A., Flint, M., du Plessis, S. S. (2010). Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian journal of andrology*, 12(4), 480–489.<https://doi.org/10.1038/aja.2010.38>

Carreras-Badosa, G., Puerto-Carranza, E., Mas-Parés, B., Gómez-Vilarrubla, A., Gómez-Herrera, B., Díaz-Roldán, F., Riera-Pérez, E., de Zegher, F., Ibañez, L., Bassols, J., López-Bermejo, A. (2023). Higher levels of serum α -Klotho are longitudinally associated with less central obesity in girls experiencing weight gain. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1218949.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1218949>

Carvalho, L. F., Samadder, A. N., Agarwal, A., Fernandes, L. F., Abrão, M. S. (2012). Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. *Archives of gynecology and obstetrics*, 286(4), 1033–1040.
<https://doi.org/10.1007/s00404-012-2439-7>

Casillas, F., Betancourt, M., Juárez-Rojas, L., Ducolomb, Y., López, A., Ávila-Quintero, A., Zamora, J., Ommati, M. M., Retana-Márquez, S. (2021). Chronic Stress Detrimentally Affects In Vivo Maturation in Rat Oocytes and Oocyte Viability at All Phases of the Estrous Cycle. *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(9), 2478.
<https://doi.org/10.3390/ani11092478>

Clower, L., Fleshman, T., Geldenhuys, W. J., Santanam, N. (2022). Targeting Oxidative Stress Involved in Endometriosis and Its Pain. *Biomolecules*, 12(8), 1055.
<https://doi.org/10.3390/biom12081055>

Collins A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249–261.
<https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

Da Broi, M. G., Giorgi, V. S. I., Wang, F., Keefe, D. L., Albertini, D., Navarro, P. A. (2018). Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(5), 735–751.
<https://doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>

Dattilo, M., D.; Amato, G., Caroppo, E., Ménéz, Y. (2016). Improvement of gamete quality by stimulating and feeding the endogenous antioxidant system: mechanisms, clinical results, insights on gene-environment interactions and the role of diet. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(12), 1633–1648.
<https://doi.org/10.1007/s10815-016-0767-4>

Devine, P. J., Perreault, S. D., Luderer, U. (2012). Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biology of reproduction*, 86(2), 27.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095224>

Díaz-Fontdevila, M., Pommer, R., Smith, R. (2009). Cumulus cell apoptosis changes with exposure to spermatozoa and pathologies involved in infertility. *Fertility and sterility*, 91(5 Suppl), 2061–2068. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.073>

Dohle G. R. (2010). Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*, 17(4), 327–331. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2010.02484.x>

Domínguez F. (2018). Search for new molecular biomarkers to diagnose endometriosis continues. *Fertility and sterility*, 109(4), 615–616. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.12.018>

Faddy M. J. (2000). Follicle dynamics during ovarian ageing. *Molecular and cellular endocrinology*, 163(1-2), 43–48. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00238-5](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00238-5)

Fleming, T. P., Kwong, W. Y., Porter, R., Ursell, E., Fesenko, I., Wilkins, A., Miller, D. J., Watkins, A. J., Eckert, J. J. (2004). The embryo and its future. *Biology of reproduction*, 71(4), 1046–1054. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030957>

Gajski, G., Gerić, M., Živković Semren, T., Tariba Lovaković, B., Oreščanin, V., Pizent, A. (2020). Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage from frozen human whole blood samples: Implications for human biomonitoring. *Toxicology letters*, 319, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.11.010>

Gilchrist, R. B., Nayudu, P. L., Hodges, J. K. (1997). Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes in vitro. *Biology of reproduction*, 56(1), 238–246. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.1.238>

Giudice, L. C., Kao, L. C. (2004). Endometriosis. *Lancet* (London, England), 364(9447), 1789–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17403-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17403-5)

Guo, D., Li, S., Behr, B., Eisenberg, M. L. (2017). Hypertension and Male Fertility. *The world journal of men's health*, 35(2), 59–64. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2017.35.2.59>

Guo, Y., Zhuang, X., Huang, Z., Zou, J., Yang, D., Hu, X., Du, Z., Wang, L., Liao, X. (2018). Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF-κB-mediated inflammation both in vitro and in vivo. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(1), 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.029>

Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., Reshi, M. S. (2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, 11(3), 552. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>

Hamet, P., Tremblay, J. (2003). Genes of aging. *Metabolism: clinical and experimental*, 52(10 Suppl 2), 5–9. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(03\)00294-4](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(03)00294-4)

Heilier, J. F., Donnez, J., Lison, D. (2008). Organochlorines and endometriosis: a mini-review. *Chemosphere*, 71(2),203–210. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.044>

Homer H. A. (2020). The Role of Oocyte Quality in Explaining “Unexplained” Infertility. *Seminars in reproductive medicine*, 38(1), 21–28. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721377>

Hou, X., Zhu, S., Zhang, H., Li, C., Qiu, D., Ge, J., Guo, X., Wang, Q. (2019). Mitofusin1 in oocyte is essential for female fertility. *Redox biology*, 21, 101110. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101110>

Hu, M. C., Shiizaki, K., Kuro-o, M., Moe, O. W. (2013). Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annual review of physiology*, 75, 503–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183727>

Hyttel P., Fair T., Callesen H., Greve T., (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle, *Theriogenology*, vol. 47 (pg. 23-32). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6)

Ikushima, M., Rakugi, H., Ishikawa, K., Maekawa, Y., Yamamoto, K., Ohta, J., Chihara, Y., Kida, I.; Ogihara, T. (2006). Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 339(3), 827–832. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.094>

Jurado-Fasoli, L., Amaro-Gahete, F. J., De-la-O, A., Gutiérrez, Á., Castillo, M. J. (2019). Alcohol consumption and S-Klotho plasma levels in sedentary healthy middle-aged adults: A cross sectional study. *Drug and alcohol dependence*, 194, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.09.024>.

Kim, B., Yoon, H., Kim, T.,; Lee, S. (2021). Role of Klotho as a Modulator of Oxidative Stress Associated with Ovarian Tissue Cryopreservation. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13547. <https://doi.org/10.3390/ijms222413547>

Kuro-o M. (2008). Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biologicalchemistry*, 389(3), 233–241. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.028>

Kuro-o M. (2011). Klotho and the aging process. *The Korean journal of internal medicine*, 26(2), 113–122. <https://doi.org/10.3904/kjim.2011.26.2.113>

Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R.,; Nabeshima, Y. I. (1997). Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390(6655),45–51. <https://doi.org/10.1038/36285>

Lin, X., Dai, Y., Tong, X., Xu, W., Huang, Q., Jin, X., Li, C., Zhou, F., Zhou, H., Lin, X., Huang, D., Zhang, S. (2020). Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. *Redox biology*, 30, 101431. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101431>

Loichinger, M. H., Towner, D., Thompson, K. S., Ahn, H. J., Bryant-Greenwood, G.D. (2016). Systemic and placental α -klotho: Effects of preeclampsia in the last trimester of gestation. *Placenta*, 41, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.03.004>

Maloney, C. A., Rees, W. D. (2005). Gene-nutrient interactions during fetal development. *Reproduction* (Cambridge, England), 130(4), 401–410. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00523>

Mao, Z., Fan, L., Yu, Q., Luo, S., Wu, X., Tang, J., Kang, G., Tang, L. (2018). Abnormality of Klotho Signaling Is Involved in Polycystic Ovary Syndrome. *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif.), 25(3), 372–383. <https://doi.org/10.1177/1933719117715129>

Marcellin, L., Santulli, P., Gogusev, J., Lesaffre, C., Jacques, S., Chapron, C., Goffinet, F., Vaiman, D.; Méhats, C. (2015). Endometriosis also affects the decidua in contact with the fetal membranes during pregnancy. *Human reproduction* (Oxford, England), 30(2), 392–405. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu321>

Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>

McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Méo, M.P., Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation research*, 288(1), 47–63. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90207-v](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90207-v)

McLeod, B. S., Retzliff, M. G. (2010). Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors. *Clinical obstetrics and gynecology*, 53(2), 389–396. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3181db7bde>

Mehri, S., Levi Setti, P. E., Greco, K., Sakkas, D., Martinez, G., Patrizio, P. (2014). Correlation between follicular diameters and flushing versus no flushing on oocyte maturity, fertilization rate and embryo quality. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(1), 73–77. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0124-9>

Mu, F., Rich-Edwards, J., Rimm, E. B., Spiegelman, D., Missmer, S. A. (2016). Endometriosis and Risk of Coronary Heart Disease. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes*, 9(3), 257–264. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.115.002224>

Neyra, J. A., Hu, M. C. (2017). Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone*, 100, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.017>

Parazzini, F., Chiaffarino, F., Surace, M., Chatenoud, L., Cipriani, S., Chiantera, V., Benzi, G., Fedele, L. (2004). Selected food intake and risk of endometriosis. *Human reproduction* (Oxford, England), 19(8), 1755–1759. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh395>

Peiris, A. N., Chaljub, E., Medlock, D. (2018). Endometriosis. JAMA, 320(24), 2608. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.17953>

Piątek D., Migryt E., Tuzim K., Szydełko J., Czubara A. B., (2016). Klotho Protein Protects Against Aging And Nicotine-Induced Chronic Cellular Stress, New Med, 20(3): 74-77. DOI:10.5604/14270994.1222604

Piché, M. L., Babineau, V., Robitaille, J., Lachance, É., Ruchat, S. M. (2018). Lifestyle-Related Factors Associated with Reproductive Health in Couples Seeking Fertility Treatments: Results of A Pilot Study. International journal of fertility & sterility, 12(1), 19–26. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2018.5135>

Porpora, M. G., Ingelido, A. M., di Domenico, A., Ferro, A., Crobu, M., Pallante, D., Cardelli, M., Cosmi, E. V., De Felip, E. (2006). Increased levels of polychlorobiphenyls in Italian women with endometriosis. Chemosphere, 63(8), 1361–1367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.022>

Prescott, J., Farland, L. V., Tobias, D. K., Gaskins, A. J., Spiegelman, D., Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Barbieri, R. L., Missmer, S. A. (2016). A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. Human reproduction (Oxford, England), 31(7), 1475–1482. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew085>

Raman, R. S., Chan, P. J., Corselli, J. U., Patton, W. C., Jacobson, J. D., Chan, S. R., & King, A. (2001). Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection. Human reproduction (Oxford, England), 16(5), 831–835. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.831>

Rodríguez-Varela, C., Labarta, E. (2020). Clinical Application of Antioxidants to Improve Human Oocyte Mitochondrial Function: A Review. Antioxidants (Basel, Switzerland), 9(12), 1197. <https://doi.org/10.3390/antiox9121197>

Sauer, M. V., Paulson, R. J., Lobo, R. A. (1990). A preliminary report on oocyte donation extending reproductive potential to women over 40. The New England journal of medicine, 323(17), 1157–1160. <https://doi.org/10.1056/NEJM199010253231702>

Sezgin H., Hocaoglu Ç., (2014). İnfertilitenin Psikiyatrik Yönü, Psikiyatri ve Güncel Yaklaşımlar. Current Approaches in Psychiatry; 6(2):165-184. doi:10.5455/cap.20131001091415

Singh, N., Lata, K., Naha, M., Malhotra, N., Tiwari, A., Vanamail, P. (2014). Effect of endometriosis on implantation rates when compared to tubal factor in fresh non donor in vitro fertilization cycles. Journal of human reproductive sciences, 7(2), 143–147. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.138874>

Sinkó, I., Mórocz, M., Zádori, J., Kokavszky, K., Raskó, I. (2005). Effect of cigarette smoking on DNA damage of human cumulus cells analyzed by comet assay. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.), 20(1), 6571. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.12.007>

Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1),126–136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>

Strączyńska, P., Papis, K., Morawiec, E., Czerwiński, M., Gajewski, Z., Olejek, A., Bednarska-Czerwińska, A. (2022). Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. *Reproductive biology and endocrinology:RB&E*, 20(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00906-5>

Takemura, T., Okabe, M. (2016). Serum α -klotho concentrations during preimplantation can predict aging or quality of human oocytes and clinical pregnancy rates. *SpringerPlus*, 5, 53. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1706-7>

Tanbo, T., Fedorcsak, P. (2017). Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 96(6), 659–667. <https://doi.org/10.1111/aogs.13082>

Te Velde, E. R., Pearson, P. L. (2002). The variability of female reproductive ageing. *Human reproduction update*, 8(2), 141–154. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.2.141>

Turathum, B., Gao, E. M., Chian, R. C. (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*, 10(9),2292. <https://doi.org/10.3390/cells10092292>

Turgut, A., Özler, A., Görük, N. Y., Tunc, S. Y., Evliyaoglu, O., & Gül, T. (2013). Copper, ceruloplasmin and oxidative stress in patients with advanced-stage endometriosis. *European review for medical and pharmacological sciences*, 17(11), 1472–1478.

Turkyilmaz, E., Yildirim, M., Cendek, B. D., Baran, P., Alisik, M., Dalgaci, F., Yavuz, A. F. (2016). Evaluation of oxidative stress markers and intra-extracellular antioxidant activities in patients with endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 199, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.02.027>

United Nations Department of Economic And Social Affairs, Population Division (2015). *World Fertility Patterns*.

Upkong, D., Orji, E. (2006). Nijerya'daki Infertil Kadınlarda Ruh Sağlığı [Mental health of infertile women in Nigeria]. *Türk psikiyatri dergisi = Turkish journal of psychiatry*, 17(4), 259–265.

Uyar, A., Torrealday, S., Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*, 99(4), 979–997. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.129>

Vander Borgh, M., Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62,210. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>

Vireque, A. A., Tata, A., Belaz, K. R., Grázia, J. G., Santos, F. N., Arnold, D. R., Basso, A. C., Eberlin, M. N., Silva-de-Sá, M. F., Ferriani, R. A., Sá Rosa-E-Silva, A. C.(2017). MALDI mass spectrometry reveals that cumulus cells modulate the lipid profile of invitro-matured bovine oocytes. *Systems biology in reproductive medicine*, 63(2), 86–99. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1289279>

Von Mengden, L., Klamt, F., Smits, J. (2020). Redox Biology of Human Cumulus Cells: Basic Concepts, Impact on Oocyte Quality, and Potential Clinical Use. *Antioxidants and redox signaling*, 32(8), 522–535. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7984>

Xu, X., Hao, Y., Zhong, Q., Hang, J., Zhao, Y., Qiao, J. (2020). Low KLOTHO level related to aging is associated with diminished ovarian reserve. *Fertility and sterility*, 114(6), 1250–1255. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.06.035>

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>

Zhang, Y., Wang, Y., Feng, X., Zhang, S., Xu, X., Li, L., Niu, S., Bo, Y., Wang, C., Li, Z., Xia, G., Zhang, H. (2021). Oocyte-derived microvilli control female fertility by optimizing ovarian follicle selection in mice. *Nature communications*, 12(1), 2523. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22829-2>

Zhuo, L., Kimata, K. (2001). Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell structure and function*, 26(4), 189–196. <https://doi.org/10.1247/csf.26.189>

Zondervan, K. T., Becker, C. M., Koga, K., Missmer, S. A., Taylor, R. N., Viganò, P., (2018). Endometriosis. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0008-5>

7-EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: 24.11.2022/41

Konu: Selma Yazar Örek'in etik kurul kararı

İLGİLİ MAKAMA

İlgi: 01.11.2022 tarihli yazınız

Koordinatörlüğünü Dr. Öğr. Gör. Selma Yazar Örek'in, yardımcı araştırmacılığını Op. Dr. Erbil Yağmur ve Embriyolog Pınar Horozal'ın üstlendiği "İnfertil Endometriyozis Olgularının Klotho Seviyeleri ve Kümüllüs Hücrelerindeki DNA Hasarlarının Değerlendirilmesi" başlıklı araştırmada yardımcı araştırmacı olarak tez sahibi öğrenci Esra Büşra Durdu'nun da dosya ve kurul onay yazısında bulunması önerisi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 24.11.2022 tarihinde toplanan Üniversitemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet Ünal
İstanbul Yeni-Yüzyıl Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanlığı

EK:
Etik kurul Değerlendirme Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: 09.12.2021/39

Konu: Selma Yazar'ın etik kurul kararı

İLGİLİ MAKAMA

İlgi : 11.11.2021

Sorumlu araştırmacılığını Dr. Öğr. Gör. Selma Yazar, Op. Dr. Erbil Yağmur ve Embriyolog Pınar Erol Horozal'ın yaptığı " İnfertil Endometriozis Olguların Klotho Seviyeleri ve Kümüllüs Hücrelerindeki DNA Hasarlarının Değerlendirilmesi " başlıklı araştırma önerisi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 09.12.2021 tarihinde toplanan Üniversitemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. Gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet Ünal
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanlığı