

**T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN GRANÜLOZA HÜCRESİ MITOKONDRIYON FONKSİYONU İLE**  
**AMH VE ÖSTROJEN İLİŞKİSİ**

**Dr. Deniz Ekin ERBAŞ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**  
**2021**



**T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN GRANÜLOZA HÜCRESİ MİTOKONDRIYON FONKSİYONU İLE**

**AMH VE ÖSTROJEN İLİŞKİSİ**

**Dr. Deniz Ekin ERBAŞ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Lale KARAKOÇ SÖKMENSÜER**

**ANKARA**

**2021**

## TEŞEKKÜR

Eğitim dönemim ve tez çalıőmam sırasında daima bilimsel destek veren, yol gösterici olan ve deneyimlerini aktaran tez danıőmanım Prof. Dr. Lale Karakoç Skmenőer'e,

Tez çalıőmam sırasında engin bilgisi ve ileri grüşlölüğü ile bana yardımcı olan Prof. Dr. Sevdalı Müftüoğlu'na,

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Pergin Atilla, Doç. Dr. Dilara Zeybek, Dr. Öğr. Üyesi Elif Bilgi'e ve eğitimime olduğu kadar tezime çok önemli destekler sunan Prof. Dr. Figen Kaymaz'a,

Tez çalıőmam sürecinde bana çok büyük desteği olan başta Dr. Süleyman Erol ve Dr. Selim Zırh olmak üzere çalışma arkadaşlarım Dr. Sefa Burak am, Dr. Kübra Simay Aydın Akkurt ve Dr. İlker Levent Erdem'e ve kıymetli personelimiz Emrah Tosun'a,

Uzmanlık eğitimim süresince ve hayatım boyunca en büyük destekçilerim olan, beni bugünlere getiren, her daim varlıklarını yanımda hissettiğim annem Cemile Erbaş, babam Mehmet Erbaş ve kardeőim Umut Can Erbaş'a,

Sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Deniz Ekin ERBAŞ, İnsan Granüloza Hücresi Mitokondriyon Fonksiyonu ile AMH ve Östrojen İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2021.** Anti-Müllerian Hormon (AMH) ve östrojen, insan ovaryan folikülogenezinde esansiyel hormonlardır (1). AMH ve östrojeni, granüloza hücreleri üretmektedir. İnsan granüloza hücrelerindeki mitokondriyonların oosit kalitesi için önemli olduğu bilinmektedir (2). Çalışmamızın amacı granüloza hücresi mitokondriyon fonksiyonunun AMH ve östrojen üretimi ile ilişkisini ortaya koymaktır. Çalışmaya dahil edilen infertilite tedavisi gören yirmi kadının folikül sıvılarından granüloza hücreleri izole edilmiştir. Çalışmada insan granüloza hücre hattı HGL5, AMH ve östrojen düzeyleri normal olan hastalara ait granüloza hücreleri ve AMH ve östrojen düzeyleri düşük olan hastalara ait granüloza hücreleri kullanılmıştır. İmmüno Floresan işaretleme (JC-1 katyonik boyası) ile granüloza hücresi mitokondriyonlarının membran potansiyeli ölçülmüştür ve mitokondriyonların morfolojik özellikleri elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak belirlenmiştir. İmmüno Floresan işaretlemelerinde AMH ve östrojen değerleri normal olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının JC-1 değeri, AMH ve östrojen değerleri düşük olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının JC-1 değerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0.016$ ). AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grubun sitoplazmasında C şeklinde, yüzük şeklinde, şapkalı ve şişmiş mitokondriyonlar izlenmiştir. Çalışmamızda mitokondriyon aktivitesi ile serum AMH ve östrojen düzeyi arasında korelasyon bulunmuştur. AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grupta mitokondriyal membran potansiyeli düşük ve mitokondriyon morfolojisi bozuk olarak gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mitokondriyon, Granüloza, AMH, Östrojen, Fertilite

## ABSTRACT

**Deniz Ekin ERBAŞ, Relationship between Human Granulosa Cell Mitochondrial Function and AMH - Estrogen, Hacettepe University School of Medicine, Histology and Embryology Specialty Thesis, Ankara, 2021.** Anti-Müllerian Hormone (AMH) and estrogen are essential hormones in human ovarian folliculogenesis (1). AMH and estrogen are produced by granulosa cells. It is known that mitochondria in human granulosa cells are important for oocyte quality (2). The aim of our study is to reveal the relationship between granulosa cell mitochondrial function and AMH and estrogen production. Granulosa cells were isolated from the follicular fluids of twenty women undergoing infertility treatment included in the study. Human granulosa cell line HGL5, granulosa cells of patients with normal AMH and estrogen levels and granulosa cells of patients with low AMH and estrogen levels were studied in the study. The membrane potential of granulosa cell mitochondria was measured by immunofluorescence labeling (JC-1 cationic dye) and the morphological properties of mitochondria were demonstrated by electron microscopy. Kruskal Wallis and Mann-Whitney U tests were used for statistical analysis. For statistical significance, the total type-1 error level was determined as 5%. In the immunofluorescence labeling, the JC-1 value of the mitochondria of the granulosa cells of women with normal AMH and estrogen values was found to be statistically significantly higher than the JC-1 value of the granulosa cells of the women with low AMH and estrogen levels ( $p < 0.016$ ). C-shaped, ring-shaped, hooded and swollen mitochondria were observed in the cytoplasm of the group with low AMH and estrogen levels. In our study, a correlation was found between mitochondrial activity and serum AMH and E2. In the group with low AMH and E2 levels, it was observed that mitochondrial membrane potential was low and mitochondrial morphology was impaired.

**Keywords:** Mitochondrion, Granulosa, AMH, Estrogen, Fertility

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	4
ÖZET	5
ABSTRACT	6
İÇİNDEKİLER	7
SİMGELER ve KISALTMALAR	9
ŞEKİLLER	10
TABLolar	11
1. GİRİŞ	12
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1. İnfertilite	15
2.2. İnfertilite Epidemiyolojisi	15
2.3. Folikülogenez	15
2.3.1. Primordiyal Folikül Oluşumu	16
2.3.2. Primer ve Pre-antral (Sekonder) Folikül Oluşumu	17
2.3.3. Antral Folikül ve Graaf Folikülü Oluşumu	17
2.4. Folikülogenez'in Hormonal Düzenlenmesi	18
2.4.1. Androjenler	18
2.4.2. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)	19
2.4.3. Anti-Müllerian Hormon (AMH)	19
2.4.4. Östrojen	22
2.5. Granüloza Hücreleri	23
2.6. Mitokondriyon	24
2.6.1. Mitokondriyon ve Oosit	29
2.6.2. Mitokondriyon ve Preimplantasyon Embriyo Gelişimi	30
2.6.3. Mitokondriyal Disfonksiyon	31
2.6.4. Mitofaji	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Etik Kurul İzin Süreci	33
3.2. Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Örneklerin Elde Edilmesi	33
3.2.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hastalar	34
3.2.2. Araştırmaya Alınma Kriterleri	34
3.3. Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu	34

3.4. Besiyerlerinin Hazırlanması-----	35
3.4.1. Komplet DMEM-F12 besiyeri hazırlama -----	35
3.4.2. BIOAMF besiyeri hazırlama -----	35
3.5. Granüloza Hücreleri Pasajlanması-----	35
3.6. Granüloza Hücreleri Sayımı -----	36
3.7. Granüloza Hücrelerinin Dondurulması-----	36
3.8. Dondurulmuş Granüloza Hücrelerinin Çözülmesi -----	37
3.9. Hücre Kültürü -----	37
3.9.1. Primer Granüloza Hücre Kültürü-----	37
3.9.2. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü -----	37
3.10. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Granüloza Hücre Hattında İmmunofloresan İşaretleme -----	38
3.10.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması -----	38
3.10.2. JC-1 Boyama Prosedürü-----	39
3.11. Granüloza Hücreleri Mitokondriyon Morfolojisinin Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi -----	40
3.11.1. TEM için Hücre Takibi-----	40
3.12. İstatistiksel Analiz-----	41
4. BULGULAR -----	43
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri -----	43
4.2. Primer Granüloza Hücre Kültürü -----	46
4.3. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü -----	48
4.4. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Granüloza Hücre Hattında İmmunofloresan İşaretleme -----	49
4.5. Granüloza Hücreleri Mitokondriyon Morfolojisinin Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi -----	54
4.5.1. HGL5 Hücre Hattının Elektron Mikroskobik Özellikleri-----	55
4.5.2. AMH ve Östrojen Düzeyi Normal Olan Grubun Morfolojik Özellikleri-----	57
4.5.3. AMH ve Östrojen Düzeyi Düşük Olan Grubun Morfolojik Özellikleri -----	59
5. TARTIŞMA-----	61
6. SONUÇLAR-----	66
7. KAYNAKLAR-----	67

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>AMH</b>	: Anti-Müllerian hormon
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>İVF</b>	: İn vitro fertilizasyon
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>OXPHOS</b>	: Oksidatif fosforilasyon
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen radikalleri
<b>PGH</b>	: Primordiyal germ hücreleri
<b>GH</b>	: Granüloza hücreleri
<b>FSH</b>	: Folikül uyarıcı hormon
<b>LH</b>	: Lüteinize edici hormon
<b>KOK</b>	: Kümülüs-oosit kompleksi
<b>E2</b>	: Östrodiol
<b>AR</b>	: Androjen reseptörü
<b>FSHR</b>	: Folikül uyarıcı hormon reseptörü
<b>LHR</b>	: Lüteinize edici hormon reseptörü
<b>BMP</b>	: Kemik morfojenik protein
<b>ZP</b>	: Zona pellusida
<b>NADH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit
<b>TEM</b>	: Transmisyon elektron mikroskobu
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>mPT</b>	: Mitokondriyal geçiş poru
<b>MMP</b>	: Mitokondriyal membran potansiyeli
<b>JC-1</b>	: Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
<b>ETZ</b>	: Elektron taşıma zinciri
<b>HGL5</b>	: İnsan lüteinize granüloza hücre hattı-5
<b>GER</b>	: Granüllü endoplazma retikulumu
<b>DER</b>	: Düz (granülsüz) endoplazma retikulumu
<b>FCCP</b>	: Trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone

## ŞEKİLLER

**Şekil 2.1.** Folikülogenezin şematik gösterimi.

**Şekil 2.2.** Serum AMH düzeyinin hastalardaki kullanım alanları.

**Şekil 2.3.** AMH ekspresyonuna etki eden hormonlar ve proteinler.

**Şekil 2.4.** Mitokondriyonun yapısı.

**Şekil 4.1.** AMH ve E2 düzeyi normal olan grubun izole edilen granüloza hücrelerinin 0-3-5-7. gün T25 faz kontrast mikroskobu mikrografları.

**Şekil 4.2.** AMH ve E2 düzeyi düşük olan grubun izole edilen granüloza hücrelerinin 0-3-5-7. gün T25 faz kontrast mikroskobu mikrografları.

**Şekil 4.3.** HGL5 granüloza hücre hattının hücrelerinin 0-3-5-7. gün T25 faz kontrast mikroskobu mikrografları.

**Şekil 4.4.** HGL5 hücre hattının Leica DM 6B ile çekilmiş immünofloresan işaretlemeleri.

**Şekil 4.5.** HGL5 granüloza hücre hattının *in vitro* kültürü sonrasındaki ince kesit görüntüleri ve elektron mikrografları.

**Şekil 4.6.** AMH ve E2 düzeyi normal olan grubun granüloza hücrelerinin *in vitro* kültürü sonrasındaki ince kesit görüntüleri ve elektron mikrografları.

**Şekil 4.7.** AMH ve E2 düzeyi düşük olan grubun granüloza hücrelerinin *in vitro* kültürü sonrasındaki ince kesit görüntüleri.

**Şekil 4.8.** AMH ve E2 düzeyi düşük olan grubun granüloza hücrelerinin *in vitro* kültürü sonrasındaki elektron mikrografları.

## TABLULAR

**Tablo 4.1.** Hastaların yaşlarına ilişkin sayısal veriler.

**Tablo 4.2.** AMH ve E2 değerleri düşük olan grup ile AMH ve E2 değerleri normal olan gruba ait yaşların kutu çizgi grafiği.

**Tablo 4.3.** JC-1 ile yaş arasındaki korelasyon grafiği.

**Tablo 4.4.** AMH ile yaş arasındaki korelasyon grafiği.

**Tablo 4.5.** E2 ile yaş arasındaki korelasyon grafiği.

**Tablo 4.6.** JC-1 boyanmış grup ile JC-1 sonrası FCCP eklenmiş grubun JC-1 immünofloresan yoğunluğu düzeyleri.

**Tablo 4.7.** AMH ve E2 olan düşük grup, AMH ve E2 normal olan grup ve HGL5 granüloza hücre hattının JC-1 immünofloresan yoğunluğu düzeyleri.

**Tablo 4.8.** JC-1 ile AMH arasındaki korelasyon grafiği.

**Tablo 4.9.** AMH ile E2 arasındaki korelasyon grafiği.

## 1. GİRİŞ

Anti-Müllerian Hormon (AMH), dimerik bir glikoproteindir ve “Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )” ailesinin üyesidir (3). AMH’nin Müller kanallarının regresyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir ve cinsiyet farklılaşmasında etkili olduğu tanımlanmıştır. AMH erkeklerde testiste yer alan Sertoli hücreleri tarafından üretilmektedir. AMH’nin kadınlarda ovaryum fonksiyonunda etkili olduğu ve özellikle folikül büyümesinde görev aldığı kanıtlanmıştır (4). AMH, gestasyonel dönemin sonundan itibaren granüloza hücreleri tarafından üretilmeye başlanmaktadır ve menstrual siklusun foliküler fazında, dominant folikül seçiminde potansiyel rolü vardır (5). Antral folikülün granüloza hücrelerinden salınan AMH, serumda ölçülebilmektedir ve AMH düzeyi ovaryumdaki gelişmekte olan foliküllerin sayısı ile orantılıdır (6). AMH, foliküllerin ovulasyon için seçiminde görev almaktadır. Ayrıca AMH’nin foliküler gelişimin erken evrelerinde negatif düzenleyici olarak rolü vardır, büyüme faktörlerinin ve gonadotropinlerin etkilerini sınırlandırarak foliküllerin gelişimini engeller. AMH, granüloza hücrelerinde bulunan aromataz enzimini inhibe eder ve östrojen biyosentezini azaltır (7), İn Vitro Fertilizasyon (İVF) uygulanan kadınlarda ovaryan hormonal uyarıya cevap, gebelik ve canlı doğum oranı gibi klinik sonuçları predikte etmek ve tanı koymak için kullanılmaktadır (8).

Östrojen, üreme çağındaki kadınlarda ovaryumdaki granüloza hücrelerinden salgılanmaktadır ve çeşitli endokrin fonksiyonlara sahiptir. Granüloza hücrelerinde bulunan aromataz enzimi, hücrenin endoplazma retikulumunda bulunmaktadır ve androjenlerden östrojen üretmektedir. Aromatazın esas ekspresyonu, premenapozal kadınlarda ovaryan granüloza hücrelerinden olmaktadır ve serumda ölçülebilir miktarda östrojen olmasına yol açmaktadır. Granüloza hücreleri prekürsör steroidi komşuluğundaki teka hücrelerinden almaktadır (9). İmplantasyon penceresi döneminde hormonal düzenleme gebeliğin oluşabilmesi için önemlidir. Östrojen, menstrual siklusun proliferatif fazında endometriyal kalınlığı sağlamak için epitel hücre proliferasyonunu indükler (10).

Hücreler, yaşamlarını devam ettirebilmek için enerji üretmek zorundadırlar ve bu enerji kaynağı Adenozin Trifosfat (ATP)'tır. ATP üretimi için çeşitli metabolik yollar olmasına rağmen, enerji %88 oranında mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla (OXPHOS) elde edilmektedir (11). Ovulasyon ve fertilizasyon süreçleri için enerji gereklidir. Mitokondriyon, maternal kalıtılan bir organeldir ve enerji sentezi, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) üretimi ve apoptoz kontrolü gibi önemli hücre fonksiyonları vardır. Olgun insan oositi, diğer bütün hücre çeşitlerinden daha fazla mitokondriyon içermektedir. Mitokondriyonun üreme yeteneğini düzenleme konusunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (12). Erken dönem embriyo gelişimi ve implantasyon potansiyeli; mitokondriyal fonksiyon ve aktivite ile korelasyon göstermektedir (12). İnfertil hastalarda oosit ve embriyolardaki yüksek ATP içeriğinin, daha iyi üreme sonuçları ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (13).

Ovaryumdaki foliküller, granüloza hücreleri ve oositten meydana gelmektedir. Granüloza hücreleri aromataz enzimine sahiptir ve bu enzim sayesinde androjenlerden östrojen üretmektedir (9). AMH sentezi de granüloza hücreleri tarafından yapılmaktadır (6). Granüloza hücreleri oosit gelişimi için gerekli mikroçevreyi oluşturur. Granüloza hücrelerindeki mitokondriyonlar, oosit gelişimi ve kompetansı için kritiktir ve oositin ATP üretmesi için gerekli olan piruvatı üretilip oosite vermektedir (14).

AMH ve östrojen, insan ovaryan folikülogenezinde esansiyel hormonlardır (1). AMH ve östrojeni, granüloza hücreleri üretmektedir. İnsan granüloza hücrelerindeki mitokondriyonların oosit kalitesi için önemli olduğu bilinmektedir (2). Granüloza hücre mitokondriyon fonksiyonunun, AMH ve östrojen üretimi ile ilişkisi ileride infertilite ile ilgili çalışmalara ışık tutabilmesi açısından önemlidir. Çalışmamızın amacı granüloza hücresi mitokondriyon fonksiyonunun AMH ve östrojen üretimi ile ilişkisini ortaya koymaktır. Granüloza hücresi mitokondriyon aktivitesinin AMH ve östrojen üretimini etkilediği hipotezini test etmek için, İVF tedavisine başvuran kadınlardan serum AMH ve östrojen değerleri normal olanlar ile serum AMH ve östrojen değerleri düşük olanların folikül sıvılarından primer granüloza hücre kültürü oluşturulmuştur.

Bu iki grubun ve HGL5 granüloza hücrelerinin mitokondriyon aktiviteleri karşılaştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnfertilite

On iki ay boyunca düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen klinik gebelik oluşturma başarısızlığı infertilite olarak tanımlanmaktadır. Subfertilite ve infertilite kavramları birbirleri ile karışabilmektedir (15). Subfertilite, azalmış doğurganlık kapasitesinin çeşitli formları ya da derecelerini belirtmektedir (16). Sterilite ise kalıcı infertilite hali olarak tanımlanmaktadır (15).

İnfertilite, primer ve sekonder olarak kategorize edilmektedir. Primer infertil kadınlar, daha önce gebe kalmamış olanları; sekonder infertil kadınlar ise daha önce gebe kaldığı halde tekrar gebe kalamayanları tanımlamaktadır. Aynı kategorizasyon erkekler için de geçerlidir (15).

### 2.2. İnfertilite Epidemiyolojisi

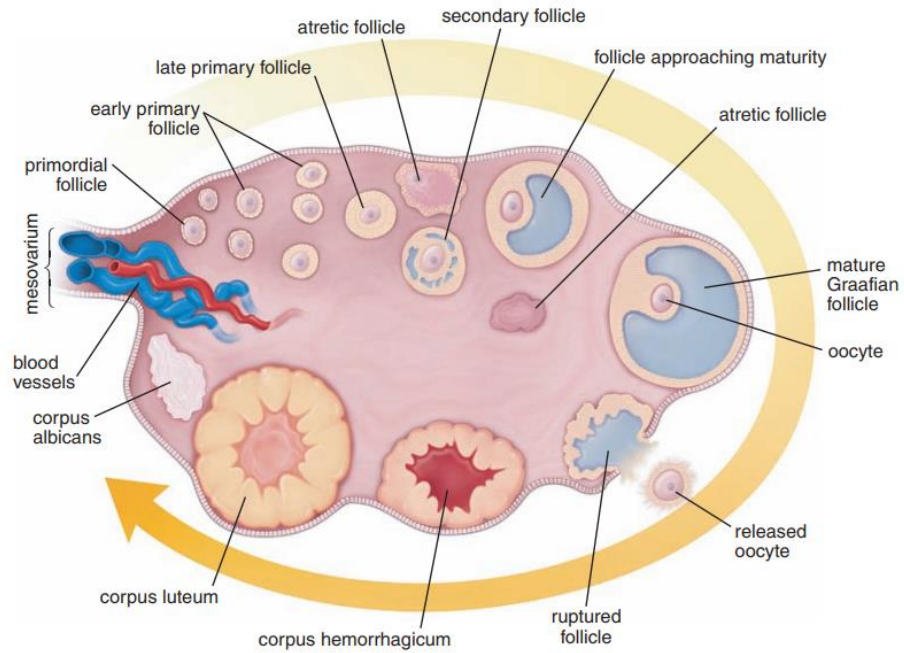
Üreme çağındaki kadınlarda infertilite sıklığı batı ülkelerinde her 7 çiftten 1'i; gelişmekte olan ülkelerde ise her 4 çiftten 1'i olarak bildirilmiştir (17). Erkeklerin ise infertilite vakalarının %20-30'undan sorumlu olduğu tespit edilmiştir (18). Sonuç olarak infertilitenin, dünya genelinde üreme çağındaki çiftleri %8-12 oranında etkilediği düşünülmektedir (19).

### 2.3. Folikülogenez

Her bir folikül, ovaryumun temel fonksiyonel ünitesini temsil eder. Gelişimin ilk aşamasında folikül, oosit ve onu çevreleyen stromal hücrelerden oluşur. Oosit döllenebilmek için büyür ve olgunlaşır. Stromal hücreler çoğalır, farklılaşır ve steroid seks hormonları ile lokal regülatörleri üretirler. Foliküllerin şekillendiği, birçok büyüme aşamasından geçtiği, sonunda olgun oositin serbest kaldığı ve korpus luteuma (KL) dönüştüğü bu sürece folikülogenez adı verilmektedir (20).

Folikülogenez fetal hayatta başlar. İlk olarak primordiyal germ hücreleri (PGH) genital kabartıya göç ederler, bipotansiyel gonadı oluştururlar, sonra da ovaryum ya

da testise farklılaşırlar. Gonaddaki stromal hücrelerin gelişimi, PGH farklılaşmasında kritik rol oynar. Hücre göçü ve farklılaşması ile gonad şekillenmesi meydana gelir (21, 22).



**Şekil 2.1.** Folikülogenezin şematik gösterimi. Primordiyal folikülden olgun foliküle kadar gelişim aşamaları ve ovulasyon sonrası corpus luteum yapısı görülmektedir (22).

### 2.3.1. Primordiyal Folikül Oluşumu

Dişi primordiyal germ hücreleri, proliferasyon olduktan sonra oogonyuma farklılaşırlar. Ancak sitokinez henüz tamamlanmadığı için oogonyumlar kümeler (sinsitya) halinde bulunurlar, birbirleriyle interselüler köprülerle bağlı olup senkronizedirler. Her bir oogonyum, mayozu başlar. Oosit popülasyonu profaz I-diploten evresinde duraklar. Oogonyum kümelerinden, primordiyal foliküller oluşmaya başlar. Her bir primordiyal folikül, oosit ve onu çevreleyen tek katlı yassı

epitelden (pre-granüloza hücreleri) oluşur. Primordiyal foliküllerin çoğu sessiz kalır ve bu uyku durumunda ölür. Hayatta kalanlar ovaryan folikül rezervi ve büyüyen folikül havuzunu oluştururlar. Bu büyüyen foliküllerin büyük bir kısmı dejenerasyona uğrar. Sadece küçük bir kısmı primer foliküle dönüşmek üzere aktive edilir (23).

### **2.3.2. Primer ve Pre-antral (Sekonder) Folikül Oluşumu**

Primer foliküle dönüşüm, granüloza hücrelerinin (GH) morfolojik değişimi ile karakterizedir. GH, yassı pre-granüloza hücrelerinin kübik hücrelere dönüşmesi ile oluşur (23).

Her bir büyüyen oosit, iki ya da üç tabaka GH ile çevrilir. GH etrafında bazal membran oluşur. Folikülü çevreleyen stromal hücreler teka adında yeni bir tabaka oluştururlar. Teka hücreleri, teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki tabakadan meydana gelmektedir. Teka tabakası folikülleri çevreler ve androjen üretir. Androjenler, GH tarafından östrojen üretmek için kullanılır (24).

Pre-antral (sekonder) foliküllerde sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlar (25). Bu büyüme gonadotropinlerden bağımsızdır, oosit ve stromal hücrelerden kaynaklanan lokal sinyallerin çift yönlü iletişimi ile kontrol edilir. Stromal hücreler oosit büyümesi ve gelişimini desteklerken, oosit ise granüloza hücreleri (GH) ve teka hücrelerinin (TH) çoğalma ve farklılaşmasında kritik rol oynar (21, 27).

### **2.3.3. Antral Folikül ve Graaf Folikülü Oluşumu**

Pre-antral foliküllerdeki sıvı dolu kaviteler, birleşip antrumu oluşturur. Antral foliküller, oositi çevreleyen kümülüs granüloza hücreleri ve folikül duvarını döşeyen mural granüloza hücreleri olmak üzere iki GH alt popülasyonu ile karakterizedir (26). Antral foliküllerin çoğu atretik dejenerasyona uğrar (27). Sadece bir kısmı pitüiter gonadotropinlerden Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Lüteinize Edici Hormon (LH)'a yanıt verir (25).

Antral folikülü ilk etkileyen hormon olan FSH; GH'nin hayatta kalmasından ve proliferasyonundan, östrodiol üretiminden ve LH reseptör ekspresyonundan

sorumludur (28). Yüksek konsantrasyonda LH reseptörü eksprese eden antral foliküller, Graaf folikülüne dönüşmek için gonadotropinlere yanıt verirler (29). Preovulatuvar LH piki; Graaf foliküllerini aktive eder. Ovaryumun LH'ya cevabı; oositte mayozun devam etmesi, kümülüsün müsifikasyonu ve genişlemesi, folikül rüptürü, kümülüs-oosit kompleksi (KOK) salınımı şeklinde olmaktadır. Bu olaylar zincirine ise ovulasyon adı verilmektedir. KOK salınıncaya, kalan GH ve TH lüteinizasyonla korpus luteuma farklılaşır (30).

## **2.4. Folikülogenez'in Hormonal Düzenlenmesi**

Folikülogenez pre-antral folikül büyümesi ve antral folikül büyümesi olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Androjenler, FSH, AMH ve Östrodiol (E2); insan ovaryan folikülogenezinde esansiyel hormonlardır (20).

Pre-antral folikül büyümesi gonadotropin-bağımsızdır ve bu süreçte FSH aktiftir ama esansiyel değildir. FSH, folikül büyümesini teka hücreleri kaynaklı androjenler ile destekler. AMH ise FSH'a zıt olarak inhibitör görev yapar (31).

Antral folikül büyümesi ise gonadotropin-bağımlı bir süreçtir ve bu süreçte E2 üretimi, aromatazın FSH-bağımlı aktivasyonu sonucu olur. AMH bu süreçte de inhibitör rol oynar. AMH ekspresyonunun azalması ile aromatazın ekspresyonu artar (31).

### **2.4.1. Androjenler**

Androjenler ovaryumdaki granüloza hücre proliferasyonunu ve preantral folikül gelişimini uyarırlar, foliküler gelişimin sonraki aşamasında ise granüloza hücresi apoptozu indüksiyonu yoluyla folikül gelişimini baskırlar. Androjen reseptörü (AR), ovaryan foliküler gelişimde önemli rol oynar. Androjenlerin hücrel etkileri AR aracılığı ile olmaktadır. AR aktivasyonu ile androjen bağımlı hücre büyümesi ve proliferasyonu gen transkripsiyonu yoluyla düzenlenir. AR sinyalizasyonu ubiquitinasyon, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarla düzenlenmektedir (32).

### 2.4.2. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)

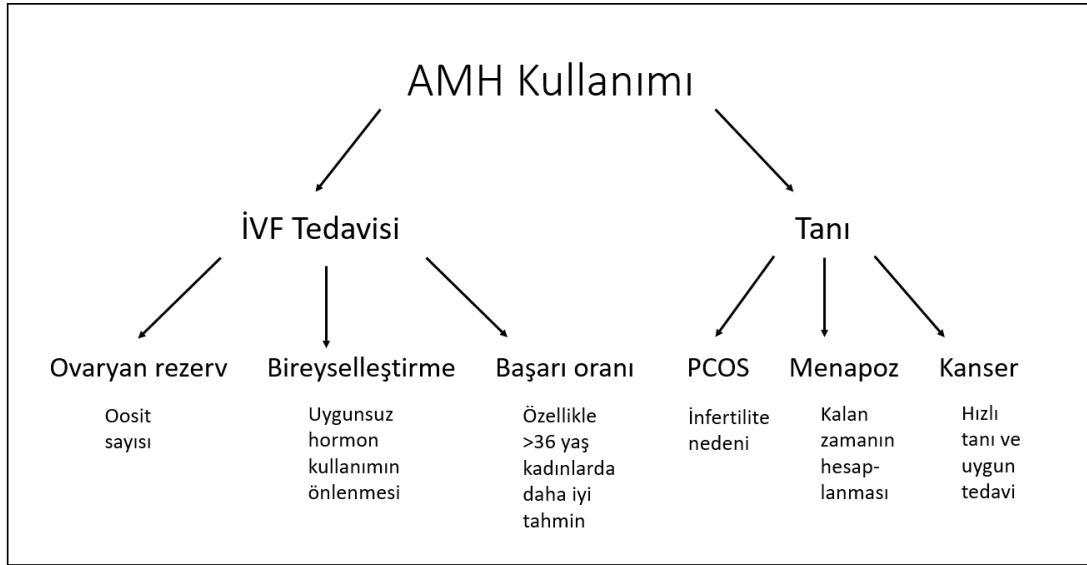
Pre-antral folikül aşamasında granüloza hücreleri, FSH reseptör (FSHR) eksprese etmektedir (33). Foliküler gelişimin pre-antral (sekonder) ve antral folikül aşamalarında FSHR, insan ovaryumunun histolojik kesitlerinde granüloza hücre yüzeyinde tespit edilmiştir (34).

FSH folikül gelişimini androjenler, kit-ligand (stem cell factor), “leukemia inhibiting factor (LIF)” ve “growth differentiation factor-9 (GDF9)” gibi diğer faktörlerle desteklemektedir (20). FSH yokluğunda ise, bazal folikül büyümesi sürecektir ama bu faktörler daha az etkin olacaktır (35).

### 2.4.3. Anti-Müllerian Hormon (AMH)

Anti-Müllerian Hormon (AMH) dimerik bir glikoproteindir ve “Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )” ailesinin üyesidir (3). AMH, 1940 yılında Alfred Jost tarafından keşfedilmiştir. Alfred Jost, AMH’nin Müller kanallarının regresyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir ve cinsiyet farklılaşmasında etkili olduğunu tanımlamıştır. AMH’nin testiste yer alan sertoli hücreleri tarafından üretildiği gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda ise AMH’nin ovaryum fonksiyonunda etkili olduğu ve özellikle folikül büyümesinde görev aldığı kanıtlanmıştır (4). İnsanda AMH, gestasyonel dönemin sonundan itibaren granüloza hücreleri tarafından üretilmeye başlanır ve menstrual siklusun foliküler fazında dominant folikül seçiminde potansiyel rol oynar (5). Antral folikülün granüloza hücrelerinden salınan AMH, serumda ölçülebilmektedir. Serum AMH düzeyi ovaryumda gelişmekte olan foliküllerin sayısı ile orantılıdır (6). AMH düzeyi, ovaryumdaki antral ve pre-antral folikül sayısı ile korelasyon gösterir. İn Vitro Fertilizasyon (İVF)’da ovaryumların hiperstimülasyona cevabını öngörmek için AMH ölçümü yapılmaktadır (36).

AMH hem İVF’te, hem ovaryum hastalıklarının tanısında hem de kanser başta olmak üzere birçok durumda kullanılabilir (37) (Şekil 2.2.).



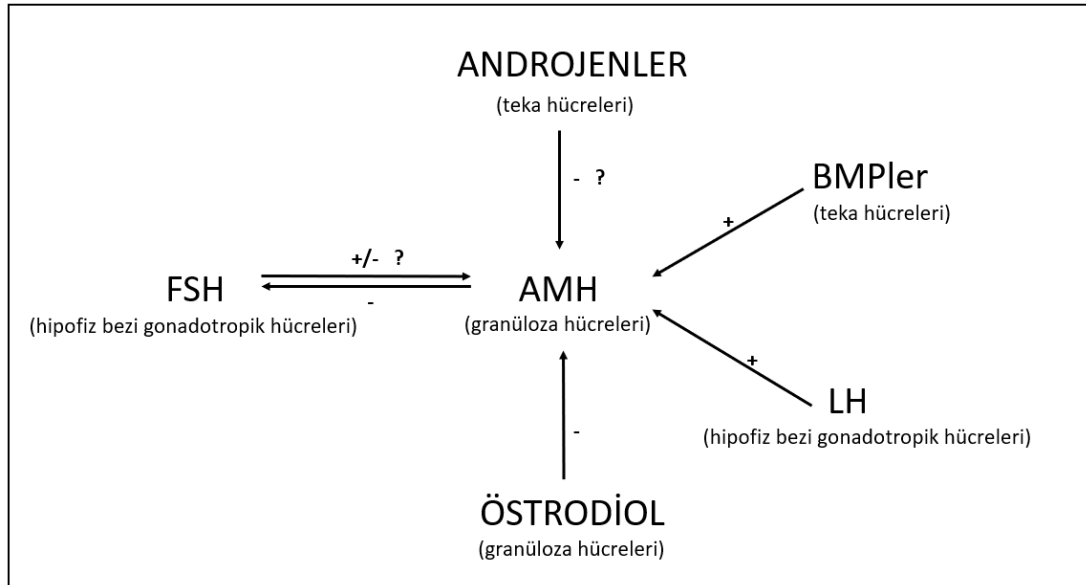
**Şekil 2.2.** Serum AMH düzeyinin hastalardaki kullanım alanları (37).

AMH'nin hedefi olan birçok yapı AMH reseptörü eksprese etmektedir. Bu yapılara örnek olarak Müller kanalları, gonadlar, prostat ve endometriyum verilebilir. Ayrıca sertoli hücreleri, leydig hücreleri, teka ve granüloza hücreleri, meme bezinin duktal epitel de AMH reseptörü eksprese etmektedir (38).

İnsanda serum AMH düzeyi 24,5 yaşına kadar artmakta iken daha sonra menapoza kadar düzeyi düşmektedir. Menapozdan sonra ise AMH ekspresyonu belirgin olarak düşmekte ve AMH serumda saptanamamaktadır (39).

AMH, gelişen foliküllerin sayısını belirlemede ve foliküllerin ovulasyon için seçiminde görev almaktadır. AMH'nin foliküler gelişimin erken evrelerinde negatif düzenleyici olarak da rolü vardır. AMH, büyüme faktörlerinin ve gonadotropinlerin etkilerini sınırlandırarak foliküllerin gelişimini inhibe eder, granüloza hücrelerinde bulunan aromataz enzimini inhibe eder ve östrojen biyosentezini azaltır (7). AMH, testislerde öncül hücrelerin olgun leydig hücrelerine farklılaşmasını engeller ve steroidojenik enzimlerin ekspresyonunu inhibe eder (39).

Ovaryan granüloza hücrelerindeki AMH ekspresyonuna çeşitli hormonlar ve proteinler etki etmektedir (37) (Şekil 2.3.).



**Şekil 2.3.** AMH ekspresyonuna etki eden hormonlar ve proteinler (37).

AMH, İVF uygulanan kadınlarda klinik sonuçları tahmin etmek ve tanı koymak için kullanılmaktadır. Ovarian hormonal uyarıya cevapta, gebelik ve canlı doğum oranı tahmininde AMH önemlidir. Serum AMH düzeyi düşük olanlarda (<1ng/ml), daha yüksek olanlara göre (1-4ng/ml) canlı doğum oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir (40).

AMH, gonadotropin-bağımsız folikül gelişiminde rol almaktadır. AMH sekresyonu insanda antral evrede maksimumdur. Folikül, FSH-bağımlı siklik seçilim sürecine (FSH-dependent cyclic recruitment process) başladığında AMH salgılanması azalır (41). AMH'ın folikülogenezde primordiyal folikülden primer foliküle geçişin inhibisyonu ve FSH-bağımlı siklik seçilimin inhibisyonu olmak üzere iki önemli görevi olduğu düşünülmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmada, AMH geni susturulmuş (*AMH -/-*) farelerde, her aşamadaki foliküllerde sayısal olarak belirgin artış gözlenmiştir. (*AMH -/-*) fare folikülleri içeren hücre kültüründe folikül büyümesi FSH varlığında bile yavaşlamıştır. Bu, FSH bağımlı-GH proliferasyonunda, AMH'ın inhibe edici etkisini göstermektedir (42).

Yapılan çalışmalarda, foliküllerde Lüteinize Edici Hormon Reseptör (LHR) ekspresyonu ile foliküler sıvı AMH düzeyleri arasında ters ilişki gözlenmiştir. Bu da AMH'nin siklusu inhibe ettiği sonucunu desteklemektedir (43).

#### 2.4.4. Östrojen

Östrojen, kadınlarda ve erkeklerde hem üreme fonksiyonları için hem de nöroendokrin sistem, vasküler sistem, iskelet sistemi ve immün sistem için önemli bir hormondur (44). Üç çeşit östrojen formu bulunmaktadır. Bunlar östron (E1), östrodiol (E2) ve östriol (E3)'dür. Fizyolojik olarak en etkin olanı östrodioldür (E2) ve östrojen reseptörleri olan ER $\alpha$  ve ER $\beta$ 'ya en yüksek afinitesi olan formdur. Östron (E1) ve östriol (E3), östradiolden (E2) sentezlenmektedir (45).

Östrodiol (E2), üreme çağındaki kadınlarda ovaryumdaki granüloza hücrelerinden (GH) salgılanmaktadır ve endokrin olarak çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Östrojenin fizyolojik fonksiyonları sekonder seksüel karakteristik özelliklerin gelişimi, ovulasyon için gonadotropinlerin sekresyonunun düzenlenmesi, dokuların progesteron cevabına hazırlanması, kemik kütlelerinin korunması, lipoproteinlerin sentezinin düzenlenmesi, ürogenital atrofinin önlenmesi, insülin cevabının düzenlenmesi ve kognitif fonksiyonların korunmasıdır (9).

Aromataz enzimi, granüloza hücrelerinin endoplazma retikulumunda bulunmaktadır ve androjenlerden östrojen üretmektedir. Granüloza hücreleri, androjeni komşuluğundaki teka hücrelerinden almaktadır. Aromatazın esas ekspresyonu, premenapozal kadınlarda ovaryan granüloza hücrelerinden olmaktadır ve serumda ölçülebilir miktarda östrojen olmasına yol açmaktadır (9).

Aromataz, büyüyen foliküllerde fetal GH tarafından eksprese edilir. Aromataz ekspresyonu neonatal döneme kadar artar. Çocukluk çağına gelindiğinde sadece büyük antral foliküllerde bulunmaktadır (46). Post-natal dönemdeki artmış aromataz ekspresyonu, gonadotropin ve kısmi olarak FSH bağımlıdır (47) ancak steroidogenez sadece post-pubertal periyotta gerçekleştiği için plazma E2 düzeyi artmaz. Aromataz

ekspresyonu post-pubertal dönemden itibaren büyük antral foliküllerde ve pre-ovulatuvar foliküllerde artar (46).

Başarılı bir gebelik ve implantasyonda blastokist invazyonu için reseptif ve desidualizasyona hazır bir endometriyuma ihtiyaç vardır. Endometriyum embriyoyu kabul etmek, implantasyon ve desidualizasyon için kritik öneme sahiptir. İmplantasyon penceresi döneminde hormonal düzenleme, gebeliğin oluşabilmesi için önemlidir. Östrodiol (E2), menstrual siklusun proliferatif fazında endometriyumun kalınlaşmasını sağlamak için epitel hücre proliferasyonunu indükler (10). Premenapozal dönemdeki kadınlarda E2 normal değeri “15-350 pg/ml” aralığında olmalıdır (48). Serum E2 düzeyi yaşla azalmaktadır (49).

Daha önceki *in vivo* çalışmalara göre E2, AMH’ın ekspresyonunu baskılamaktadır. Pubertal geçişte, gonadotropin artışı E2 artışı ile birliktelik göstermektedir. Bu E2 artışı sonucu AMH düzeyinde azalma meydana gelmektedir (50). İVF çalışmalarında; hCG (human chorionic gonadotropin) tarafından tetiklenme gününde, AMH ve E2 arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. AMH düzeyinde belirgin düşüş gözlenmiştir (51).

Pre-antral folikül aşamasına kadar, E2 yokluğunda AMH ekspresyonu maksimum düzeydedir. Granüloza hücrelerinde, FSH’nin ve Kemik Morfojenik Protein (BMP)” gibi büyüme faktörlerinin etkisi ile süreç androjenlerin etkisi altındadır (37). Foliküler büyüme boyunca androjenlerin etkisi azalır ve E2 üretimi artar. Bunun sonucunda AMH supresyonu başlar, E2 kontrolü devralır ve FSH reseptörü (FSHR) ekspresyonunu arttırıp LH reseptörü (LHR) oluşumunu sağlayarak folikülleri seçilmeye uygun hale getirir (43).

## 2.5. Granüloza Hücresi

Oogenezin erken dönemlerinde, primer oositler granüloza hücrelerinden oluşan bir tabaka ile çevrilidir. Folikülogenez sırasında oosit büyümesine, granüloza hücresi çoğalması ve farklılaşması eşlik eder. Antral folikül aşamasında, granüloza hücreleri farklı fenotiplere sahip “Kümülüs granüloza hücreleri (KGH)” ve “Mural

granüloza hücreleri (MGH)" olmak üzere iki ayrı gruba farklılaşır. Kümülüs granüloza hücreleri oosite yakın seyreder ve oosit büyümesi ile olgunlaşmasından sorumludur. Mural granüloza hücreleri ise steroidojenik aktivede önemlidir (52).

Granüloza hücreleri aromataz enzimine sahiptir. Bu enzim sayesinde androjenlerden östrojen üretmektedir (9). Anti-Müllerian Hormon (AMH) sentezi de granüloza hücreleri tarafından yapılmaktadır (6).

Granüloza hücreleri ve oosit arasında Zona Pellusida (ZP)'da sitoplazmik projeksiyonlar aracılı oluklu bağlantılar (gap-junctionlar) bulunmaktadır. Bu oluklu bağlantılar LH pikine kadar gözlemlenmektedir. Ovaryumda foliküllerde oosit kompetansı, oosit ve granüloza hücreleri arasındaki bu iki yönlü iletişime bağlıdır (53). Oosit-kümülüs kompleksi bağlantıları karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasını yönetir. Mayoza devam edip fertilizasyona giden oosit için ve erken embriyogenez dönemini desteklemek için gerekli olan enerji bu şekilde elde edilir (54).

Granüloza hücreleri oosit gelişimi için gerekli mikroçevreyi oluştururlar (55). GH, kan dolaşımından aldıkları glikozu piruvata metabolize ederler ve bu piruvatı oosite verirler. Oosit aldığı piruvattan, oksidatif fosforilasyon ile ATP elde eder (56). Oosit, GH'deki glikolitik anahtar genlerin ekspresyonunu indükleyerek glikolizi düzenler (57). Oosit-kümülüs kompleksinde lipidlerin  $\beta$ -oksidasyonu yoluyla mayozun devamı (58) ve aminoasit dönüşümü için gerekli olan ATP üretimi gerçekleşir (57). Granüloza hücreleri ve oosit mitokondriyonu, bu metabolik yolların esas ajanlarıdır ve oogeneze süresince oosit kompetansı ile direk ilişkilidir (57).

## 2.6. Mitokondriyon

Mitokondriyonlar; oksidatif fosforilasyon yoluyla hücresel enerji üreten ve kalsiyum homeostazı (59), hücre haberleşmesi, apoptoz (60) gibi önemli hücresel olaylarda rol alan multifonksiyonel sitoplazmik organellerdir (62, 63).

Hücreler, yaşamlarını devam ettirebilmek için enerji üretmek zorundadır ve bu enerji kaynağı Adenozin Trifosfat (ATP)'tır. ATP üretimi için çeşitli metabolik yollar olmasına rağmen %88 oranında mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla

(OXPHOS) olmaktadır (11). Hücresel ATP miktarının azaldığı çeşitli durumlarda ise hücre genellikle apoptoza gitmektedir (62).

Mitokondriyonlar, fazla miktarda enerji üreten ve tüketen hücrelerde bol miktarda bulunurlar. Mitokondriyonlar, interfaz evresinde bölünerek sayılarını arttırmaktadır ve bölünmeleri hücre döngüsü ile senkronize değildir. Mitokondriyonlar hem lokalizasyonlarını hem de şekillerini değiştirebilirler ve spermin orta parçasında olduğu gibi enerji ihtiyacı olan bölgelerde lokalize olurlar (22).

Mitokondriyonlar, eritrositler ve terminal keratinositler dışında tüm hücrelerde bulunurlar. Mitokondriyonun sayısı, şekli ve iç yapısı genellikle hücre tipleri için karakteristiktir. Mitokondriyon sayısı fazla olduğunda hücreler daha asidofilik olmaktadır. Mitokondriyonlar, histokimyasal yöntemlerle boyanabilirler. Mitokondriyonlar; küre, çubuk, uzun lif ve sarmal yapı gibi şekillere sahip olabilirler (22).

Mitokondriyonlar, çift zar yapısına sahiptir. İç mitokondriyal membran, matriks adı verilen alanı çevreler. Dış mitokondriyal membran ise sitoplazma ile yakın temas halindedir. İki zar arasında intermembran aralık bulunur (22).

Dış mitokondriyal membran, 6-7 nm kalınlığındadır ve voltaj-bağımlı anyon kanallarını içerir. Bu kanallara mitokondriyal porinler adı verilmektedir. Bu büyük kanallar yaklaşık 3 nm çapındadır ve 5.000 Da büyüklüğündeki yüksüz moleküllere geçirgendir. Küçük moleküller, iyonlar ve metabolitler zarlar arası boşluğa girebilir ancak iç kısma geçemez. Ayrıca fosfolipaz A2, monoamin oksidaz ve asetil koenzim A (CoA) sentaz dahil olmak üzere çeşitli enzimler içerir (22).

İç mitokondriyal membran, dış mitokondriyal membrandan daha incedir. İç membran yüzey alanını belirgin şekilde arttıran çok sayıda krista yapısına sahiptir. Steroid metabolizmasında görev alan bazı hücrelerde iç membran, matriks içine doğru tübüler veya veziküler çıkıntılar oluşturabilir. İç membran, membranı iyonlara geçirimsiz kılan fosfolipid olan kardiyolipinden zengindir (22).

Solunum zincirinin enzimleri iç membranda yer alırlar ve ATP üreten oksidatif fosforilasyon enzimlerini içerirler. İç membranı oluşturan proteinlerin elektron taşıma zincirinin oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmek, ATP'yi sentezlemek ve metabolitlerin matriksten içeri ve dışarı taşınmasının düzenlenmesi olmak üzere üç ana görevi vardır (22).

İntermembran aralık iç ve dış zar arasında yer alır ve kreatin kinaz, adenilat kinaz ve sitokrom c gibi enzimler içerir. Sitokrom c, apoptozun başlatılmasında önemli bir faktördür (22).

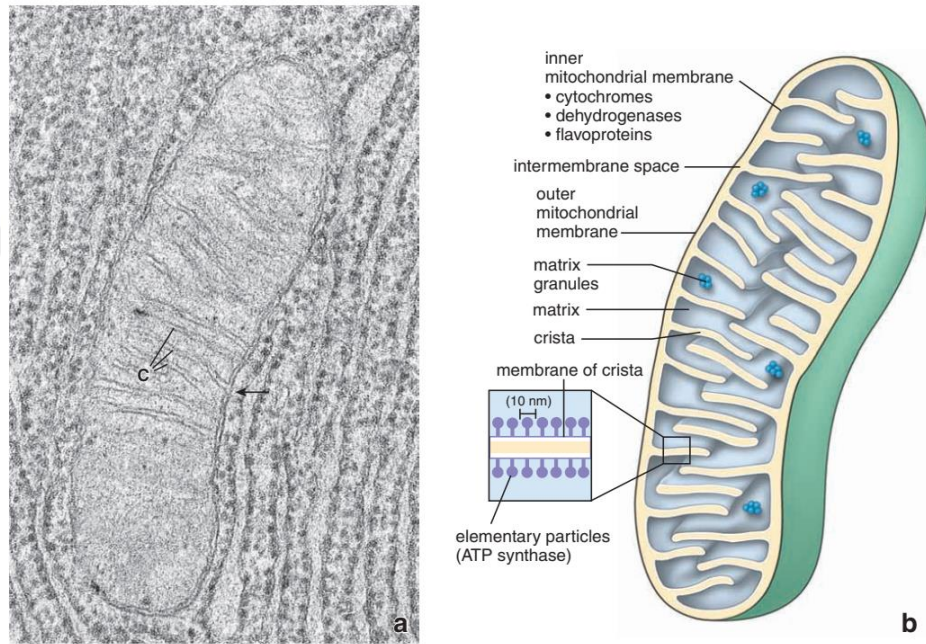
Mitokondriyal matriks, iç mitokondriyal membran ile çevrilidir ve sitrik asit döngüsünün (Krebs döngüsü) enzimlerini ve yağ asidi oksidasyonunda rol oynayan enzimleri içermektedir. Karbondioksit ve elektron taşınması için elektron kaynağı olan indirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) içerir. Bu sitrik asit döngüsü ve yağ asidi oksidasyonu reaksiyonlardan üretilen enerji, mitokondriyal matrikste yer alan indirgenmiş NADH'den elde edilen hidrojen iyonları ( $H^+$ ) ile temsil edilir. İç mitokondriyal membranda bulunan bir dizi proton pompası aracılığıyla hidrojen iyonları matriksten zarlar arası boşluğa aktarılır. Bu pompalar solunum enzimlerinin elektron taşıma zincirini oluşturur. İç mitokondriyal membran boyunca hidrojen iyonu transferi, bir elektrokimyasal proton gradiyenti oluşturur. Bu gradiyent, büyük bir proton hareket gücü yaratır. ATP sentaz ise,  $H^+$  iyonlarının geçişi için iç mitokondriyal membran boyunca bir yol sağlar. Bu protonların mitokondriyal matrikse geri hareketi, kemiozmotik eşleşme olarak adlandırılır. Yeni üretilen ATP, iç mitokondriyal membranda bulunan protein olan ATP/ADP değişim proteini ile matriksten intermembran aralığına taşınır. ATP, mitokondriyonu voltaj bağımlı kanallarla terk ederek sitoplazmaya girer. Aynı zamanda, sitoplazmada üretilen ADP, mitokondriyona giriş yapar (22).

Mitokondriyon,  $Ca^{2+}$  ve diğer iki değerlikli ve üç değerlikli katyonları depolayan yoğun matriks granüllerini içerir. Matriks ayrıca DNA, ribozom ve tRNA içerir (22).

Mitokondriyonlar, fonksiyonel durumlarına bağlı olarak morfolojik değişiklikler gösterir. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntülerine göre

mitokondriyonlar iki farklı konfigürasyon gösterirler. Ortodoks konfigürasyonda kristalar yoğundur, matriks hacmi total mitokondriyon hacminin büyük kısmını oluşturur ve bu durum düşük düzeyde oksidatif fosforilasyona karşılık gelir. Kondense konfigürasyonda ise kristalar organize değildir ve intermembran aralık hacmi total hacmin yarısından daha fazladır. Bu konfigürasyon ise yüksek düzeyde oksidatif fosforilasyon anlamına gelmektedir (22).

Mitokondriyon hüresel stresi algılayıp hücrenin yaşayıp yaşamayacağına karar verebilir. Mitokondriyon, sitokrom c'nin intermembranöz boşluktan hücre sitoplazmasına salınmasını sağlayarak apoptozu başlatabilir. Bu olay ise Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir (22).



**Şekil 2.4.** Mitokondriyonun yapısı. **a.** Bu elektron mikrografta “C” ile gösterilen yapılar kristalardır ve ok ile gösterilen bölgede olduğu gibi iç mitokondriyal membranın katlanması ile meydana gelmektedir. **b.** Mitokondriyonun komponentlerini gösteren şematik diyagram (22).

Mitokondriyonlar semi-otonomik organellerdir (63). Kendilerine ait mitokondriyal DNA (mtDNA) formunda genomları bulunmaktadır ve her hücre farklı sayıda mtDNA molekülü içermektedir (64). Mitokondriyonların genomları, nükleer genom ile ilişki içerisinde (65). Mitokondriyonlar maternal kalıtım göstermektedir (66).

Mitokondriyonlar, oosit ve erken embriyoda en çok bulunan organellerdir (69, 70). Mitokondriyonlar, oosit olgunlaşması, fertilizasyon ve embriyonik gelişim için gereklidirler. Mitokondriyon ve ooplazma kalitesi, yaşlanma sürecinden etkilenir (68). Mayotik ve embriyonik anöplidilerin de mitokondriyal aktivite ve ovaryan yaşlanma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (69). Anöplidiler, kadın infertilitesinin önemli sebeplerindedir ve spontane düşük, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile sonuçlanabilmektedir (70).

Somatik hücre çalışmalarındaki mitokondriyon yapı ve moleküler anormallikleri mitokondriyon disfonksiyonu olarak adlandırılır ve nörolojik hastalıklar, kalp hastalıkları, diyabet hastalığı ve kanser ile ilişkili bulunmuştur (62, 63).

Mitokondriyal aktivite; mitokondriyal dinamiklere ve mitokondriyal özelliklere bağlıdır. Mitokondriyal geçiş poru (mitochondrial permeability transition pore - mPT), mitokondriyon membran potansiyeli (MMP), mitokondriyonların lokalizasyonu, dağılım paternleri ve mtDNA miktarı mitokondriyal aktivitede belirleyicidir (71). Mitokondriyon disfonksiyonunda reaktif oksijen radikalleri (ROS) artışı ve kalsiyum birikimi meydana gelir (75-77).

Mitokondriyal geçiş poru (mPT), iç membranda lokalizedir. İyonların ve çözünmüş maddelerin geçişinde rol alır (73). mPT geçirgenliğinin değişimi, mitokondriyon maturasyonunda önemlidir (74).

Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) oosit kalitesi için önemlidir. Oositteki hipopolarize mitokondriyon, anormal embriyo oluşumuna sebep olur (75). Membran potansiyelini belirlemek için kullanılan proplardan biri olan JC-1 (81, 82) (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanineiodide)

katyonik boyasının mitokondriyal alımı, membran potansiyeli ile direk ilişkilidir. Yüksek miktarda JC-1 konsantrasyonu, fazla miktarda mitokondriyal alımı gösterir ve kırmızı floresan emisyon sinyali ile sonuçlanır. Yeşil floresan ise JC-1 monomeri varlığını gösterir ve hipopolarizasyonu işaret eder. Kırmızı ışımaya fazlalığı ise hiperpolarize iç membranı gösterir. MMP, mitokondriyon maturasyonunu ölçmek için kullanılmaktadır (75).

### **2.6.1. Mitokondriyon ve Oosit**

Mitokondriyonlar, oosit fonksiyonlarında hayati öneme sahiptir. Fertilizasyon ve oosit kalitesi için kritiklik organellerdir (77). Mitokondriyonlar maternal kalıtım gösterir. Metafaz II aşamasındaki oosit, blastokist aşamasında gelişim için gerekli tüm mitokondriyonu içerir (78). Sperm mitokondriyonu ise ubiquitinasyon, modifikasyon, proteozomal yıkım ya da mitofaji yoluyla yıkılır (79).

Oositteki immatür mitokondriyonlar, yavru hücelere eşit olarak dağılır. Mitokondriyonlar eşit dağılmazsa mitokondriyon kalıtımında “disproporsiyonel pattern” görülür. Bu durum, 2-4 hücreli blastomer evresinde hücre lizisine, mitokondriyon hasarına ve embriyo implantasyonunun negatif sonuçlanmasına sebep olabilir (80).

İnsan oositi, vücuttaki en büyük hücredir ve fazla sayıda mitokondriyon içerir (81). Memeli hücrelerindeki mitokondriyon sayısı yüzlerce ya da binlerce olabilir. Bu sayı enerji ihtiyacına göre ve hücre hacmine göre değişmektedir. Düşük kaliteli oositler; infertilite, embriyo gelişim bozuklukları, blastokistte azalmış hücre sayıları ve embriyo kaybı ile ilişkilidir. Burada mitokondriyal disfonksiyon önemli rol oynar (77, 83).

Memelilerin birçoğunun oositinde Adenozin Trifosfat, somatik hücrelerin aksine, oksidatif fosforasyon yerine glikolitik yoldan ya da pentoz fosfat yolu (PPP) ile üretilir. Bu metabolik farklılıklar, yapısal farklılıklarla birliktelik gösterir. Embriyo primer olarak glikoliz ve PPP yolunu kullanırken mitokondriyon yuvarlak (immatür) bir yapıya sahiptir ve az sayıda krista içerir. OXPHOS yolunu kullanan

mitokondriyonda ise uzamış yapı ve ayrıntılı krista sistemi mevcuttur. Bu yuvarlak (immatür) fenotipten uzamış (matür) fenotipe değişim, embriyogenez sürecinde hücreler farklılaşıp mitokondriyon metabolizması glikolizden OXPHOS'a geçişirken meydana gelir. Oosit ve preimplantasyon embriyolarında mitokondriyon disfonksiyonu infertilite ve gelişim anomalilerinde önemli rol oynar (83, 88-91).

Memeli oositleri germinal vezikül evresinde (GV, profaz I-diakinez) duraklar ve puberteye kadar bekler. Folikül Uyarıcı Hormon etkisi ile uyarılan oosit, pubertede mayozun devam etmesi ile mayoz II'nin metafaz aşamasına kadar gelir. Mitokondriyon ise, Metafaz II (MII) içiğine yakın lokalizedir, içcik formasyonu ve bütünlüğünde rolü vardır (92, 93, 84). Perinükleer mitokondriyon birikimi, oosit kalitesi ve germinal vezikül yıkımının zamanlamasında önemlidir. Bu germinal vezikül yıkımı, kümülüs hücrelerinin ürettiği LH tarafından tetiklenir (85).

Mitokondriyonun sağladığı ATP, oosit matürasyonunda önemlidir. ATP proteinlerin fosforilasyon ve defosforilasyonu ile mayoz I ve mayoz II sürecindeki sentrozom ve mikrotübül dinamiğinde rol oynar (86). ATP, kromozom ayrılması ve simetrik bölünmede önemlidir (87).

Matür memeli MII oositi yaklaşık olarak 100.00-200.000 mitokondriyal DNA (mtDNA) içerir. mtDNA sayısı ile fertilizasyon ve gelişimsel yetenek arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir (88).

### **2.6.2. Mitokondriyon ve Preimplantasyon Embriyo Gelişimi**

Embriyo gelişiminde, artan enerji ihtiyacı nedeniyle mitokondriyon yapısı değişim gösterir; basit sferik yapıdan kompleks yapıya dönüşür. Mitokondriyonlar iyi gelişmiş kristaya, yoğun matrikse ve uzamış dallı yapıya sahip olur. Bu yapı değişikliği, glikolitik metabolizmadan aerobik OXPHOS metabolizmaya dönüşüm ile korelasyon göstermektedir. Bu değişim sürecinde, solunum zinciri kompleksi yoğunluğunda ve ATP üretiminde artış olmaktadır (97, 98, 90).

Mitokondriyon farklılaşması özellikle blastosel aşamasında; trofoektoderm ve iç hücre kitlesine farklılaşmada meydana gelir. Trofoektoderm hücrelerinde mitokondriyal uzama ve artmış krista yapısı gözlenir (91).

### 2.6.3. Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondriyal disfonksiyon; yetersiz ATP üretimi ve kalsiyum homeostazında bozulma ile karakterizedir(75-77).

Obezite, diyabet hastalığı, yaşlanma gibi durumlar oosit kalitesini azaltır. Bu durum sadece erişkin oositini değil fetüsteki gelişen oositleri de etkiler (82). Mitokondriyonlar, sitoplazmik maturasyon için önemlidir (56), çünkü sitoplazmik ve hücre fonksiyonları için ATP gerekmektedir(57, 100).

Mitokondriyon dinamiklerindeki değişiklik, reaktif oksijen radikalleri oluşumuna sebep olur. Mitokondriyal matriks yoğunluğu artışı, mitokondriyon membran potansiyelinde (MMP) düşmeye sebep olur. MMP'deki düşme sonucu ATP sentezi ve elektron taşıma zincirindeki (ETZ) reaksiyonlar azalır, bunun sonucu olarak ROS artar. ROS artışı, kalsiyum birikimine sebep olur ve bu kalsiyum birikimi de geçiş porlarının açılmasını ve apoptozu tetikleyebilir (92). Detoksifikasyon gerçekleşmezse ROS artışı, oksidatif hasara sebep olup mtDNA'da mutasyonla ve delesyonla sonuçlanır (93). Mitokondriyonun DNA tamir kapasitesi ise sınırlıdır ve mutasyon oranı yüksektir (94).

Mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, mitokondriyonda dramatik yapısal değişiklikleri tetikler. Ortaya çıkan mitokondriyon, şişmiş veya yüzük/halka mitokondriyon olarak adlandırılır. MMP kaybı, mitokondriyonun yapısal çöküşünü tetikler. Reoksijenasyon, hipoksi ve yaşlanma gibi oksidatif stres ile giden patolojik durumlarda dokularda C-, U- veya O-şekilli (halka şeklinde) (95) ve şapkalı mitokondriyon (96) varlığı elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Bu nedenle, yüzük şeklindeki mitokondriyon, mitokondriyal stresin tipik ayırt edici özelliği olarak kabul edilmektedir (95).

#### 2.6.4. Mitofaji

Otofaji, genetik olarak programlanmış katabolik hücresel süreçtir. Hasarlı ya da sayıca fazla olan organellerin etrafında çift membran yapısı oluşur ve buna otofagozom adı verilir. Otofagozomlar daha sonra lizozomlarla birleşip otolizozomları oluşturur ve yıkım gerçekleştirilir. Mitokondriyonun selektif otofajik sürecine ise mitofaji adı verilir (97).

Transmisyon elektron mikroskobu, mitofajiyi göstermek için en iyi yöntemlerden biridir. Mitofajinin morfolojik ayırt edici özelliği, çift membranlı otofagozomların oluşumudur (97). Mitokondriyal yıkımda myelin figürü adı verilen membranöz cisimcikler izlenir (98). Erken aşama mitofaji, otofagozomdaki yutulmuş mitokondriyonun krista yapıları ile kolayca tespit edilebilir. Mitofajinin geç aşaması, rezidü mitokondri içeren tek membranlı otolizozomlar şeklinde gözlenebilir (97).

Mitofajide, mitokondriyal fragmentasyon önemli rol oynar. Mitokondriyonlar dinamik organellerdir, sürekli fisyon ve füzyona uğrarlar. Mitokondriyal fisyonda, mitokondriyon ve endoplazma retikulumu fiziksel olarak yakın ilişki içerisinde gözlenmişlerdir. Ayrıca MMP yüksek olan mitokondriyonlar füzyon sürecine geçebilirken, MMP düşük olan mitokondriyonların mitofajiye gittiği görülmüştür (97).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Etik Kurul İzin Süreci

“İnsan Granüloza Hücresi Mitokondriyon Fonksiyonu ile AMH ve Östrojen İlişkisi” başlıklı tez çalışması 03.12.2019 tarihinde, 2019/28 numaralı toplantıda, 16969557-2204 sayı ve GO 19/1152 kayıt numarasıyla Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntem başlıklarındaki değerlendirilme sonucu etik açıdan uygun bulunmuştur.

#### 3.2. Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Örneklerin Elde Edilmesi

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Tüp Bebek Ünitesi'nde tedavi gören 20 kadın dahil edilmiştir. Hastalardan yumurta toplama (OPU, oocyte pick-up) sırasında elde edilen örneklerin, oosit-kümüls kompleksini seçimi sonrası arda kalan folikül sıvıları EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)'lı tüplere alınarak HÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında çalışılmıştır.

HÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde rutin olarak testi yapılan Anti-Müllerian Hormon (AMH) ve östrojen düzeylerinin normal değerde olması ve düşük değerde olmasına göre 2 ayrı grup oluşturulmuştur. Bu gruplar, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi HÜBAB; TSA-2018-17320 numaralı projeden alınmış olan insan granüloza hücre hattı HGL5 ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada;

1. Grup 1: HGL5 insan granüloza hücre hattı grubu
2. Grup 2: AMH>1.1µg/L ve östrojen≥70pg/ml (değerler normal olanlar) (99)
3. Grup 3: AMH≤ 1.1µg/L ve östrojen<70pg/ml (değerler düşük olanlar) (99) olmak üzere üç grup oluşturulmuştur.

### 3.2.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hastalar

18-40 yaş arasında ve vücut kitle indeksi 20-25 kg/m<sup>2</sup> olan hastalar araştırmaya dahil edilmiştir.

### 3.2.2. Araştırmaya Almama Kriterleri

Endometriozisi olan hastalar, sigara içenler, son 6 ay içinde hormon kullanan hastalar ve herhangi bir dahili veya metabolik hastalığı olanlar araştırmaya dahil edilmemiştir.

### 3.3. Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu

HÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda folikül sıvıları (FS) 1:1 oranında PBS (Phosphate-buffered saline) ile dilüe edilmiştir. 3 ml Lymphosep (Lymphocyte Separation Media) solüsyonu eklenmiş 15 ml'lik santrifüj tüpünün üzerine solüsyonla karışmayacak şekilde 12 ml FS+PBS çözeltisi eklenmiştir. Lymphosep solüsyonu ve FS+PBS çözeltisini içeren bu tüpler 2500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Her tüpten yüzen izole edilmiş hücreler 4 ml hacminde alınıp yeni bir santrifüj tüpünde, üzerine 4 ml bazal DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) besiyeri eklenerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan pelletler %10 FBS, 2mM L-Glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilmiş DMEM-F12 besiyeri ile çözülüp, uygun kültür kabına (T25/T75 hücre kültürü flaskı) ekilmiştir. DMEM-F12 besiyeri üzerine BIOAMF-1 bazal medyumunu, karışım oranı 1:1 olacak şekilde eklenmiştir.

Aynı hastanın oosit denüstasyonu sonrası arda kalan kümülüs hücreleri alınarak üstüne 1 ml bazal DMEM F-12 eklenip 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatanı atılarak pellet 1 ml DMEM-F12 ile çözülmüştür. Bu hücreler hastanın önceden izole edilen hücrelerine eklenmiştir.

### **3.4. Besiyerlerinin Hazırlanması**

#### **3.4.1. Komplek DMEM-F12 besiyeri hazırlama**

Bazal DMEM-F12 (w/o L-glutamin) içerisine fetal bovine serumu (FBS) (FBS-11B, Capricorn Scientific, Almanya) 0,8 µm çaplı filtreden geçirildikten sonra %5 oranında eklenmiştir. Sonrasında penisilin-streptomisin %1 (PS-B, Capricorn Scientific, Almanya) oranında ve L-glutamin %4 (GLN-B, Capricorn Scientific, Almanya) oranında kullanılmıştır. Bu amaçla 50 ml'lik tüplere, 45 ml bazal DMEM-F12, 2,5 ml FBS, 0,5 ml penisilin-streptomisin ve 2 ml L-glutamin eklenerek 50 ml komplek DMEM-F12 besiyeri hazırlanmıştır.

#### **3.4.2. BIOAMF besiyeri hazırlama**

BIOAMF-1 bazal medyum (BI01-190-1A, 450 ml) ve supplement (BI01-190-1E, 50 ml) birbirlerine karıştırıldıktan sonra %1 oranında penisilin-streptomisin eklenerek komplek BIOAMF besiyeri hazırlanmıştır.

### **3.5. Granüloza Hcreti Pasajlanması**

Faz kontrast mikroskopu (TMS Inverted Mikroskop Nikon, Japonya) ile incelenen flaskta %80 ve üzeri konfluensi görüldüğünde hücreler pasajlanmıştır. Flasktaki besiyeri çekildikten sonra 37°C'deki dPBS (Capricorn Scientific-PBS-1A) ile yıkanmıştır. Sonrasında 5 dakikayı geçmeyecek şekilde tripsin (TRY-1B10, Capricorn Scientific, Almanya) ile inkübe edilmiştir. Flask yüzeyi ile temasını kaybetmeyen hücreler mekanik olarak kaldırmaya çalışılmıştır. Devamında 1:1 komplek DMEM-F12 besiyeri eklenerek tripsin nötralize edilmiştir. Tripsin-besiyeri karışımı 15 cc'lik santrifüj tüpüne alınarak santrifüjde 5 dakika 1200 rpm'de çevrilmiştir. Süpernatant uzaklaştırdıktan sonra oluşan pellet 1 ml besiyeri ile çözülmüştür. Hücre sayımı yapıldıktan sonra eşit miktarlarda bölünerek yeni T25 flasklara ekilmiştir. İlk ekimde 1:1 komplek DMEM-F12 ve komplek BIOAMF-1 besiyeri karışımı kullanılmıştır. Sonraki beslemelerde ise sadece komplek DMEM-F12 besiyeri kullanılmıştır.

### 3.6. Granüloza Hücresi Sayımı

Kaldırılan granüloza hücrelerinden oluşan pellet üzerine 1 ml besiyeri eklendikten sonra 100 µl'si alınmıştır ve üzerine 900 µl besiyeri ilave edilerek 1:10 oranında sulandırılmıştır. Seyreltik çözültiden 100 µl alınarak üzerine 100 µl tripan mavisi (%0,4) eklenmiştir. Bu karışımdan 10 µl alınarak hemositometre ile hücre sayımı yapılmıştır. Hemositometrede sayılarının ortalaması (n) alındıktan sonra toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanarak belirlenmiştir:

$$N = n \times 10 \times 2 \times 10^4$$

N (toplam hücre sayısı)

n (toma lamında sayılan hücre sayılarının ortalaması)

x 10 (10 kat seyreltmeden dolayı)

x 2 (tripan mavisi ile birebir seyreltmeden dolayı)

x 10<sup>4</sup> (formül katsayısı)

### 3.7. Granüloza Hücrelerinin Dondurulması

Konflüensi değerlendirilmesinde %80 ve üzeri değere ulaşan hücreler tripsinle kaldırılıp santrifüj sonrası pellet haline getirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 700 µl DMEM-F12 besiyeri ile çözümlenerek hücreler "cryovial"lere alınmıştır. Hücrelerin üzerine 200 µl FBS eklendikten sonra 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) (D2650, Sigma Aldrich, ABD) buz üzerinde eklenmiştir. "Cryovial"ler dondurulmak üzere Cool Cell kabına (BCS-136 CoolCell, Biocision, ABD) alınıp -80°C derin dondurucuya (DF290, Nüve, Türkiye) kaldırılmıştır. Bir gece buzdolabında bekletilen tüpler sıvı azot tankına (Carbide 35HC LN2, Taylor Wharton Union, ABD) aktarılmıştır.

### **3.8. Dondurulmuş Granüloza Hücrelerinin Çözülmesi**

İş paketlerinin tekrarlanması gereken durumlarda, azot tankında bulunan hücreler alınarak hızlı bir şekilde 37°C derecede su banyosuna konulmuştur. Kültür laboratuvarında önceden hazırlanmış besiyerine 1:9 oranında eklenerek santrifüj (1200 rpm, 5 dakika) edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pellet, 1 ml komplet DMEM-F12 besiyeri ile çözülerek kültüre hazır hale getirilmiştir.

### **3.9. Hücre Kültürü**

HÜTF Tüp Bebek Ünitesi'ne başvuran kadınlardan alınan granüloza hücreleri ve HGL5 insan granüloza hücresi hattından üreteceğimiz granüloza hücreleri kültüre edilmiştir.

#### **3.9.1. Primer Granüloza Hücre Kültürü**

HÜTF Tüp Bebek Ünitesi'ne başvuran 20 kadından elde edilen folikül sıvıları alınmıştır. Gelen sıvılar Lymphosep solüsyonu kullanılarak izole edilip %10 FBS, 2mM L-Glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilmiş DMEM/F12 besiyerinde T75 hücre kültürü flaskına ekilmiştir. Her 3 günde bir besiyeri değiştirilerek, tek tabaka halinde büyüyen hücreler %80 konfluent olana kadar optimal kültür koşullarında 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde, nemli ortamda kültüre edilmiştir.

#### **3.9.2. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü**

Laboratuvarımızda donmuş olarak sakladığımız; Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi HÜBAB; TSA-2018-17320 numaralı projeden alınmış olan insan granüloza hücre hattı HGL5, hücre kültürü laboratuvarı içinde steril şartlar altında laminar akım kabini içinde çözülmüştür. Çözülen granüloza hücre hattına ait hücreler için uygun besiyeri (2% Cosmic Calf Serum, 2% Ultroser G, 1% ITS plus ve %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilmiş Prigrow IV medium) içinde 25 cm<sup>2</sup> lik flaslara ekilip 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Ertesi gün

hücreler faz kontrast mikroskobu altında kontrol edilmiştir ve iki gün sonra besiyerleri değiştirilmiştir. Flasklar %80 konfluent olduğunda tripsinizasyon yapılarak pasajlanmıştır. Birinci pasajdan sonra bir miktarı dondurulup ileri dönemde kullanılmak üzere azot tankında saklanmıştır. Diğer hücreler iş paketleri için kullanılmıştır.

### **3.10. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Granüloza Hücre Hattında İmmunofloresan İşaretleme**

HGL5 granüloza hücre hattına ait hücreler ve primer kültür hücreleri 96 kuyulu plaklara ekilip bir gece boyunca tutunmaları için beklenmiştir (100). Ertesi gün hücreler dilüsyon tamponu ile yıkanmıştır. Granüloza hücresi mitokondriyon membran potansiyelini ölçmek için JC-1 floresan boyası (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1'3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanineiodide) kullanılmıştır (JC1-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit-ab113850). Yıkanan hücreler karanlıkta, dilüsyon tamponu içerisinde, 1 µM JC-1 boya solüsyonu ile 10 dakika 37°C'de muamele edilmiştir. Boyama yapılırken ortamda minimum ışık bulunmasına dikkat edilmiştir. JC-1 ile muamele edilen hücreler iki sefer JC-1 boya tamponu ile yıkanmıştır. Pozitif kontrol için bir iyonofor ayracı olan 100 µM FCCP (carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy phenylhydrazone) kullanılmıştır. Mitokondriyal JC-1 monomerlerinin ve agregatlarının floresan yoğunluğu, floresan plak okuyucu (VersaMax Microplate Reader) ile belirlenmiştir (107, 108).

#### **3.10.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması**

Kullanımdan önce tüm solüsyonlar oda sıcaklığına (18-25°C) getirilmiştir.

##### **1X Dilüsyon Tamponu:**

10 ml 10X Dilüsyon tampon solüsyonuna 90 ml deiyonize su eklenerek 1X dilüsyon tampon solüsyonu elde edilmiştir.

**1 mM JC-1 Stok Solüsyonu:**

500 µg JC-1 şişesine 766.8 µL DMSO eklenerek JC-1 Stok Solüsyonu elde edilmiştir. Kullanılmayan her 1M JC-1 solüsyonu bölüştürülerek ve -20°C'de saklanmıştır.

**JC-1 Solüsyonu:**

1 µM JC-1 solüsyonu elde edebilmek için, 10 µL 1 mM JC-1 ile 10 ml 1X dilüsyon tamponu karıştırılmıştır.

**3.10.2. JC-1 Boyama Prosedürü**

Kullanımdan önce tüm malzemeler ve hazırlanan solüsyonlar 37°C'ye getirilmiştir.

- Granüloza hücreleri kültüre edildi.
- Test gününden önceki gece granüloza hücreleri  $6 \times 10^3$  hücre/kuyu olmak üzere 96 kuyulu plaklara ekildi ve tutunmaları beklendi.
- 96 kuyucuklu plaklara tutunan granüloza hücreleri 100 µL/kuyucuk 1X dilüsyon tampon solüsyonu ile yıkandı.
- 100 µL/kuyucuk çalışan JC-1 solüsyonu eklendi ve 10 dakika 37°C'de karanlıkta inkübe edildi.
- Plak 1X dilüsyon tampon solüsyonu ile 2 kez yıkandı.
- Plaklar, Floresan Plak Okuyucu ile okundu. Eksitasyon dalga boyu  $475 \pm 20$  nm, emisyon dalga boyu  $530 \pm 15$  nm olarak ayarlandı. Okutulma yapılırken kuyucukların kuru olmamasına dikkat edildi.
- Testler 3 sefer tekrarlandı.

JC-1 ile boyanan grupların floresan plak okuyucu ile okutulma sonucu elde edilen değerlerinin ortalaması alındı ve gruplar karşılaştırıldı. Pozitif kontrol için JC-1 boyamasından 4 saat sonra FCCP eklendi ve değerleri tekrar okutuldu. FCCP eklendikten sonraki değerlerle ilk okuma değerleri karşılaştırıldı.

### 3.11. Granüloza Hücresi Mitokondriyon Morfolojisinin Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi

Kültüre edilen granüloza hücreleri tripsin ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra süpernatant olarak kalan pellet TEM için hücre takibine alınmıştır.

#### 3.11.1. TEM için Hücre Takibi

- Hücreler %2'lik gluteraldehit solüsyonunda 24 saat 4°C'de tespit edildi.
- Hücreler 0,1 M fosfat tampon solüsyonu ile 3-4 kez yıkandı.
- 1:1 oranında %2'lik osmium tetroksit ve 0,1 M fosfat tampon solüsyonu karıştırılarak %1'lik osmium tetroksit hazırlandı.
- Hücreler ikinci fiksasyon için %1'lik osmium tetroksit içinde 60 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi.
- Hücreler 0,1 M fosfat tampon solüsyonu ile 3-4 kez yıkandı.
- Dehidratasyon için hücreler artan dereceli alkollerden aşağıdaki sıraya göre geçirildi:
  - %50 etil alkol 10 dk
  - %60 etil alkol 10 dk
  - %70 etil alkol 10 dk
  - %80 etil alkol 10 dk
  - %90 etil alkol 10 dk
  - %96 etil alkol 15 dk
  - %96 etil alkol 15 dk
  - %100 etil alkol 20 dk
  - %100 etil alkol 20 dk
- Hücreler 2x15 dakika propilen oksitte bekletildi.
- İnfiltrasyon için hücreler sırasıyla aşağıdaki karışımlarda bekletildi:
  - 3 ölçü propilen oksit + 1 ölçü gömme materyali 1 saat
  - 1 ölçü propilen oksit + 1 ölçü gömme materyali 1 saat
  - 1 ölçü propilen oksit + 3 ölçü gömme materyali 1 gece

- Hücreler ertesi sabah gömme için kullanılacak gömme materyali içinde 2 saat bekletildi.
- Gömme kalıpları gömme materyali ile dolduruldu.
- Örnek adı yazılı kağıt gömme kalıplarına yerleştirildi.
- Hücreler gömme iğnesi ile kapsüllere yerleştirildi.
- Kalıpta hava kabarcığı kalmışsa gömme iğnesi ile çıkarıldı.
- Gömülen hücreler etüvde etüvde 60°C'de 48 saat polimerize edildi.
- 48 saat sonunda etüvden çıkarılan örneklerin soğuması beklendi ve dışındaki kalıp kesilerek örnekler çıkarıldı (102).

Elde edilen örneklerden Leica RM 2265 mikrotom ile 0.1 mm kalınlığında ince kesitler alındı ve metilen mavisi-azur 2 ile boyandı. Daha sonra Leica Ultracut R mikrotom kullanılarak 70 nm ultra ince kesitler alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra JEM-1400 elektron mikroskobu (JEOL) ile görüntülendi (102).

Mitokondriyonların şekilleri yuvarlak, tübüler, uzamış, C şeklinde, U şeklinde, yüzük şeklinde ve şapkalı olup olmamasına göre değerlendirildi. Mitokondriyon membran yapıları ve krista yapıları incelendi (95).

### 3.12. İstatistiksel Analiz

Örnekleme hesabı G-Power (v. 3.1.9.7) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Çalışma için ihtiyaç duyulan örnekleme genişliği parametrik testlere göre hesaplanmıştır. Gruplardan elde edilen ekspresyon düzeylerinin değişkenliğinin 0.5 birim olduğu ve örneklerden elde edilen ekspresyon düzeylerinin zaman içindeki değişiminin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığının parametrik yöntemler ile inceleneceği öngörülerek güç analizi yapılmış ve örnekleme genişliği belirlenmiştir. Bu öngörüler altında 1 birimlik bir etki genişliğinin %95 güç ile anlamlı bir farklılık olarak tespit edilebilmesi için her bir deney grubuna 10 kişinin dahil edilmesine karar verilmiştir.

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 23 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için ortanca ve çeyreklerarası aralık kullanılarak verilmiştir. Grupların normal dağılım göstermediği belirlendiğinden parametreler gruplar arasında Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR

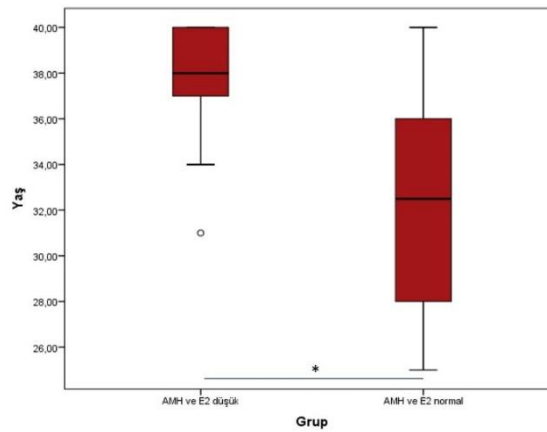
### 4.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'nde tedavi gören 18-40 yaş arasında ve normal vücut kitle indeksi (20-25 kg/m<sup>2</sup>) olan kadınlar araştırmaya dahil edildi. AMH ve E2 değerleri normal olan grubun yaş ortancası 38, AMH ve E2 değerleri düşük olan grubun yaş ortancası ise 32,5 olarak hesaplandı. İki grubun yaş dağılımları arasında istatistiksel olarak fark bulundu ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.** Hastaların yaşlarına ilişkin sayısal veriler.

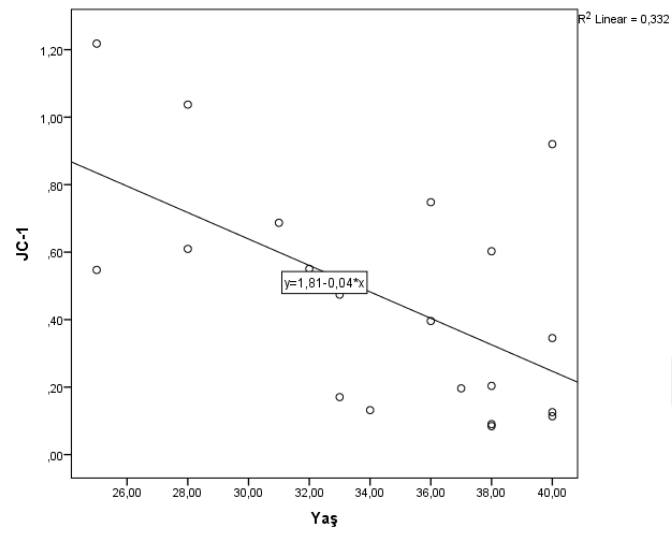
	Hasta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	En Küçük Değer	En Büyük Değer
AMH-E2 Normal	10	31,6	5,01553	32,5	25	40
AMH-E2 Düşük	10	37,4	2,87518	38	31	40

**Tablo 4.2.** AMH ve E2 değerleri düşük olan grup ile AMH ve E2 değerleri normal olan gruba ait yaşların kutu çizgi grafiği. AMH ve E2 değerleri düşük olan grubun yaş ortancası, AMH ve E2 değerleri normal olan grubun yaş ortancasından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0,05$ ).

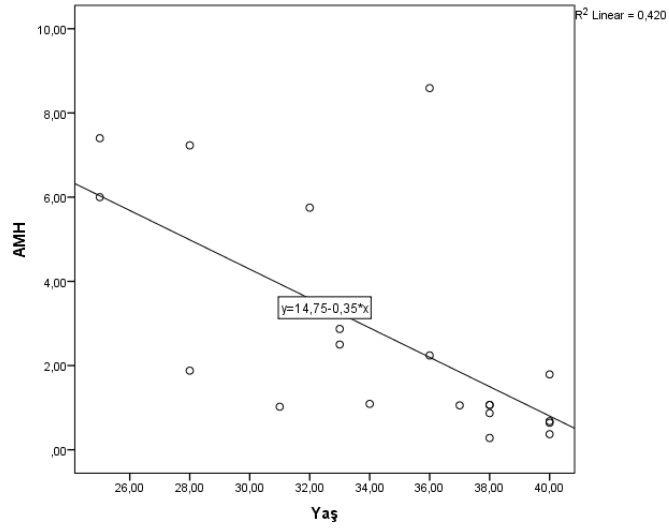


Vücut kitle indeksi normal sınırlarda seçilen hastaların yaşları ile JC-1 değerleri, AMH değerleri ve E2 değerleri arasında korelasyon analizi yapıldı. Hastaların granüloza hücrelerinin mitokondriyonların JC-1 immüno Floresan işaretleme değerleri ve hastaların yaşı arasında yapılan korelasyon analizinde negatif yönde yüksek korelasyon gözlemlendi ( $r = -0,529$ ) ve istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.3.).

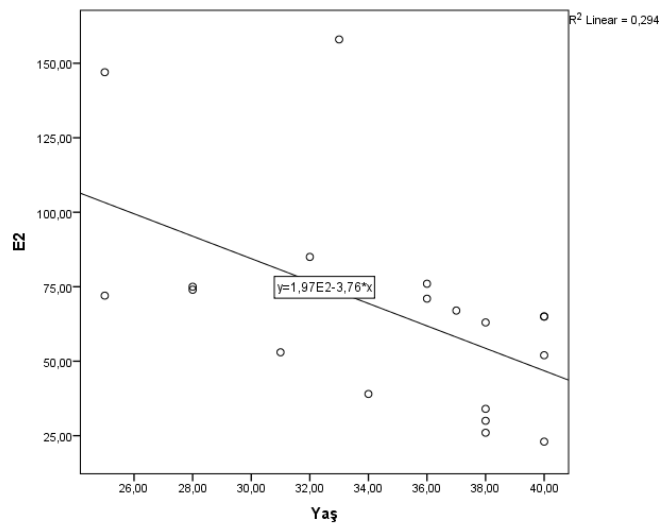
**Tablo 4.3.** JC-1 ile yaş arasındaki korelasyon grafiği.



Hastaların yaşı ve AMH değeri arasında yapılan korelasyon analizinde negatif yönde yüksek korelasyon gözlemlendi ( $r = -0,726$ ) ve istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.4.).

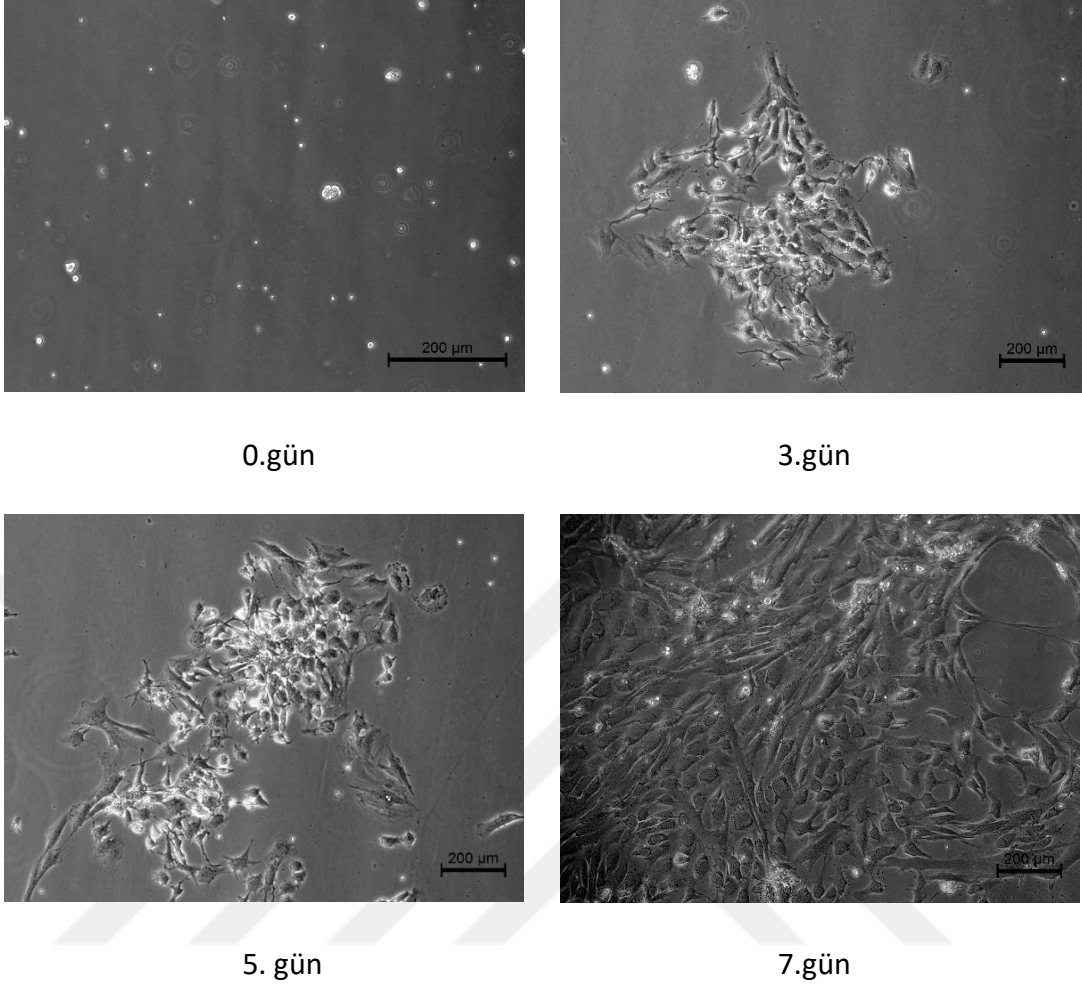
**Tablo 4.4.** AMH ile yaş arasındaki korelasyon grafiği.

Hastaların yaşı ve E2 değeri arasında yapılan korelasyon analizinde negatif yönde yüksek korelasyon gözlemlendi ( $r = -0,661$ ) ve istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.5.).

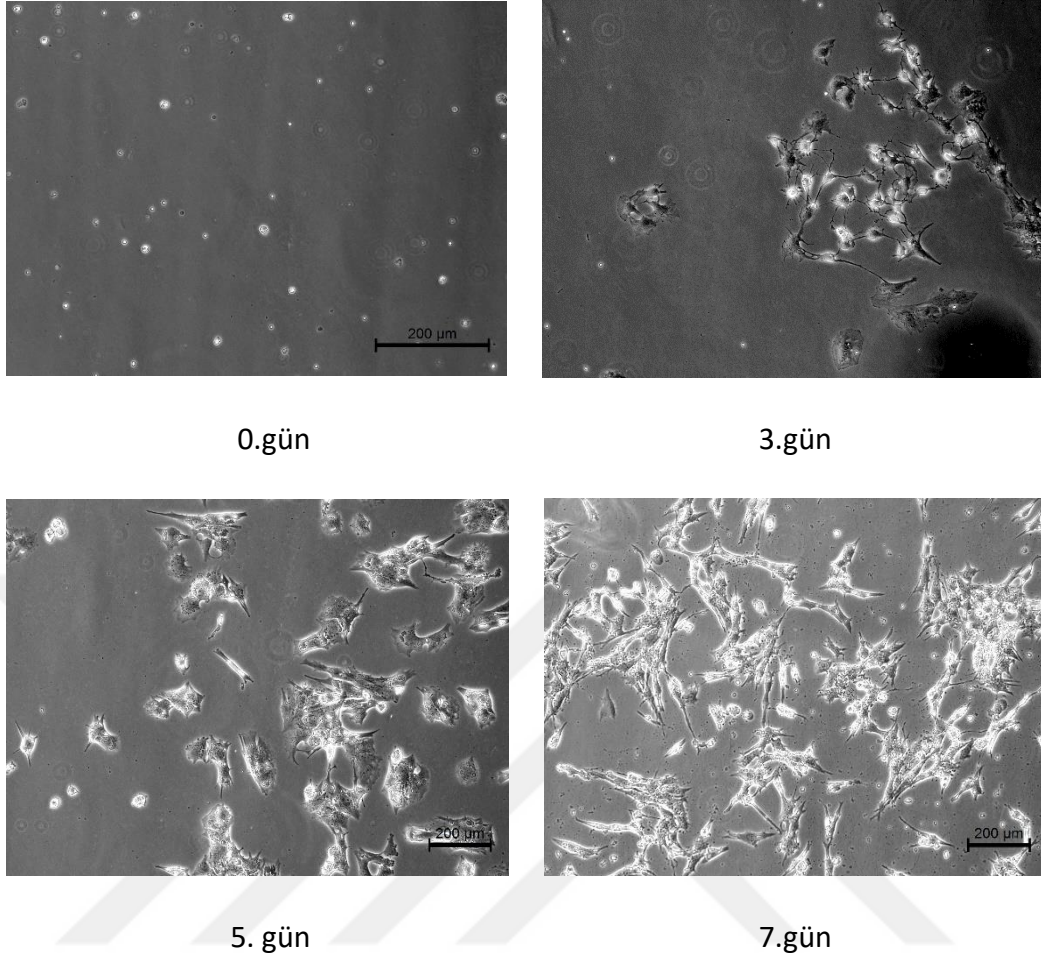
**Tablo 4.5.** E2 ile yaş arasındaki korelasyon grafiği.

## 4.2. Primer Granüloza Hücre Kültürü

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'nde tedavi gören 20 kadının folikül toplanma işlemi sonrasında elde edilen folikül sıvılarından granüloza hücreleri izole edildi. İzole edilen hücreler en fazla 2. pasaja kadar çoğaltıldı. İş paketleri 2. pasaj hücreleriyle gerçekleştirildi. İzolasyon için Lymphosep solüsyonu kullanıldı. Folikül sıvısı örnekleri, laboratuvara getirildikten sonra 1:1 oranında dPBS (Capricorn Scientific-PBS-1A) ile seyreltildi. Hücrelerin bölünme hızlarının hastadan hastaya farklılık gösterdiği gözlemlendi. Bu nedenle ilk hücre ekiminde ve pasajlama işlemi sonrası ilk beslemede komplet DMEM/F12 besiyeri 1:1 oranında komplet BIOAMF 1 besiyeri ile karıştırılarak kullanıldı ve tutunma ile proliferasyon hızlarının arttırılması sağlandı.



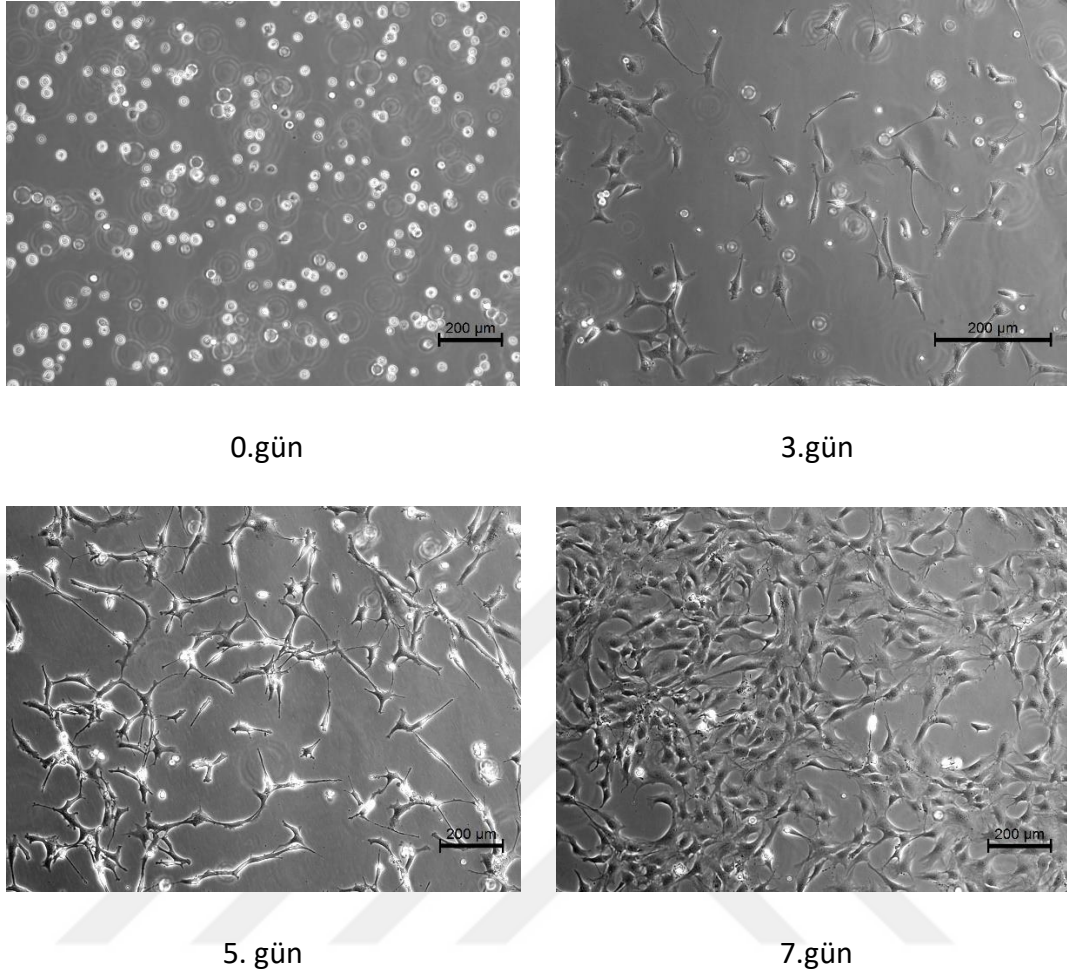
**Şekil 4.1.** AMH ve E2 düzeyi normal olan grubun izole edilen granüloza hücrelerinin 0-3-5-7. gün T25 faz kontrast mikroskobu mikrorafları.



**Şekil 4.2.** AMH ve E2 düzeyi düşük olan grubun izole edilen granüloza hücrelerinin 0-3-5-7. gün T25 faz kontrast mikroskobu mikrografları.

### 4.3. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi HÜBAB; TSA-2018-17320 numaralı projeden alınmış olan insan granüloza hücre hattı HGL5, kendi besiyeri (Prigrow IV besiyerinde 2% Cosmic Calf Serum, 2% Ultrosor G, 1% ITS plus ve penicillin/streptomisin/amfoterisin B solüsyonu) kullanılarak kültüre edildi. Hücreler 2.pasaja kadar çoğaltılıp iş paketleri tamamlandı.



**Şekil 4.3.** HGL5 granüloza hücre hattının hücrelerinin 0-3-5-7. gün T25 faz kontrast mikroskobu mikrografları.

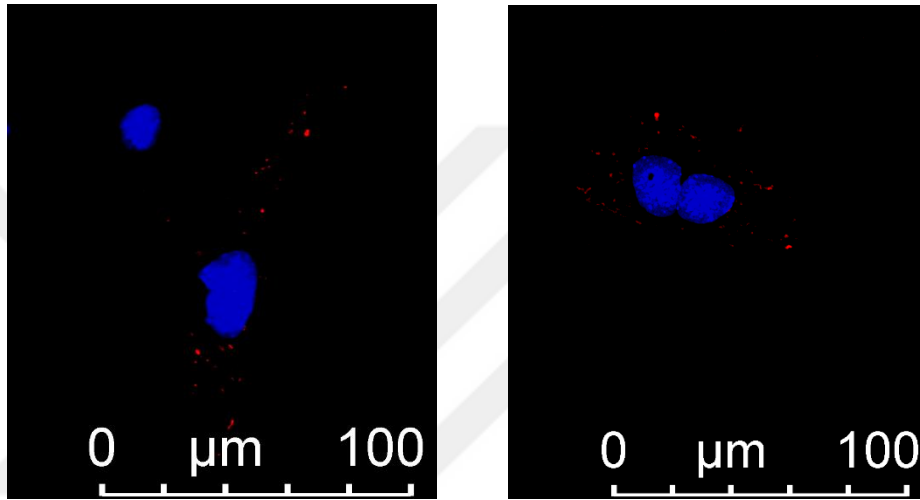
#### 4.4. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Granüloza Hücre Hattında İmmunofloresan İşaretleme

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'nde tedavi gören 20 kadının granüloza hücrelerinin ve insan granüloza hücre hattı HGL5'in mitokondriyonlarının membran potansiyelleri immunfloresan işaretleme (JC-1 katyonik boyası) ile ölçüldü.

- 1) HGL5 insan granüloza hücre hattı grubu
- 2) AMH $\geq$ 1.1 $\mu$ g/L ve östrojen $\geq$ 70pg/ml (değerler normal olanlar) (n=10)
- 3) AMH<1.1 $\mu$ g/L ve östrojen<70pg/ml (değerler düşük olanlar) (n=10)

olmak üzere toplam 3 grup üzerinden değerlendirildi.

Üç grubun immünofloresan işaretleme (JC-1) sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldı. AMH ve östrojen değerleri normal sınırlarda olanlar (grup 2) ve olmayanların (grup 3) granüloza hücrelerinin immünofloresan işaretleme (JC-1) sonuçları; hastaların kliniğe başvuru anındaki serum AMH ve östrojen değerleri ile karşılaştırıldı.



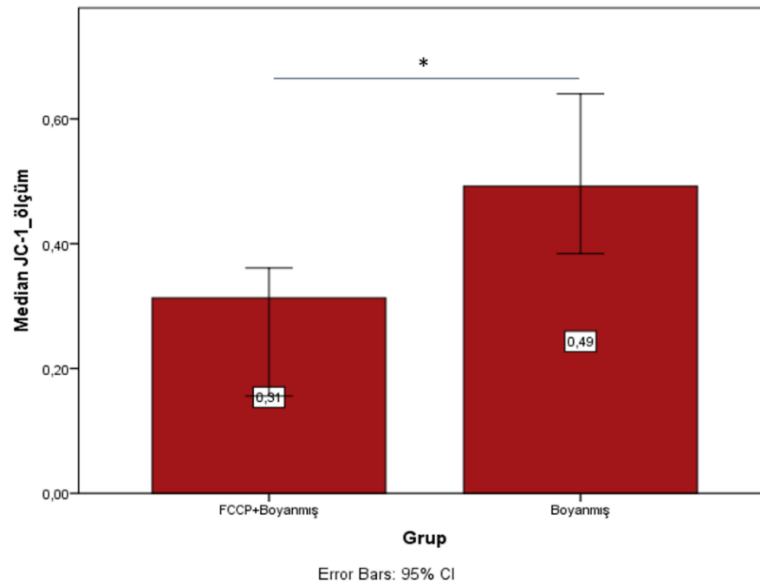
**Şekil 4.4.** HLG5 hücre hattının Leica DM 6B ile çekilmiş immünofloresan işaretlemeleri. Mitokondriyonlar sitoplazmada dağınık yerleşmiş olarak gözlemlendi. (JC-1 ile kırmızı boyanan yapılar mitokondriyonları, DAPI ile mavi boyanan yapılar çekirdekleri göstermektedir).

HGL5 granüloza hücre hattına ait hücreler ve primer kültür hücreleri 96 kuyulu plaklara ekilip bir gece boyunca tutunmaları için beklendi. Ertesi gün dilüsyon tamponu ile yıkanan granüloza hücrelerinin mitokondriyon membran potansiyelini ölçmek için JC-1 floresan boyası kullanıldı. Yıkanan hücreler karanlıkta, dilüsyon tamponu içerisinde, 1  $\mu$ M JC-1 boya solüsyonu ile 10 dakika 37°C'de muamele edildi. Boyama yapılırken ortamda minimum ışık bulunmasına dikkat edildi. JC-1 ile muamele edilen hücreler iki sefer JC-1 boya tamponu ile yıkandı. Pozitif kontrol için bir iyonofor ayracı olan 100  $\mu$ M FCCP kullanıldı. Mitokondriyal JC-1 monomerlerinin

ve agregatlarının floresan yoğunluğu, floresan plak okuyucu (VersaMax Microplate Reader) ile belirlendi.

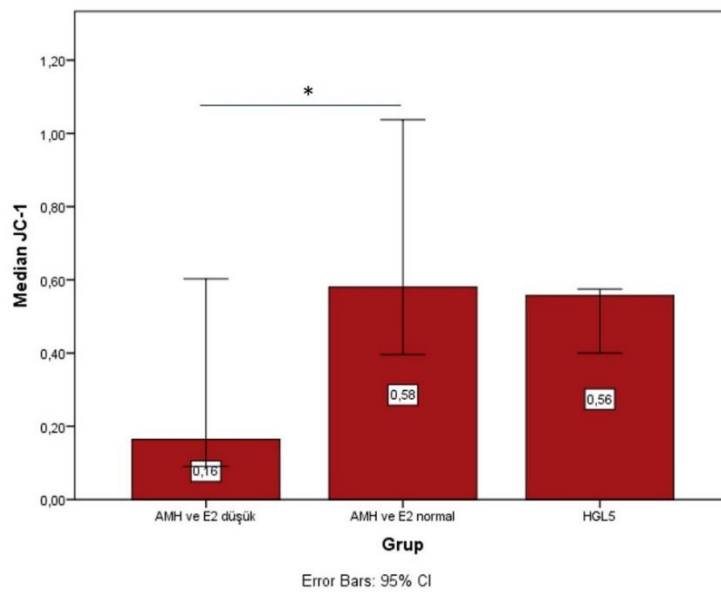
Hücreler JC-1 ile boyandıktan sonra pozitif kontrol için FCCP eklendi. FCCP eklemeyen önce floresan plak okuyucu ile belirlenen değer ile FCCP eklendikten dört saat sonra okutulan değer karşılaştırıldı. JC-1 boyalı grubun median değeri 0,4920 ve çeyreklerarası (interquartile range) aralığı 0,23 iken JC-1 sonrası FCCP eklenen grubun median değeri ise 0,3130 ve çeyreklerarası aralığı 0,18 olarak saptandı. FCCP eklenen grubun değeri diğer gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.6.). JC-1 ile boyanma sonrası FCCP eklenmesi sonucunda boyanmanın anlamlı olarak azalması, MMP kitinin amaca uygun olarak etkin olduğunu gösterdi.

**Tablo 4.6.** JC-1 boyanmış grup ile JC-1 sonrası FCCP eklenmiş grubun JC-1 immünofloresan yoğunluğu düzeyleri. JC-1 ile boyanma sonrası FCCP eklenmiş grubun immünofloresan yoğunluğu düzeyi, sadece JC-1 ile boyanmış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük gözlemlendi ( $*p < 0,05$ ).



JC-1 immünofloresan işaretlemelerinde AMH ve östrojen değerleri normal olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının JC-1 değeri, AMH ve östrojen değerleri düşük olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının JC-1 değerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0.016$ ). HGL5 granüloza hücre hattının JC-1 değeri ise AMH ve östrojen değerleri normal olan grubun değeri ile benzerdi ancak hiçbir grupta arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p>0.016$ ). AMH ve östrojen değerleri düşük olan grubun median değeri 0,1640 ve çeyreklerarası aralığı 0,30 iken AMH ve östrojen değerleri normal olan grubun median değeri ise 0,5802 ve çeyreklerarası aralığı 0,49 olarak saptandı. HGL5 granüloza hücre hattının median değeri ise 0,5570 olarak saptandı (Tablo 4.7.).

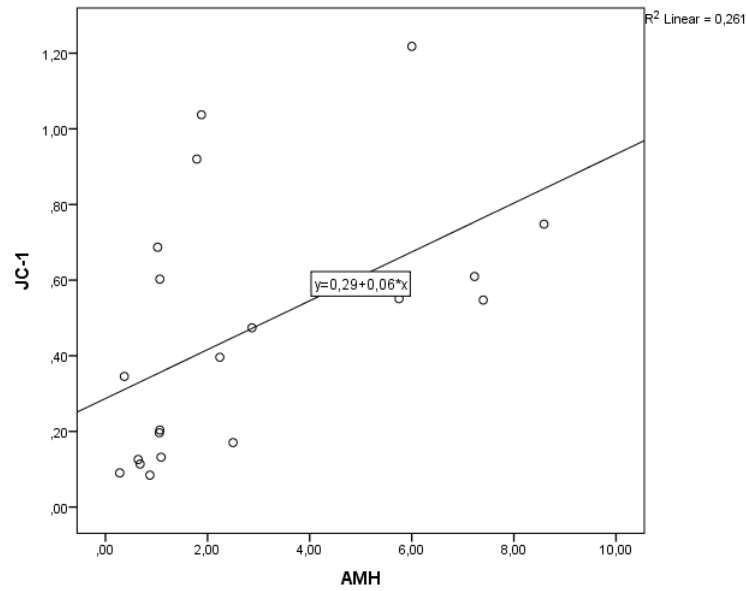
**Tablo 4.7.** AMH ve E2 olan düşük grup, AMH ve E2 normal olan grup ve HGL5 granüloza hücre hattının JC-1 immünofloresan yoğunluğu düzeyleri. AMH ve östrojen değerleri normal olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının JC-1 değeri, AMH ve östrojen değerleri düşük olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının JC-1 değerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $*p<0.016$ ).



JC-1 değeri ve AMH değeri arasında yapılan korelasyon analizinde pozitif yönde yüksek korelasyon gözlemlendi ( $r=0,623$ ) ve istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.8.).

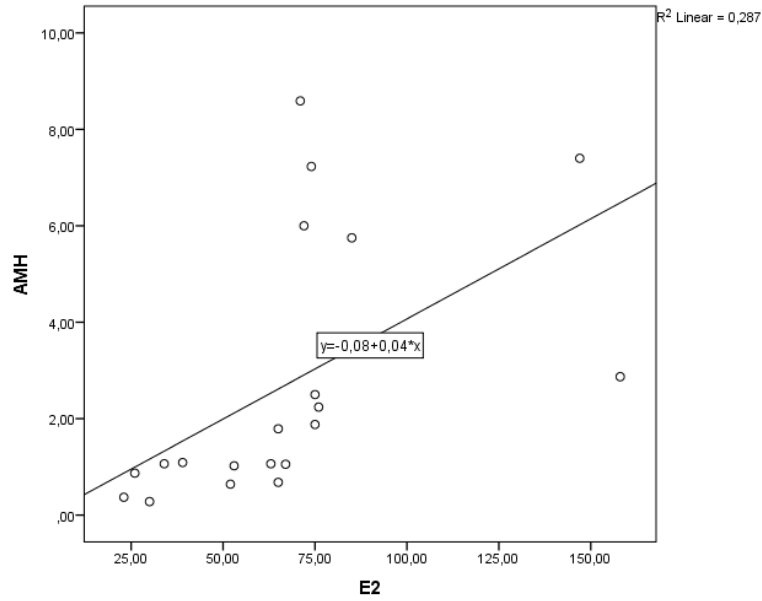
JC-1 değeri ve E2 değeri arasında yapılan korelasyon analizinde korelasyon katsayısı 0,426 olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.8.** JC-1 ile AMH arasındaki korelasyon grafiği.



AMH değeri ve E2 değeri arasında yapılan korelasyon analizinde pozitif yönde yüksek korelasyon gözlemlendi ( $r= 0,797$ ) ve istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ) (Tablo 4.9.).

**Tablo 4.9.** AMH ile E2 arasındaki korelasyon grafiği.



#### 4.5. Granüloza Hücresi Mitokondriyon Morfolojisinin Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi

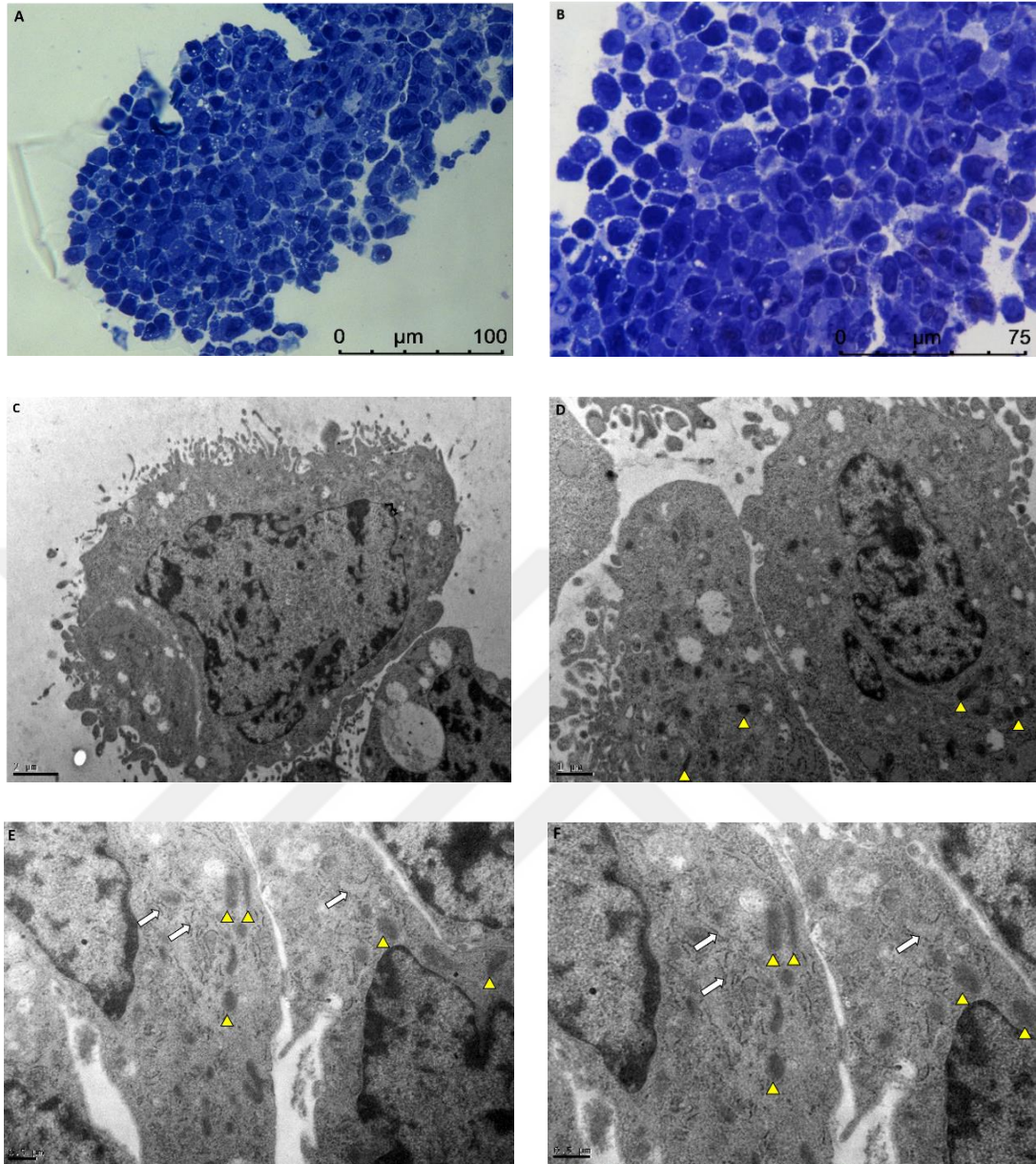
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'nde tedavi gören 20 kadının ve insan granüloza hücre hattı HGL5'in granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının morfolojik özellikleri TEM ile gösterildi.

- 1) HGL5 insan granüloza hücre hattı grubu
- 2) AMH $\geq$ 1.1 $\mu$ g/L ve östrojen $\geq$ 70pg/ml (değerler normal olanlar)
- 3) AMH<1.1 $\mu$ g/L ve östrojen<70pg/ml (değerler düşük olanlar) olmak üzere toplam 3 grupta değerlendirildi.

Üç grubun TEM bulguları kendi aralarında karşılaştırıldı. AMH ve östrojen değerleri normal sınırlarda olanlar (grup 2) ve olmayanların (grup 3) granüloza hücrelerinin TEM bulguları; hastaların kliniğe başvuru anındaki serum AMH ve östrojen değerleri ile karşılaştırıldı.

#### **4.5.1. HGL5 Hücre Hattının Elektron Mikroskopik Özellikleri**

HGL5 granüloza hücre hattı hücrelerinin çekirdekleri ökromatik yapıda izlendi ve invajinasyonlara sahipti. Çekirdekçikler ve nükleer membranın çift zar yapısı ayırt edildi. Nükleer por genişlikleri normaldi. Sitoplazmada yuvarlak ve tübüler yapıda mitokondriyonlar izlendi. Mitokondriyonların membran ve krista yapıları korunmuştu. Sitoplazmada lipid damlacıkları ve yer yer genişlemiş granüllü endoplazma retikulumu (GER) sisternaları izlendi. Hücre sınırları düzenli ve sitoplazma membranı korunmuş idi. Hücreler sitoplazmik uzantılara sahipti.

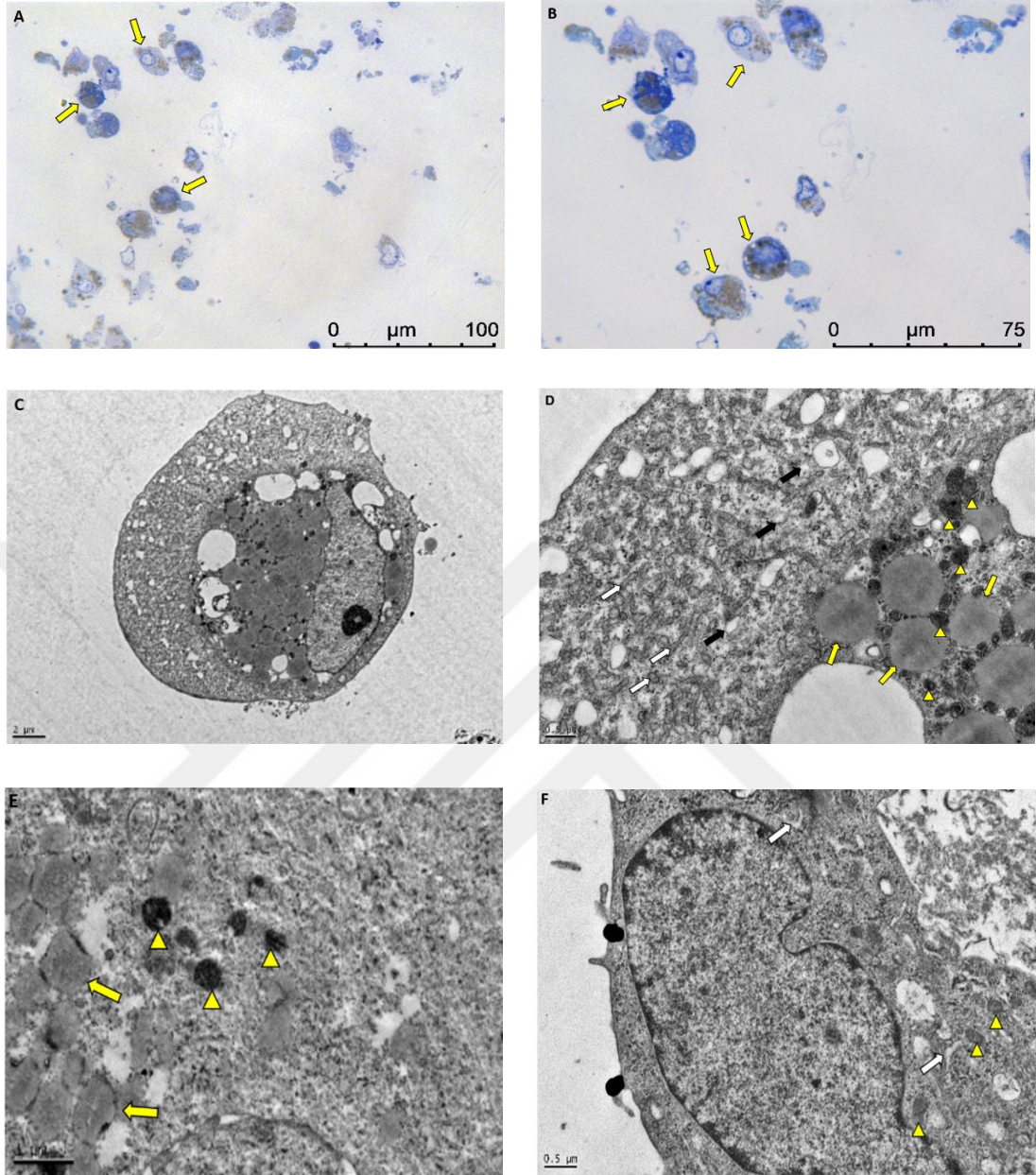


**Şekil 4.5.** HGL5 granüloza hücre hattının *in vitro* kültürü sonrasındaki yarı ince kesit görüntüleri ve elektron mikrografları. Sarı ok başları yuvarlak ve tübüler mitokondriyonları, beyaz oklar ise GER sisternalarını göstermektedir. (A mikrografı x40; B mikrografı x63; C ve E mikrografları 20.000; D mikrografı 12.000; F mikrografı 25.000 büyütmede çekilmiştir.)

#### 4.5.2. AMH ve Östrojen Düzeyi Normal Olan Grubun Morfolojik Özellikleri

AMH ve östrojen düzeyi normal olan grubun hücrelerinin çekirdekleri ökromatik yapıda izlendi ve invajinasyonlara sahipti. Çekirdekçikler izlendi ve nükleer membranın çift zar yapısı korunmuştu. Nükleer por genişlikleri normaldi.

Sitoplazmada yuvarlak ve tübüler yapıda mitokondriyonlar izlendi. Hücreler tübüler mitokondriyondan zengindi. Mitokondriyonların membran yapıları doğaldı ve tübüler-krista yapıları mevcuttu. Sitoplazmada bol miktarda lipid damlacıkları ve çok sayıda düz endoplazma retikulumu (DER) ve granüllü endoplazma retikulumu (GER) sisternaları izlendi. Çekirdek/sitoplazma oranı, sitoplazma lehine artmıştı. Sitoplazma organelden zengindi. Sitoplazma membranı korunmuştu.

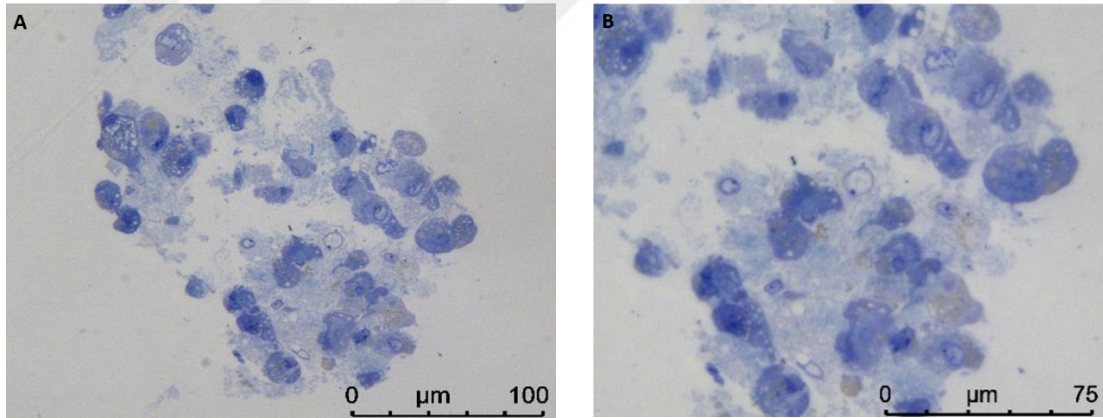


**Şekil 4.6.** AMH ve E2 düzeyi normal olan grubun granüloza hücrelerinin *in vitro* kültürü sonrasındaki yarı ince kesit görüntüleri ve elektron mikrografları. Yarı ince kesitlerdeki sarı oklar lipid damlacıklarından zengin hücreleri göstermektedir. Elektron mikrograflarındaki sarı oklar lipid damlacıklarını, sarı ok başları mitokondriyonları, beyaz oklar GER'leri, siyah oklar ise DER'leri göstermektedir. (A mikrografı x40; B mikrografı x63; C mikrografı 6.000; D ve F mikrografları 25.000; E mikrografı 15.000 büyütmede çekilmiştir.)

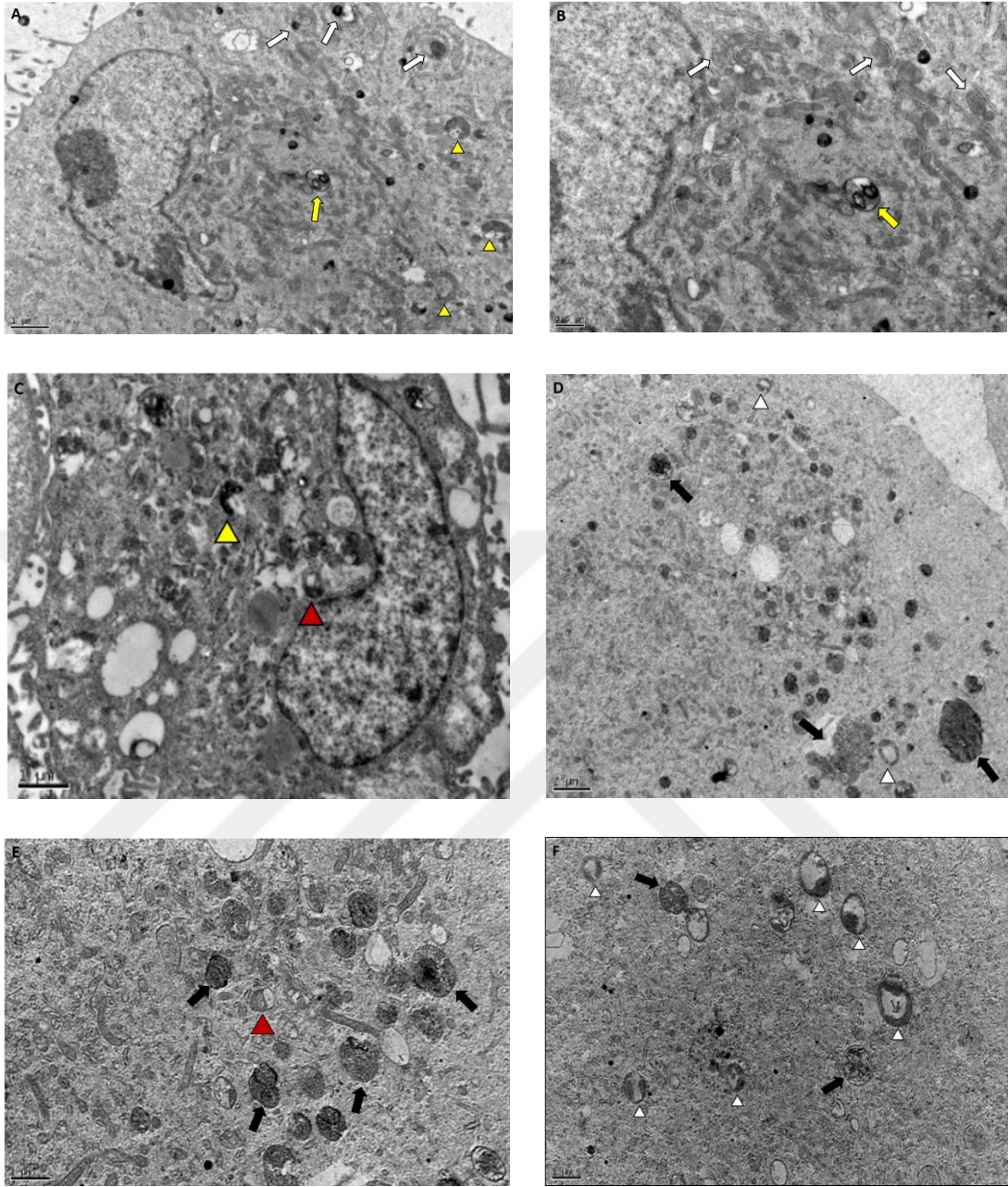
### 4.5.3. AMH ve Östrojen Düzeyi Düşük Olan Grubun Morfolojik Özellikleri

AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grubun hücrelerinin çekirdekleri ökromatik yapıda izlendi ve invajinasyonlara sahipti. Çift çekirdekçikli hücreler gözlemlendi. Nükleer membranın çift zar yapısı korunmuştu ve nükleer por genişlikleri normaldi.

Sitoplazmada anormal yapıda mitokondriyonlar izlendi. C şeklinde, yüzük şeklinde, şapkalı ve şişmiş mitokondriyonlar gözlemlendi. Mitokondriyonlara ER'lerin eşlik etmesi ve miyelin figür yapıları gibi mitofajiye ait bulgular saptandı. Bazı mitokondriyonların krista yapıları bozulmuş izlendi. Sitoplazmada lipid damlacıkları azalmış olarak gözlemlendi, yer yer DER-GER sisternaları mevcuttu. Çekirdek/sitoplazma oranı, sitoplazma lehine artmıştı. Sitoplazma membranı korunmuş olarak değerlendirildi.



**Şekil 4.7.** AMH ve E2 düzeyi düşük olan grubun granüloza hücrelerinin *in vitro* kültürü sonrasındaki yarı ince kesit görüntüleri. (A mikrografı x40; B mikrografı x63 büyütmede çekilmiştir.)



**Şekil 4.8.** AMH ve E2 düzeyi düşük olan grubun granüloza hücrelerinin *in vitro* kültürü sonrasındaki elektron mikrografları. Sarı oklar miyelin figürleri, beyaz oklar ER ile mitokondriyon birlikteliğini, sarı ok başları "C" şeklindeki mitokondriyonları, siyah oklar şişmiş mitokondriyonları, kırmızı ok başları şapkalı mitokondriyonları, beyaz ok başları ise yüzük şeklindeki mitokondriyonları göstermektedir. (A ve E mikrografları 15.000; B mikrografı 25.000; C ve F mikrografları 12.000; D mikrografı 6.000 büyütmede çekilmiştir.)

## 5. TARTIŞMA

Üremeye yardımcı tedavilerde oosit kalitesinin başarılı bir gebelik elde etmek için önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (110, 111). Oosit gelişimi, oosit olgunlaşması, ovulasyon ve fertilizasyon için granüloza hücreleri kritik öneme sahiptir (104). Granüloza hücreleri oosit gelişimi için gerekli mikroçevreyi oluşturur(55). Granüloza hücreleri, kan dolaşımından aldıkları glikozu piruvata metabolize ederler ve bu piruvatı oosite verirler. Oosit aldığı piruvattan, oksidatif fosforilasyon ile ATP elde eder (56). Granüloza hücreleri, folikül büyümesi ve folikül seçiminde önemli rol oynar (105) ve ovulasyon için seçilen oositin hem nükleer hem de sitoplazmik olgunlaşmasını kontrol eder (102). Granüloza hücrelerindeki hücresel değişiklikler, foliküler gelişim sırasında ve ovulasyondan sonra oosit kalitesini etkiler (102). Granüloza hücreleri ve oosit mitokondriyonu, oogenez süresince oosit kompetansı ile direkt ilişkilidirler (57). Granüloza hücrelerinin aktif mitokondriyal metabolizması, başarılı bir gebelik elde etmek için kümülüs-oosit komplekslerinin ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlar. Mitokondriyal dinamiklerin steroidogenez için de önemli olduğu gösterilmiştir (106). MMP'deki değişiklikler hücre canlılığı kaybına ve çeşitli patolojilere sebep olabilirler (62). Membran potansiyelini belirlemek için kullanılan problardan biri olan JC-1 (81, 82) katyonik boyasının mitokondriyal alımı, membran potansiyeli ile direkt ilişkilidir. MMP, mitokondriyon maturasyonunu ölçmek için kullanılmaktadır (75). Liu ve arkadaşlarının çalışmasına göre yaşla birlikte granüloza hücresi mitokondriyon morfolojisi bozulmaktadır ve şişmiş mitokondriyonlar gözlenmektedir. Yaşla birlikte MMP'de azalma da gözlenmiştir (107). Somatik hücre çalışmalarındaki mitokondriyon disfonksiyonu nörolojik hastalıklar, kalp hastalıkları, diyabet hastalığı ve kanser ile ilişkili bulunmuştur (62, 63).

İnsanda Anti-Müllerian Hormon (AMH), gestasyonel dönemin sonundan itibaren granüloza hücreleri tarafından üretilmeye başlanır ve menstrual siklusun foliküler fazında dominant folikül seçiminde potansiyel rol oynar (5). Antral folikülün granüloza hücrelerinden salınan AMH, serumda ölçülebilmektedir. Bu serum AMH düzeyi de ovaryumdaki gelişmekte olan foliküllerin sayısı ile orantılıdır (6). AMH düzeyi, ovaryumdaki antral ve pre-antral folikül sayısı ile koreledir. İn Vitro

Fertilizasyon (İVF)'da ovaryumların hiperstimülasyona cevabını öngörmek için AMH ölçümü yapılmaktadır (36). İnsanda serum AMH düzeyi 24,5 yaşına kadar artmakta iken daha sonra menapoza kadar düzeyi düşmektedir. Menapozdan sonra ise AMH ekspresyonu belirgin olarak düşmekte ve AMH serumda saptanamamaktadır (39). AMH, İVF uygulanan kadınlarda klinik sonuçları tahmin etmek ve tanı koymak için kullanılmaktadır. Serum AMH düzeyi düşük olanlarda (<1ng/ml), daha yüksek olanlara göre (1-4ng/ml) canlı doğum oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir (40). Erkeklerde ise AMH, sertoli hücrelerinde üretilmektedir. Sertoli hücrelerinin ultrastrüktürel incelemesinde sitoplazmada lipid damlacıkları, serbest ribozomlar, iyi gelişmiş golgi cisimciği ve Charcot-Böttcher inklüzyonları gözlenmiştir. İyi gelişmiş tübüler-kristalara sahip çok sayıda mitokondriyon bulunur. Hücrede iyi gelişmiş düz endoplazma retikulumu ve granüllü endoplazmik retikulumu bulunmaktadır (108).

Östrodiol (E2), üreme çağındaki kadınlarda ovaryumdaki granüloza hücrelerinden salgılanmaktadır (GH) ve endokrin olarak çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Başarılı bir gebelik ve blastokist invazyonu için reseptif ve desidualizasyona hazır bir endometriyuma ihtiyaç vardır. İmplantasyon penceresi döneminde hormonal düzenleme, gebeliğin oluşabilmesi için önemlidir. Östrodiol (E2), menstrual siklusun proliferatif fazında endometriyal kalınlığı sağlamak için epitel hücre proliferasyonunu indükler (10). Premenapozal dönemdeki kadınlarda E2 normal değeri "15-350 pg/ml" aralığında olmalıdır (48). Serum E2 düzeyi yaşla azalmaktadır (49).

Çalışmamızda, yardımcı üremeye tedavisine başvuran hastalardan alınan insan granüloza hücrelerinde mitokondriyal aktivite değerlendirildi. AMH ve östrojen düzeyi normal değerlerde olan grup, AMH ve östrojen düzeyi düşük değerlerde olan grup ve insan granüloza hücre hattı HGL5'in mitokondriyon fonksiyonlarını değerlendirmek için MMP'leri ve mitokondriyon morfolojik özellikleri karşılaştırıldı.

AMH ve östrojeni düzeyi normal olan grup ile AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grubun yaş dağılımları incelendiğinde AMH ve östrojen düzeyi düşük değerlerde olan grubun yaş ortalaması diğer gruba göre yüksek bulundu. Bu bulgumuz literatür ile uyumlu idi (40, 50).

JC-1 boyaması ile hasta yaşı arasında ilişki ortaya koyan bir çalışmaya benzer olarak (107) bizim çalışmamızda da granüloza hücrelerinin mitokondriyonların JC-1 immünofloresan işaretleme değerleri ve hastaların yaşı arasında yapılan korelasyon analizinde, yaşla birlikte granüloza hücrelerinin MMP'nin azaldığı gözlemlendi.

JC-1 immünofloresan işaretlemelerinde AMH ve östrojen düzeyi normal olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının membran potansiyelleri, AMH ve östrojen düzeyi düşük olan kadınların granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının membran potansiyellerinden yüksek bulundu.

JC-1 değeri ve AMH değeri arasında yapılan korelasyon analizinde, AMH değeri arttıkça MMP de de artma izlendi. JC-1 değeri ve E2 değeri arasında yapılan korelasyon analizine göre ise, E2 değeri artışı ile MMP arasında ilişki bulunamadı.

İVF çalışmalarında; hCG tarafından tetiklenme gününde, AMH ve E2 arasında negatif korelasyon tespit edilmiş olup AMH düzeyinde belirgin düşüş gözlenmiştir (51). Çalışmamızda ise ÜYTE'ye başvuru anında bakılan serum AMH değeri ve E2 değeri arasında yapılan korelasyon analizinde pozitif yönde yüksek korelasyon gözlemlendi.

Çalışmamızda AMH ve östrojen düzeyi normal olan grubun, AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grubun ve HGL5 granüloza hücre hattının morfolojik özellikleri elektron mikroskobu ile incelendi. Literatürde steroidojenik hücrelerin intraselüler lipid depositleri ve yaygın düz endoplazma retikulumu ile karakterize olduğu bildirilmiştir (109). Granüllü endoplazma retikulumu en çok aktif salgı yapan hücrelerde gelişmiştir çünkü salgı proteinleri sadece GER ribozomları tarafından sentezlenmektedirler (22). Ultrastrüktürel çalışmalarda granüloza hücrelerinin sitoplazması organelden zengin ve çok sayıda mitokondriyon içerdiği belirtilmiştir. Mitokondriyonlar çubuk şeklinde veya uzamış gözlemlenmiştir ve tübüler-veziküler kristaya sahiptir. Granüloza hücresi sitoplazmasında düz endoplazma retikulumu (DER), golgi cisimciği, granüllü endoplazma retikulumu (GER) sisternaları, serbest ribozomlar ve polizomlar, lizozomlar, mikofilamanlar ve lipid damlacıkları bulunur (110).

HGL5 granüloza hücre hattında yapılan elektron mikroskobu incelemesinde; literatür ile uyumlu olarak sitoplazmada yuvarlak ve tübüler yapıda mitokondriyonlar izlendi. Mitokondriyonların membran ve krista yapıları korunmuştu. Sitoplazmada lipid damlacıkları ve yer yer genişlemiş GER sisternaları izlendi.

Çalışmamızda AMH ve östrojen düzeyi normal olan grupta; literatür ile uyumlu olarak sitoplazmada yuvarlak ve tübüler yapıda mitokondriyonlar izlendi. Hücreler tübüler mitokondriyondan zengindi. Mitokondriyonların membran yapıları korunmuştu ve tübüler-krista yapıları mevcuttu. Sitoplazmada bol miktarda lipid damlacıkları ve çok sayıda düz endoplazma retikulumu (DER) ve granüllü endoplazma retikulumu (GER) sisternaları izlendi. Sitoplazma organelden zengindi.

Literatüre göre mitokondriyal membran potansiyeli kaybının, mitokondriyonda dramatik yapısal değişiklikleri tetiklediği ve şişmiş (111) veya yüzük/halka mitokondriyon yapıları gözleendiği bildirilmiştir. Reoksijenasyon, hipoksi ve yaşlanma gibi oksidatif stres ile giden patolojik durumlarda dokularda C-, U- veya O-şekilli (halka şeklinde) (95) ve şapkalı mitokondriyon (96) varlığı elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Bu nedenle, yüzük şeklindeki mitokondriyon, mitokondriyal stresin tipik ayırt edici özelliği olarak kabul edilmektedir (95). Çalışmamızda AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grupta; granüloza hücrelerinde sitoplazmada anormal yapıda mitokondriyonlar izlendi. Mitokondriyonlar C şeklinde, yüzük şeklinde, şişmiş ve şapkalı mitokondriyon yapısında olarak gözleendi. Mitokondriyonlara ER'lerin eşlik etmesi ve miyelin figür yapıları gibi mitofajiye ait bulgular mevcuttu. Bazı mitokondriyonların krista yapıları bozulmuştu. Sitoplazmada lipid damlacıkları az miktardaydı. DER-GER sisternaları normal görünümde ve azdı. Bu bulgularımız literatüre göre MMP düşük olan hücrelerin morfolojisi ile uyumluydu.

Urs ve arkadaşlarının çalışmasında endometriozis hastalarının granüloza hücrelerinin E2 düzeyi ve mitokondriyon aktivitesi ilişkisi incelenmiş ve E2 düzeyi düşük olan grupta mitokondriyal disfonksiyon olduğu rapor edilmiştir (112). Kitajima ve arkadaşlarının çalışmasına göre endometriozisli hastalarda peritoneal sıvı AMH düzeyi, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Endometriozisi olan ve

olmayanların serum AMH düzeyleri ise benzer bulunmuştur (113). Bizim çalışmamızda literatüre katkı olarak infertilite nedeniyle ÜYTE'ye başvuran ve herhangi bir ek hastalığı olmayan kadınlarda mitokondriyon aktivitesi ile serum AMH ve E2 arasında korelasyon bulundu. AMH ve E2 düzeyi düşük olan grupta mitokondriyal membran potansiyeli düşük ve mitokondriyon morfolojisi bozuk olarak gözlemlendi.

Günümüzde fertilité sorunları olan ve bebek sahibi olmak için ÜYTE laboratuvarına başvuran hasta sayısı hızla artmaktadır. Bu yüzden fertilité sorunları son yılların önemli bir araştırma konusudur. ÜYTE hastalarında granüloza hücresi mitokondriyon fonksiyonunun AMH ve östrojen üretimindeki etkisinin ortaya konması, ÜYTE stratejilerini geliştirmek ve ÜYTE sonuçlarını iyileştirmek açısından önemlidir, bu alanda yapılacak ileri çalışmalara veri sağlayacaktır.

## 6. SONUÇLAR

1. AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grubun yaş ortancası, AMH ve östrojen düzeyi normal olan gruba göre yüksektir.
2. Yaş artışı ile birlikte granüloza hücrelerinin mitokondriyonlarının membran potansiyelleri azalmıştır.
3. AMH ve östrojen düzeyi normal olan kadınların granüloza hücrelerinin MMP, AMH ve östrojen düzeyi düşük olan kadınların granüloza hücrelerinin MMP'den yüksektir.
4. AMH değeri arttıkça MMP de artmaktadır. E2 değeri artışı ile MMP arasında ise ilişki bulunamamıştır.
5. HGL5 granüloza hücre hattında yapılan elektron mikroskobu incelemesinde; sitoplazmada yuvarlak ve tübüler yapıda mitokondriyonlar izlenmiştir. Mitokondriyonların membran ve krista yapıları korunmuştur. Sitoplazma lipid damlacıkları içermektedir.
6. AMH ve östrojen düzeyi normal olan grupta yapılan elektron mikroskobu incelemesinde; sitoplazmada yuvarlak ve tübüler yapıda mitokondriyonlar izlenmiştir. Hücreler tübüler mitokondriyondan zengindir. Mitokondriyonların membran yapıları korunmuştur ve tübüler-krista yapıları mevcuttur. Sitoplazma bol miktarda lipid damlacıkları içermektedir.
7. AMH ve östrojen düzeyi düşük olan grupta yapılan elektron mikroskobu incelemesinde; MMP düşük olan hücrelerin morfolojisi ile uyumlu olarak granüloza hücrelerinde sitoplazmada C şeklinde, yüzük şeklinde, şişmiş ve şapkalı mitokondriyonlar mevcuttur. Bazı mitokondriyonların krista yapıları bozulmuştur. Sitoplazmada az miktarda lipid damlacıkları bulunmaktadır.
8. AMH ve E2 düzeyi düşük olan grupta mitokondriyal membran potansiyeli düşük ve mitokondriyon morfolojisi bozuk olarak gözlemlendi.
9. İnfertilite nedeniyle ÜYTE'ye başvuran ve herhangi bir ek hastalığı olmayan kadınlarda granüloza hücresi mitokondriyon aktivitesi ile serum AMH ve E2 arasında ilişki olduğu bulundu.

## 7. KAYNAKLAR

1. Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*. 2016;22(6):709–24.
2. Desquirit-Dumas V, Clément A, Seegers V, Boucret L, Ferré-L’Hotellier V, Bouet PE, et al. The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality. *Human Reproduction*. 2017;32(3):607–14.
3. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*. 1986 Jun 6;45(5):685–98.
4. Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: A new marker for ovarian function. Vol. 131, *Reproduction*. 2006. p. 1–9.
5. Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. In: *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd; 2005. p. 81–6.
6. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, Van De Lang-Born BMN, De Jong FH, Groome NP, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology*. 2006;147(7):3228–34.
7. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. Vol. 19, *Molecular Human Reproduction*. 2013. p. 828–37.
8. Shrikhande L, Shrikhande B, Shrikhande A. AMH and Its Clinical Implications. Vol. 70, *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. Springer; 2020. p. 337–41.
9. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45(3):S116–24.
10. Marquardt RM, Kim TH, Shin JH, Jeong JW. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15):3822.
11. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. Vol. 7, *Nutrition and Metabolism*. 2010.
12. Benkhalifa M, Ferreira YJ, Chahine H, Louanjli N, Miron P, Merviel P, et al. Mitochondria: Participation to infertility as source of energy and cause of senescence. Vol. 55, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2014. p. 60–4.
13. Zhao J, Li Y. Adenosine triphosphate content in human unfertilized oocytes, undivided zygotes and embryos unsuitable for transfer or cryopreservation. *The Journal of international medical research*. 2012;40(2):734–9.

14. Liu Y, Han M, Li X, Wang H, Ma M, Zhang S, et al. Age-related changes in the mitochondria of human mural granulosa cells. *Human Reproduction*. 2017;32(12):2465–73.
15. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*. 2017 Sep 1;108(3):393–406.
16. Jenkins J, Daya S, Kremer J, Balasch J, Barratt C, Cooke I, et al. European Classification of Infertility Taskforce (ECIT) response to Habbema et al., “Towards less confusing terminology in reproductive medicine: A proposal.” *Human Reproduction*. 2004;19(12):2687–8.
17. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*. 2012;9(12):1–12.
18. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015 Dec 12;13(1):37.
19. Marca A La. Epidemiology and etiology. Springer Nature Switzerland AG 2020 F Petraglia, B CJM Fauser (eds), *Female Reproductive Dysfunction*, Endocrinology. 2020;
20. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. Vol. 36, *Endocrine Reviews*. Endocrine Society; 2015. p. 1–24.
21. Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2016 Jun 1;58:167–90.
22. Pawlina W RMH. Pawlina W, Ross MH. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*: Lippincott Williams & Wilkins. 2018.
23. Ford EA, Beckett EL, Roman SD, McLaughlin EA, Sutherland JM. Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. Vol. 159, *Reproduction*. BioScientifica Ltd.; 2020. p. R15–29.
24. Magoffin DA. Ovarian theca cell. Vol. 37, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2005. p. 1344–9.
25. Zeleznik AJ. Follicle selection in primates: “Many are called but few are chosen.” In: *Biology of Reproduction*. Society for the Study of Reproduction; 2001. p. 655–9.
26. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. Vol. 30, *Endocrine Reviews*. Oxford Academic; 2009. p. 624–712.
27. HSUEH AJW, BILLIG H, TSAFRIRI A. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process\*. *Endocrine Reviews*. 1994 Dec 1;15(6):707–24.
28. Richards JAS, Pangas SA. New insights into ovarian function. Vol. 198, *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2010. p. 3–27.

29. Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2016 Jun 1;58:167–90.
30. Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. Ovulation: Parallels with inflammatory processes. Vol. 40, *Endocrine Reviews*. Oxford University Press; 2019. p. 369–416.
31. Crespo RP, Bachega TASS, Mendonça BB, Gomes LG. An update of genetic basis of PCOS pathogenesis. Vol. 62, *Archives of Endocrinology and Metabolism*. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2018. p. 352–61.
32. Lim JJ, Lima PDA, Salehi R, Lee DR, Tsang BK. Regulation of androgen receptor signaling by ubiquitination during folliculogenesis and its possible dysregulation in polycystic ovarian syndrome. *Scientific Reports*. 2017 Dec 1;7(1).
33. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. Vol. 17, *Endocrine Reviews*. Endocrine Society; 1996. p. 121–55.
34. Yamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Hormone Research in Paediatrics*. 1992;37:5–11.
35. Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. Vol. 19, *Reproductive Medicine and Biology*. John Wiley and Sons Ltd; 2020. p. 13–23.
36. Sonigo C, Beau I, Binart N, Grynberg M. Anti-Müllerian Hormone in Fertility Preservation: Clinical and Therapeutic Applications. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*. 2019;13:117955811985475.
37. Bedenk J, Vrtačnik-Bokal E, Virant-Klun I. Role of anti M hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019;
38. Zhan Y, Fujino A, MacLaughlin DT, Manganaro TF, Szotek PP, Arango NA, et al. Müllerian inhibiting substance regulates its receptors/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Müllerian duct regression. *Development*. 2006 Jun;133(12):2359–69.
39. Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001 Jun 20;179(1–2):25–32.
40. Goswami M, Nikolaou D. Is AMH Level, Independent of Age, a Predictor of Live Birth in IVF? *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2017 Jan 1;10(1):24–30.
41. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction*. 2004 Feb;10(2):77–83.

42. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001;142(11):4891–9.
43. Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, et al. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012 Aug;97(8).
44. Hamilton KJ, Hewitt SC, Arao Y, Korach KS. Estrogen Hormone Biology. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press Inc.; 2017. p. 109–46.
45. *The Role of Estrogen in Brain and Cognitive Aging.pdf*.
46. Stocco C. Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation. Vol. 73, *Steroids*. NIH Public Access; 2008. p. 473–87.
47. Gray SA, Mannan MA, O’Shaughnessy PJ. Development of cytochrome P450 aromatase mRNA levels and enzyme activity in ovaries of normal and hypogonadal (hpg) mice. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1995;14(3):295–301.
48. EEST - Clinical: Estradiol, Serum [Internet]. [cited 2019 Dec 19]. Available from: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/81816>
49. Wilkinson HN, Hardman MJ. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. *Maturitas*. 2017;103:60–4.
50. Lashen H, Dunger DB, Ness A, Ong KK. Peripubertal changes in circulating antimüllerian hormone levels in girls. *Fertility and Sterility*. 2013 Jun;99(7):2071–5.
51. Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY, Suh CS, et al. Anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction. *Human Reproduction*. 2010 Oct 1;25(10):2597–604.
52. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. In: *Animal Reproduction Science*. Elsevier; 2004. p. 431–46.
53. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*. 2008;14(2):159–77.
54. Dumesic DA, Guedikian AA, Madrigal VK, Phan JD, Hill DL, Alvarez JP, et al. Cumulus cell mitochondrial resistance to stress in vitro predicts oocyte development during assisted reproduction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016 May 1;101(5):2235–45.
55. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. Vol. 139, *Reproduction*. *Reproduction*; 2010. p. 685–95.

56. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. Vol. 139, *Reproduction*. 2010. p. 685–95.
57. Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: Paracrine regulation of cumulus cell metabolism. Vol. 27, *Seminars in Reproductive Medicine*. Semin Reprod Med; 2009. p. 32–42.
58. Paczkowski M, Silva E, Schoolcraft WB, Krisher RL. Comparative Importance of Fatty Acid Beta-Oxidation to Nuclear Maturation, Gene Expression, and Glucose Metabolism in Mouse, Bovine, and Porcine Cumulus Oocyte Complexes<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 2013 May 1;88(5).
59. Jacobson J, Duchon MR. Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. Vols. 256–257, *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer Netherlands; 2004. p. 209–18.
60. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical Control Points. Vol. 116, *Cell*. Cell Press; 2004. p. 205–19.
61. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol; 2007. p. 870–9.
62. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*. 2018 Jul 1;552:50–9.
63. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457–65.
64. Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biology of Reproduction*. 2010;83(1):52–62.
65. St. John JC, Facucho-Oliveira J, Jiang Y, Kelly R, Salah R. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: A journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. Vol. 16, *Human Reproduction Update*. Hum Reprod Update; 2010. p. 488–509.
66. Pyle A, Hudson G, Wilson IJ, Coxhead J, Smertenko T, Herbert M, et al. Extreme-Depth Re-sequencing of Mitochondrial DNA Finds No Evidence of Paternal Transmission in Humans. Larsson NG, editor. *PLOS Genetics*. 2015 May 14;11(5):e1005040.
67. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R, Jansen R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. In: *Human Reproduction*. Oxford University Press; 2000. p. 129–47.
68. Meldrum DR, Casper RF, Diez-Juan A, Simon C, Domar AD, Frydman R. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: Can we intervene? Vol. 105, *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2016. p. 548–59.

69. Schatten H, Sun QY, Prather R. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):1–11.
70. May-Panloup P, Boucret L, de la Barca JMC, Desquiret-Dumas V, Ferré-L'Hotellier V, Morinière C, et al. Ovarian ageing: The role of mitochondria in oocytes and follicles. *Human Reproduction Update*. 2016;22(6):725–43.
71. Ge H, Tollner TL, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, et al. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*. 2012 Jun;79(6):392–401.
72. Schatten H, Sun QY. New insights into the role of centrosomes in mammalian fertilization and implications for ART. Vol. 142, *Reproduction*. BioScientifica; 2011. p. 793–801.
73. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: A mystery solved? *Frontiers in Physiology*. 2013;4 MAY.
74. Hom JR, Quintanilla RA, Hoffman DL, de Mesy Bentley KL, Molkentin JD, Sheu SS, et al. The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Developmental Cell*. 2011 Sep 13;21(3):469–78.
75. Wilding M, Dale B, Marino M, Di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 2001;16(5):909–17.
76. Ou XH, Li S, Wang ZB, Li M, Quan S, Xing F, et al. Maternal insulin resistance causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. *Human Reproduction*. 2012 Jul 1;27(7):2130–45.
77. Chappel S. The Role of Mitochondria from Mature Oocyte to Viable Blastocyst. *Obstetrics and Gynecology International*. 2013;2013:1–10.
78. Luo SM, Ge ZJ, Wang ZW, Jiang ZZ, Wang ZB, Ouyang YC, et al. Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Aug 6;110(32):13038–43.
79. Luo SM, Schatten H, Sun QY. Sperm mitochondria in reproduction: Good or bad and where do they go? Vol. 40, *Journal of Genetics and Genomics*. J Genet Genomics; 2013. p. 549–56.
80. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: Relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction*. 2000 Dec 1;15(12):2621–33.
81. Cotterill M, Harris SE, Fernandez EC, Lu J, Huntriss JD, Campbell BK, et al. The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis in

- vivo and during oocyte maturation in vitro. *Molecular Human Reproduction*. 2013 Jul 5;19(7):444–50.
82. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: Causes and consequences. Vol. 21, *Physiology*. Physiology (Bethesda); 2006. p. 29–37.
  83. Katayama M, Zhong Z, Lai L, Sutovsky P, Prather RS, Schatten H. Mitochondrial distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: Implications for developmental potential. *Developmental Biology*. 2006 Nov 1;299(1):206–20.
  84. Calarco PG. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. Vol. 16, *Developmental Genetics*. Dev Genet; 1995. p. 36–43.
  85. Ai JS, Li M, Schatten H, Sun QY. Regulatory mechanism of spindle movements during oocyte meiotic division. Vol. 22, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. Asian-Australasian Association of Animal Production Societies; 2009. p. 1477–86.
  86. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006 Jan 7;65(1):126–36.
  87. Schatten H, Sun QY. Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation. Vol. 78, *Molecular Reproduction and Development*. 2011. p. 757–68.
  88. El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, St. John JC. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*. 2006 Feb;131(2):233–45.
  89. Krisher RL, Prather RS. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: Metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Molecular Reproduction and Development*. 2012 May;79(5):311–20.
  90. Redel BK, Brown AN, Spate LD, Whitworth KM, Green JA, Prather RS. Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Molecular Reproduction and Development*. 2012 Apr;79(4):262–71.
  91. Schatten H, Prather RS, Sun QY. The significance of mitochondria for embryo development in cloned farm animals. Vol. 5, *Mitochondrion*. Mitochondrion; 2005. p. 303–21.
  92. Eichenlaub-Ritter U, Wiecek M, Lüke S, Seidel T. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. Vol. 11, *Mitochondrion*. Mitochondrion; 2011. p. 783–96.
  93. Larsson NG. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annual Review of Biochemistry*. 2010 Jun 7;79(1):683–706.
  94. Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. Vol. 232, *Experimental Biology and Medicine*. SAGE Publications; 2007. p. 592–606.

95. Miyazono Y, Hirashima S, Ishihara N, Kusukawa J, Nakamura KI, Ohta K. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–14.
96. Belli M, Zhang L, Liu X, Donjacour A, Ruggeri E, Palmerini MG, et al. Oxygen concentration alters mitochondrial structure and function in in vitro fertilized preimplantation mouse embryos. *Human Reproduction*. 2019;34(4):601–11.
97. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry*. 2012;393(7):547–64.
98. Lin CH, Chang LW, Wei YH, Wu SB, Yang CS, Chang WH, et al. Electronic microscopy evidence for mitochondria as targets for Cd/Se/Te-based quantum dot 705 toxicity in vivo. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2012;28(7 SUPPL.):53–62.
99. Pacchiarotti A, Iaconianni P, Caporali S, Vitillo M, Meledandri M, Monaco G, et al. Severe endometriosis: low value of AMH did not affect oocyte quality and pregnancy outcome in IVF patients. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020;24(22):11488–95.
100. Liu Y, Han M, Li X, Wang H, Ma M, Zhang S, et al. Age-related changes in the mitochondria of human mural granulosa cells. *Human Reproduction*. 2017;32(12):2465–73.
101. Liu Y, Han M, Li X, Wang H, Ma M, Zhang S, et al. Age-related changes in the mitochondria of human mural granulosa cells. *Human Reproduction*. 2017 Dec 1;32(12):2465–73.
102. Karakoc Sokmensuer L, Kaymaz FF. Ultrastructural analysis of granulosa cells of IVF patients. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*. 2015;42(5):629–33.
103. Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. In: *Fertility and Sterility*. Elsevier; 2013. p. 979–97.
104. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, De Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. Vol. 61, *Molecular Reproduction and Development*. Mol Reprod Dev; 2002. p. 414–24.
105. Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Leung Y, Arfuso F, Dharmarajan A. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle-A changing view. Vol. 9, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
106. Castillo AF, Orlando U, Helfenberger KE, Poderoso C, Podesta EJ. The role of mitochondrial fusion and StAR phosphorylation in the regulation of StAR activity and steroidogenesis. Vol. 408, *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd; 2014. p. 73–9.
107. Liu Y, Han M, Li X, Wang H, Ma M, Zhang S, et al. Age-related changes in the mitochondria of human mural granulosa cells. *Human Reproduction*. 2017 Dec 1;32(12):2465–73.

108. Lebelo SL, van der Horst G. The ultrastructure of the Sertoli cell of the vervet monkey, *Chlorocebus aethiops*. *Tissue and Cell*. 2010;42(6):348–54.
109. Shoham Z, Schachter M. Estrogen biosynthesis - Regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertility and Sterility*. 1996;65(4):687–701.
110. Karakoc Sokmensuer L, Kaymaz FF. Ultrastructural analysis of granulosa cells of IVF patients. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2015;42(5):629–33.
111. Wakabayashi T, Spodnik JH. Structural changes of mitochondria during free radical-induced apoptosis. *Folia Morphologica*. 2000;59(2):61–75.
112. Urs DBS, Wu WH, Komrskova K, Postlerova P, Lin YF, Tzeng CR, et al. Mitochondrial function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and female fertility. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 May 2;21(10):3592.
113. Kitajima M, Matsumoto K, Murakami N, Kajimura I, Harada A, Kitajima Y, et al. AMH Concentrations in Peritoneal Fluids of Women With and Without Endometriosis. *Frontiers in Surgery*. 2020 Nov 11;7.