



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

FOLLİKÜLER SIVI OKSİDATİF STRESİN IVF SONUÇLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr.ÖZGÜR BİGE

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2008



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

FOLLİKÜLER SIVI OKSİDATİF STRESİN IVF SONUÇLARI ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÖZGÜR BİGE

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: Prof. Dr. BÜLENT GÜLEKLİ

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2007. KB. SAG. 020
sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
ÇİZELGE LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖNSÖZ.....	VIII
1.ÖZET.....	1
2.SUMMARY.....	3
3.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4.GENEL BİLGİLER.....	8
4.1.İN VİTRO FERTİLİZASYON.....	8
4.1.1. Tarihçesi.....	8
4.1.2. İn Vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi Endikasyonları.....	8
4.1.3. Uygulama Teknikleri.....	9
4.1.3.1. Hastanın Hazırlanması.....	9
4.1.3.2. Laboratuvar işlemleri.....	9
4.2.OOGENEZİS.....	10
4.2.1.Foliküler Gelişim.....	10
4.3.OOSİT MATURASYONU.....	12
4.3.1. Nükleer Maturasyon.....	13
4.3.2. Sitoplâzma Maturasyonu.....	15
4.4. EMBRİYONER GELİŞİM.....	15
4.4.1. Erken Embriyoner Gelişim.....	15
4.4.2. Morula ve Blastokist Gelişimi.....	17
4.5. HÜCRESEL ENERJİ ÜRETİMİ, REAKTİF TÜRLERİN OLUŞUMU.....	17
4.5.1. Hücresel Enerji Üretimi.....	17
4.5.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu.....	18
4.5.3. Reaktif Nitrojen Türlerinin Oluşumu.....	19

4.6. OOSİT REDOKS HEMOZTAZI.....	21
4.7. OKSİDATİF/NİTROZATİF STRES BELİRTEÇLERİ.....	23
4.7.1. Malondialdehit.....	23
4.7.2. Protein Karbonil.....	23
4.7.3. Nitrik Oksit.....	24
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	25
5.1. Ovaryan Stimulasyon Protokolü.....	25
5.2. Oosit ve Folliküler Sıvı Toplama İşlemi.....	25
5.3. Oositlerin Elde Edilmesi, Takibi, Morfolojik Değerlendirilmesi ve ICSI.....	26
5.4. Fertilizasyon, Klivaj ve Embriyo Kalitesi.....	27
5.5. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Ölçülmesi.....	28
5.5.1. Malondialdehit.....	28
5.5.2. Protein Karbonil.....	30
5.5.3. Nitrik Oksit.....	33
5.6. İstatiksel Analiz.....	38
6. BULGULAR.....	39
7. TARTIŞMA.....	53
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
9. KAYNAKLAR.....	64

TABLO LİSTESİ

Tablo-I: Reaktif oksijen türleri.....	19
Tablo-II: Reaktif nitrojen türleri.....	21
Tablo -III: Hastaların infertilite nedenleri, hasta sayıları ve çalışma için alınan follikül Sayıları.....	39
Tablo- IV: Follikül sıvılarının MDA, Nitrit/Nitrat ve protein karbonil düzeyleri.....	40
Tablo-V: Çalışma grubu ile genel hasta grubunun karşılaştırılması.....	41
Tablo -VI: Normal ve anormal sitoplazmalı oosit elde edilen folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	42
Tablo-VII: Oositlerin nükleer maturasyonlarına göre oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	42
Tablo-VIII: Fertilizasyona göre folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri....	43
Tablo-IX: Bölünmeye devam eden ve devam etmeyen embriyoların ait oldukları folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	43
Tablo-X: Erken klivaj olan ve olmayan embriyoların ait oldukları folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	44
Tablo-XI: İkinci gün embriyo kalitesine göre folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	44
Tablo-XII: Üçüncü gün embriyo kalitesine göre follikül sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	45
Tablo -XIII: 35 yaş sınır değerine göre oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	45
Tablo-XIV(a): PCOS, PCO ve diğer hastaların oksidatif stres düzeyleri.....	46
Tablo-XIV-b: PCOS ve PCO gruplarının karşılaştırılması.....	47
Tablo-XV: PCOS dışındaki hastalarda elde edilen oosit sayısı sınır değerlerine göre oksidatif stres belirteç düzeyleri.....	48
Tablo-XVI: Fertilizasyon ile follikül sıvıları oksidatif stres düzeyleri (PCOS çıkarılmıştır).....	49
Tablo-XVII: Üçüncü gün embriyo kalitesine göre oksidatif stres düzeyleri (PCOS çıkarılmıştır).....	50
Tablo-XVIII: Hastaların gebelik durumuna göre oksidatif stres belirteç düzeylerinin karşılaştırılması.....	51
Tablo-XIX: Hastaların gebelik durumuna göre özelliklerinin karşılaştırılması.....	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil -I: Ovaryan siklus.....	10
Şekil-II: Matür follikül.....	11
Şekil-III: Birinci mayoz bölünmenin birinci evresi (Profaz 1).....	13
Şekil-IV: Mayoz ve mitoz arasındaki fark.....	13
Şekil-V: İkinci mayoz bölünme.....	14
Şekil-VI: Matür oosit ve polar cisimcik.....	14
Şekil-VII: Fertilize olmuş oositler.....	16
Şekil-VIII: Reaktif nitrojen türlerinin oluşumu.....	20
Şekil-IX: Redoks hemostazı.....	22
Şekil-X: MDA'nın N-metil-2-fenilindol ile reaksiyon vermesi sonucu karbosiyanin bileşiği oluşumu.....	29
Şekil-XI: 2,4-dinitrofenilhidrazin ile proteinin karbonil grubunun tepkimesinden oluşan hidrazon ürünü.....	31
Şekil-XII: Nitratın Azo türevine dönüştürüldüğü iki basamaklı mekanizma	34
Şekil-XIII: Fertilizasyon ve MDA için yapılan ROC Eğrisi.....	49
Şekil-XIV: Embriyo kalitesi için yapılan ROC Eğrisi.....	51

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge-I: MDA-586 standart eğrisini çizmek için önerilen miktarlar.....	29
Çizelge-II: Nitrit/Nitrat standart hazırlama çizelgesi.....	35
Çizelge-III: Nitrit konsantrasyonu belirlemek için hazırlanan stok çizelgesi.....	36

KISALTMALAR

- ADP:** Adenozin Difosfat
- ART:** Yardımcı Üreme Tekniği
- ATP:** Adenozin Trifosfat
- BHT:** Bütile hidroksitoluen
- CA:** Doğrulanmış Absorbans
- CAT:** Katalaz
- cGMP:** Siklik Guanozin Monofosfat
- DNPH:** 2,4-Dinitrofenilhidrazin
- E₂:** Östrojen
- ET:** Embriyo Transferi
- FADH₂:** Redükte Flavın Adenin Dinükleotid
- FSH:** Follikül Stimule Edici Hormon
- GnRH:** Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
- GV:** Germinal Vezikül
- GVBD:** Germinal Vezikülün Yıkılması
- H₂O₂:** Hidrojen Peroksit
- HO[·]:** Hidroksil
- hCG:** İnsan Koryonik Gonadotropin
- HCL:** Hidroklorik Asit
- HNE:** 4-Hidroksialkallenallerin
- ICSI:** İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonunu
- IVF:** İn Vitro Fertilizasyon
- KOH:** Kontrollü Ovaryan Hiperstimulasyon

LDH: Laktat Dihidrojenaz
MDA: Malondialdehit
MI: Metafaz I
MII: Metafaz II
NAD: Okside Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NMPI: N-Metil-2-Fenilindol
NO: Nitrik Oksit
NO: Nitrit/Nitrat
NO₂: Nitrit
NO₃⁻: Nitrat
NOS: Nitrik Oksit Sentetazlar
NPD: Negatif Prediktif Değer
O⁻: Süperoksit
OPU: Yumurta Toplam İşlemi
Ort: Ortalama
PCO: Polikistik Over
PCOS: Polikistik Over Sendromu
PPD: Pozitif Prediktif Değer
ROS: Reaktif Oksijen Türevleri
RNS: Reaktif Nitrojen Türevleri
SeGPx: Glutatyon Peroksidaz
SH: Standart Hata
SOD: Süperoksit Dismutaz

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TCA: Trikloroasetikasit

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyon

TMOP: Tetrametoksiopropan

ÖNSÖZ

Oksidatif stres ile üreme fizyolojisinin ilişkisi son yıllarda birçok bilim adamının ilgisini çekmektedir. Oksidatif stresin erkek üreme fizyolojisi ile ilişkisini inceleyen birçok çalışma yayınlanmış olmasına rağmen, günümüze kadar kadın üreme fizyolojisi ve yardımcı üreme teknikleri ile olan ilişkiyi irdeleyen yeterli sayıda ve kalitede çalışma mevcut değildir. İnsanın kendini vücudunu tanımadaki destansı macerasına bir paragraf da kendimizin açabilmesi dileğiyle bu tez projesi gerçekleştirildi. Bu maceranın içerisinde küçük bir nokta olmak bile büyük bir onur verir.

Bazı insanlara duyduğum minnettarlığın sebeplerini açıklamak isterim. Adil davranmadıklarım beni hoş görsünler. Bu zahmetli, uzun soluklu ve günümüz şartlarına göre yüksek maliyetli çalışmanın gerçekleştirilmesinde bir kişi var ki; konu üzerine derin literatür bilgisi, kuramsal sorunları kolaylıkla kavraması ve çözümlemesi, hiç bitmeyen dinamizmi ve moral desteği ile benim için vazgeçilmez olmuştur. Konuları ele alış tarzımı nazikçe fakat ısrarla eleştirerek beni geliştiren Sayın Prof. Dr. Bülent Gülekli' ye bana verdiği emek, zaman ve gösterdiği sınırsız sabır için şükran borçluyum.

Her zaman mensubu olmaktan gurur duyduğum Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına ve yetişmemde emekleri geçen, kendilerinden dersler almakla övündüğüm, bilimsellik, akademik anlayış ve yaşama dair sosyaliteler adına birçok bilgi, tutum ve davranışlar kazandığım Sayın Hocalarım Prof. Dr. Oktay Erten, Prof. Dr. Berrin Acar, Prof. Dr. Ata Önvural, Prof. Dr. Namık Demir, Prof. Dr. Cemal Posacı, Prof. Dr. Turhan Uslu, Prof. Dr. Murat Celiloğlu, Prof. Dr. Yakup Erata, Doç. Dr. Uğur Saygılı, Doç. Dr. Sabahattin Altunyurt, Doç. Dr. Serkan Güçlü, Doç. Dr. Ömer Erbil Doğan, Öğr. Gör. Dr. Bahadır Saatli ve Öğr. Gör. Dr. Recep Emre Okyay'a minnettarlığımı belirtmek isterim.

Bu çalışmanın yürütülmesindeki titiz ve içtenlikli katkılarından dolayı tüm IVF Merkezi çalışanlarına, biyokimyasal analiz işlemlerini gerçekleştirmemde büyük yardımlarını gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalından Öğretim Üyesi Prof. Dr. Semra Koçtürk'e, Sayın Burak Özkaya' ya, tezin istatistik kısmını yaparken danışmanlığını aldığım Halk Sağlığı Anabilim Dalından Dr. Hatice Giray'a, aynı çalışma ortamını paylaştığım tüm arkadaşlarıma

ve tez projemizin bütün maliyetini karşılayan Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ederim. Ayrıca varlığımın ve mutluluğumun sebebi olan değerli annem, babam, ablam ve Esra'ya da sonsuz sevgilerimi sunarım.

Tüm eleştiri ve düzeltmelere rağmen çalışmamda ortaya çıkabilecek hata ve yetersizlikten kaynaklanacak sorumluluğun tarafıma ait olduğunu, yapılacak her türlü düzeltme, uyarı ve eleştirinin alanımda gelişmem için büyük katkı sağlayacağını belirtmek isterim.

1. ÖZET

Foliküler Sıvı Oksidatif Stresin Ivf Sonuçları Üzerine Etkisi

Özgür Bige; Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

E-mail: ozgurbigef@yahoo.com, ozgur.bige@deu.edu.tr

Amaç: Foliküler sıvı oksidatif stress belirteçleri ile IVF sonuç parametreleri arasındaki ilişki ile ilgili olarak henüz yeteri kadar araştırılma yapılmadığından konu ile ilgili sınırlı miktarda bilgi bulunmaktadır. Bununla beraber oksidatif stress parametrelerinin hasta yaşı ve kontrollü over stimülasyonu sırasında elde edilen oosit sayısı ile ilişkisi ile ilgili olarak da kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmanın amaçları; IVF uygulanacak hastaların foliküler sıvı lipid peroksidasyonu (malondialdehit), protein oksidasyonu (protein karbonil) ve nitrik oksit (nitrit/nitrat) seviyelerini tespit ederek oksidatif stresin oosit ve embriyo morfolojisi, fertilizasyon, klivaj ve gebelik hızları üzerine olan etkilerini araştırmak ve oksidatif stress belirteç seviyeleri ile hasta yaşı ve elde edilen oosit sayısının ilişkisini ortaya koymaktır.

Dizayn: Prospektif çalışma

Kurum: Üçüncü basamak tıp merkezi

Metot: Kontrollü over stimülasyonu uygulanan 85 hastadan toplam 287 folikül sıvısı ve ait oldukları oosit alındı. Foliküler sıvı malondialdehit (MDA) seviyeleri spektrofotometrik olarak thiobarbitürik aside reaksiyonlu madde deneyi ile ölçüldü. Foliküler sıvı karbonillenmiş protein ölçümü için spektrofotometrik 2,4 dinitrofenilhidrazin deneyi kullanıldı. Foliküler sıvı nitrik oksit (NO) seviyesi Griess reaksiyonu ile nitrit/nitrat olarak ölçüldü.

Sonuçlar: Bu 85 hastaya ait 287 folikül sıvısı ve onların oositlerinden, 76 hastaya ait toplam 249 folikül sıvısı ve oositleri çalışmaya dâhil edildi. Foliküler sıvı ortalama oksidatif stress belirteç düzeyleri; MDA $5,80 \pm 0,41$ $\mu\text{mol/L}$ (0,4–40,5), protein karbonil $14,46 \pm 0,38$ nmol/ml (4,30–44,32), NO $44,07 \pm 0,71$ $\text{nmol NO/mg protein}$ (9,63–71,38) olarak tespit edildi. Normal sitoplâzmalı oositlerin foliküler sıvıdaki MDA düzeyi anormal sitoplâzmalı oositlerinki ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($9,02 \pm 1,99$ vs $5,43 \pm 0,39$ $\mu\text{mol/L}$, $P=0,004$). Fertilize olan oositlerin foliküler sıvı MDA düzeyi fertilize olmayanlarınkine göre anlamlı olarak yüksekti ($6,37 \pm 0,57$ vs $3,70 \pm 0,33$ $\mu\text{mol/L}$, $P=0,022$). Bu üç oksidatif stress belirteç düzeyleri ile erken klivaj, klivaj ve ikinci gün embriyo kalitesi arasında bir ilişki tespit

edilmedi. En üst kalite embriyo gelişen oositlerin folliküler sıvılarındaki NO düzeyi ($40, 12 \pm 1, 49$ vs $45, 50 \pm 1, 21$ nmol NO/mg protein, $P=0,006$) anlamlı olarak düşük iken protein karbonil düzeyi ($16, 91 \pm 1, 85$ vs $13, 45 \pm 0, 58$ nmol/ml, $P=0,045$) anlamlı olarak yüksek bulundu. Yaptığımız korelasyon analizlerinde nitrik oksit konsantrasyonu ile embriyo kalitesi ($r = -0,273$; $P=0.006$), MDA seviyesi ile de hasta yaşı arasında ters korelasyonlar tespit edildi ($r=-0,133$, $P=0,049$). Polikistik over sendromlu hastaların folliküler sıvılarında diğerleri ile karşılaştırıldığında MDA düzeyi anlamlı olarak yüksekti ($10,50 \pm 1,96$ vs $4,99 \pm 0,28$ $\mu\text{mol/L}$ $P<0.001$). Kötü ve aşırı cevap veren hastaların folliküler sıvılarında normal cevap veren hastalarinki ile karşılaştırıldığında MDA düzeyi anlamlı olarak düşük, NO düzeyi anlamlı olarak yüksekti. Gebelik elde edilen hastaların folliküler sıvıları ortalama MDA düzeyi gebelik elde edilmeyenlerinki ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti ($7,18 \pm 0,79$ vs $4.70 \pm 0,60$ $\mu\text{mol/L}$, $P=0,005$).

Yorumlar: Bu sonuçlar lipit peroksidasyonunun oositin sitoplazmik maturasyonunda, fertilizasyonda ve gebelikte rol oynayabileceğine dair deliller sunmaktadır. Nitrik oksidin yüksek seviyeleri oosite zararlı olup alt kalite embriyo gelişmesine yol açabilir. Elde edilen oosit sayısı arttıkça lipit peroksidasyonu azalmakta, NO ise artmaktadır. Bu durum oositin ve gelişecek embriyonun kalitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Araştırdığımız bu üç oksidatif stress belirteci IVF sonuçlarını tahmin etmede faydalı olabilirler.

Anahtar Kelimeler: Embriyo Kalitesi, Fertilizasyon, Folliküler Sıvı, Gebelik, İn Vitro Fertilizasyon, Malondialdehit, Nitrik Oksit, Oksidatif Stres, Oosit Kalitesi Protein Karbonil.

2. SUMMARY

The effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of IVF

Özgür Bige; Dokuz Eylül University, Department of Obstetrics and Gynecology

E-mail: ozgurbigef@yahoo.com, ozgur.bige@deu.edu.tr

Objective(s): The relationship between oxidative stress parameters in follicular fluids and in vitro fertilization outcomes has not yet been extensively investigated. Therefore there is limited knowledge of oxidative stress parameters present in follicular fluid and its subsequent effect on IVF outcomes. There is also lack of information about the relationship of the oxidative stress parameters in follicular fluid with the ages of patients and oocyte yield during controlled ovarian stimulation. The objectives of this study were to investigate the impact of oxidative stress on oocyte and embryo morphologies, fertilization, cleavage and pregnancy rates by determining the lipid peroxidation (Malondialdehyde), protein oxidation (Protein Carbonyl) and nitric oxide (Nitrite/Nitrate) levels in follicular fluid of women undergoing IVF and to relate these levels to ages of the patients and number of the oocyte yield.

Design: Prospective study

Setting: Tertiary care medical center

Methods: A total of 287 follicular fluid samples and their oocytes were obtained at oocyte retrieval from 85 patients undergoing controlled ovarian stimulation. The levels of follicular fluid malondialdehyde (MDA) were measured spectrophotometrically by the thiobarbituric acid reacting substance assay. For detection of carbonylated proteins in follicular fluid the spectrophotometric 2, 4 dinitrophenylhydrazine assays were used. Nitric oxide (NO) was measured in the follicular fluid as nitrite/nitrate, by the Griess reaction.

Results: Of those 287 follicular fluids and their oocytes from 85 patients, 249 follicular fluids and their oocytes from 76 patients were enrolled in to the study. The mean follicular fluid levels of oxidative stress markers were as follows: MDA $5,80 \pm 0,41 \mu\text{mol/L}$ (0,4–40,5), protein carbonyl $14,46 \pm 0,38 \text{ nmol/ml}$ (4,30–44,32), NO $44,07 \pm 0,71 \text{ nmol NO/mg protein}$ (9,63–71,38). The MDA levels were significantly higher; in follicles whose oocytes have normal cytoplasms compared with abnormal cytoplasms ($9,02 \pm 1,99$ vs $5,43 \pm 0,39 \mu\text{mol/L}$, $P=0,004$) and in follicles with successfully fertilized oocytes compared with non-fertilized ($6,37 \pm 0,57$ vs $3,70 \pm 0,33 \mu\text{mol/L}$, $P=0,022$). There were no associations between the levels of

these three oxidative stress markers with early cleavage, cleavage and 2 day embryo quality. The mean concentration of NO was significantly lower ($40, 12 \pm 1, 49$ vs $45, 50 \pm 1, 21$ nmol NO/mg protein, $P=0,006$) and protein carbonyl was significantly higher ($16, 91 \pm 1, 85$ vs $13, 45 \pm 0, 58$ nmol/ml, $P=0,045$) in follicular fluids whose oocytes developed to the top quality embryos. Using correlation analysis, an inverse correlation was detected between the NO concentrations and embryo quality ($r = -0,273$; $P=0.006$). We observed an inverse correlation between follicular fluid MDA levels and patient's ages ($r=-0,133$, $P=0,049$). The levels of MDA in follicular fluids belong to the patients with PCOS were significantly higher compared with the others ($10,50 \pm 1,96$ vs $4,99 \pm 0,28$ $\mu\text{mol/L}$, $P<0.001$). The follicular fluids of poor and hyperresponders had significantly lower levels of MDA and significantly higher levels of NO compared with normal responders. The mean follicular fluid MDA concentrations of patients who successfully conceived were significantly higher than follicular fluids of non-conceived patients ($7,18 \pm 0,79$ vs $4.70 \pm 0,60$ $\mu\text{mol/L}$, $P=0,005$).

Conclusion(s): These results provide evidences that lipid peroxidation may play a role in oocyte cytoplasmic maturation, fertilization and pregnancy. The higher level of NO in follicular fluid may be harmful to oocyte and lead to development of suboptimal embryos. As the number of oocytes yielded increases, lipid peroxidation decreases and NO concentration increases. This condition may have detrimental effects on oocyte and embryo quality. The concentrations of investigated oxidative stress markers in follicular fluid reflect the reproductive potential of oocytes therefore they may be useful markers for the prediction of IVF outcomes.

Key words: Embryo Quality, Fertilization, Follicular Fluid, In Vitro Fertilization, Malondialdehyde, Nitric Oxide, Oocyte Quality, Oxidative Stress, Pregnancy, Protein Carbonyl

3.GİRİŞ VE AMAC

Bir yardımcı üreme tekniği (ART) olan in vitro fertilizasyon (IVF), infertilitenin tedavisinde yaygın şekilde uygulanmaktadır. Bu tekniğin başarısı embriyo transferi başına düşen gebelik ve canlı doğum oranları ile değerlendirilir. Buna göre Amerika Birleşik Devletlerinde embriyo transferi başına gebelik oranı % 42, canlı doğum oranı ise %34 civarındadır [1,2]. Kliniğimizde ise 2007 sonuçlarına göre embriyo transferi başına gebelik oranı % 47,1 canlı doğum oranı ise %29,5 dir. Reaktif oksijen türleri (ROS) membran lipitleri, sperm proteinleri, nükleer ve mitokondrial DNA üzerine etki ederek sperm motilitesinin ve viabilitesinin azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle reaktif oksijen türlerinin yardımcı üreme tekniklerinin başarısında rol oynadığı kabul edilmektedir [3]. Erkeklerde ROS'ların üreme potansiyeli üzerine olan etkileri çalışılmıştır [4]. Ancak reaktif oksijen türlerinin ve antioksidanların bazı fizyolojik ve patolojik etkileri gösterilmiş olmasına rağmen bunların kadın üreme fonksiyonları ile ilişkisi üzerine rölatif olarak daha az çalışma vardır[5,6].

Foliküler sıvı ovulasyon öncesi matüre olan oositin mikro çevresinde gerçekleşen hormonal ve metabolik değişiklikleri yansıtan biyolojik bir penceredir. Bu sıvıdan elde edilen parametreler IVF' deki gebelik hızlarını, embriyo morfolojisini, embriyo klivajını ve fertilizasyonu belirlemede kullanılmıştır [7]. Oositin kendisi ya da içinde bulunduğu folliküler sıvıdaki steroid hormonları, büyüme faktörleri, sitokinler, granuloza hücreleri ve lökositler aerobik metabolizmalar sonucu ROS ve reaktif nitrojen türevleri (RNS) üretimine neden olmaktadır. Bu moleküllerin üretiminden sonra antagonize edilme işlemleri antioksidanlar tarafından gerçekleştirilir. Hücrelerin normal fizyolojik faaliyetlerini sürdürebilmeleri için oksidan molekül üretiminin ve antioksidan kapasitenin denge içerisinde olması gerekmektedir [8]. Folliküler sıvıda bulunan ROS/RNS'leri ve onların oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo klivajı, embriyo morfolojisi, gebelik ve implantasyon hızları üzerine olan etkileri ile ilgili olarak yeterince bilgi yoktur

Biyolojik sistemde bulunan belli başlı endojen ROS/RNS'ler süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve preoksinitrildir. Bu moleküller lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA oksidasyonu yaparak oksidatif hasara sebep olurlar. Bu mekanizmaların biyolojik sistemde ölçülebilir belirteçleri vardır. Bu oksijen radikallerini antagonize eden belli başlı dört endojen antioksidant mekanizma bulunmaktadır. Bunlar (1) Enzim yapısında

olanlar süperoksit dismutaz, katalaz ve glutathion peroksidazdır. (2) Büyük molekül yapısında olanlar albumin, seruloplazmin ve ferritindir.(3) Küçük molekül yapısında olanlar askorbik asit, alfa-tocoferol, beta karoten, plazma ubiquinol, ürik asit, selenyum ve glutathiondur. (4) Hormon yapısında olanlar ise estrojen, melatonin, angiotensin ve diğer bazı hormonlardır. Bunlar suda ya da yağda çözünen formda bulunurlar. Enzimatik olmayan küçük moleküllerden en önemli üç tanesi askorbik asit, alfa-tocoferol ve selenyumdur [9].

Ho ve Matzuk 1998 yılında genetik olarak superoksit dismutaz enzim defekti oluşturulan farelerde gerçekleştirdikleri çalışmada normal farelere göre elde edilen yavru büyüklüğünün ve aybaşına düşen yavru sayısının daha az olduğunu göstermişlerdir [10,11]. Paszkowski ve ark açıklanamayan infertil kadınların follikül sıvılarında selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (SeGPx) enzim seviyelerinin azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada SeGPx seviyesinin yüksek olduğu folliküllerden elde edilen oositlerin fertilizasyon hızlarının, enzim seviyesi düşük olanlardan elde edilenlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [12]. Paszkowski ve Clarke düşük kaliteli embriyoların inkübasyon sürecinde antioksidanların kullanımının arttığını yani ROS 'lerinin aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir [13]. Agarwal ve ark. oksidatif stresin oosit ve embriyo kalitesini ve de fertilizasyon hızlarını etkilediğini öne sürmüşlerdir [14]. Bir diğer çalışmada Oyawoye ve ark. IVF uygulanan kadınların follikül sıvılarındaki yüksek total antioksidan kapasitenin fertilizasyon potansiyelini artırdığını göstermişlerdir [5]. Yang ve ark yaptıkları bir çalışmada fragmente olmayan embriyolarla ve fertilize olan oositlerle karşılaştırıldığında fragmente embriyolarda ve fertilize olmayan oositlerde hidrojen peroksit seviyelerinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir [15]. İnsan oositin çevresini oluşturan folliküler sıvının oksidan–antioksidan dengesi ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Endo ve ark. hidrojen peroksidin kültüre edilmiş insan granuloza hücrelerinde progesteron sentezinin plüripotent inhibitörü olduğunu göstermişlerdir [16]. Shimamura ve ark ise sıçanlarda prostoglandin F-2-alfa'nın luteolitik aktivitesinin hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerin üretimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [17].

Oksidatif stres artışının kadın üreme fonksiyonları üzerine olumsuz etkilerinin gösterildiği çalışmaların yanı sıra aksini savunan çalışmalar da vardır. Bir çalışmada Jozwik ve ark. folliküler sıvıdaki oksidatif stres belirteçlerinin oositin reproduktif kapasitesini yansıtmadığını savunmaktadırlar [18]. Attaran ve ark. IVF konsepsiyon sikluslarında

konsepsiyon olmayan sikluslarına oranla folliküler sıvı ROS seviyelerini yüksek bulmuşlar ve bunu da ROS'ların yararlı etkilerinin olabileceği sonucuna bağlamışlardır [19].

Çalışmada birinci amacımız kontrollü ovaryan stimülasyon rejimlerinde elde edilen oositlerin nükleer ve sitoplazmik maturasyonları, fertilizasyon ve klivaj oranları, ikinci ve üçüncü gün embriyo kaliteleri ve gebelik hızları ile oositlerin elde edildiği follikülerin sıvılarındaki oksidatif ve nitrozatif stres belirteçleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Çalışmamızın ikinci amacı ise kontrollü ovaryan stimülasyon rejimlerine verilen yanıtlar yani elde edilen oosit sayıları ile oksidatif ve nitrozatif stres belirteç düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Yapacağımız çalışma ile oksidatif stresin kadın üreme fonksiyonları üzerine olan etkilerinin ortaya konmasında güvenilir veriler sunmayı amaçlamaktayız. Bu sayede hekimlere ART uyguladıkları hastalarının gebelik şansları konusunda önceden tahmin imkânı sağlanacağını ve sonrasında yürütülecek tedavinin önceden belirlenebileceğini düşünmekteyiz.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.İN VİTRO FERTİLİZASYON

4.1.1. Tarihçesi

İn vitro fertilizasyon oosit ve spermeleri uygun laboratuvar ortamında bir araya getirip döllenmelerini sağlamak olarak tanımlanır. İn vitro fertilizasyon ile ilgili araştırmaların ilk başarılı sonuçları hayvan deneyleri ile elde edilmiştir. İnsanda IVF çalışmaları ise 1970'li yıllara kadar çok yavaş ilerlemiştir. IVF uygulamasıyla insan oositlerinin fertilize olabileceğini ve ardından iki blastomerli embriyoların gelişebildiğini ilk kez 1944'de Rock ve Menkin gözlemlemişlerdir [20]. Wood ve ekibi 1973'de insanda IVF sonrası sekiz blastomerli bir embriyonun uterusu transferi sonrasında ilk gebelik olgusunu bildirmişlerdir. Ancak bu gebelik abortus ile sonuçlanmıştır [21]. Steptoe ve Edwards ise 1976 yılında IVF uygulaması ile oluşan tubal gebelik olgusu bildirmişlerdir [22]. Nihayet 25 Temmuz 1978 tarihinde yine aynı araştırmacılar klasik IVF uygulaması ile elde edile sekiz blastomerli bir embriyonun transferi sonucunda 2700 gr ağırlığında sağ ve sağlıklı bir kız bebek olan Louise Brown'nun doğumunu dünyaya müjdelemişlerdir [23].

Klasik IVF uygulamaları erkek subfertilitesi de dâhil olmak üzere birçok olguda elde başka alternatifler olmadığı için çeşitli modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Ancak Palermo ve arkadaşları 1992 yılında tıp dünyasına intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunu (ICSI) tanıtmaları ile birlikte tüm dünyada ICSI uygulamaları hızla yaygınlaşmıştır; böylece klasik IVF in çözüm üretemediği hasta grubunda da başarı sonuçları alınması sağlamıştır [24].

4.1.2. İn Vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi (IVF-ET) Endikasyonları [20].

- 1: Tubal faktör: düzeltilemeyen tubal hasarın neden olduğu infertilitedir.
- 2: Endometriosis
- 3: Erkek subfertilitesi
- 4: Anovulatuvar durumlar
- 5: Polikistik over sendromu (PCOS)
- 6: İmmünolojik infertilite

7: Açıklanamayan infertilite.

8: İleri kadın yaşı.

4.1.3. Uygulama Teknikleri

Başlıca iki evrede incelenebilir

4.1.3.1. Hastanın Hazırlanması

İn vitro fertilizasyon uygulamalarında hastalar bireyselleştirilmiş kontrollü ovaryan hiperstimulasyon (KOH) protokolleri ile hazırlanır. Kontrollü ovaryan hiperstimulasyon süresince folikülometri ve östrojen (E₂) değerleri birlikte izlenerek folliküler gelişim takip edilir ve insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulaması için uygun zaman tespit edilir. İnsan koryonik gonadotropin uygulamasından 34–36 saat sonra yumurta toplama işlemi (OPU) gerçekleştirilir.

4.1.3.2. Laboratuvar İşlemleri

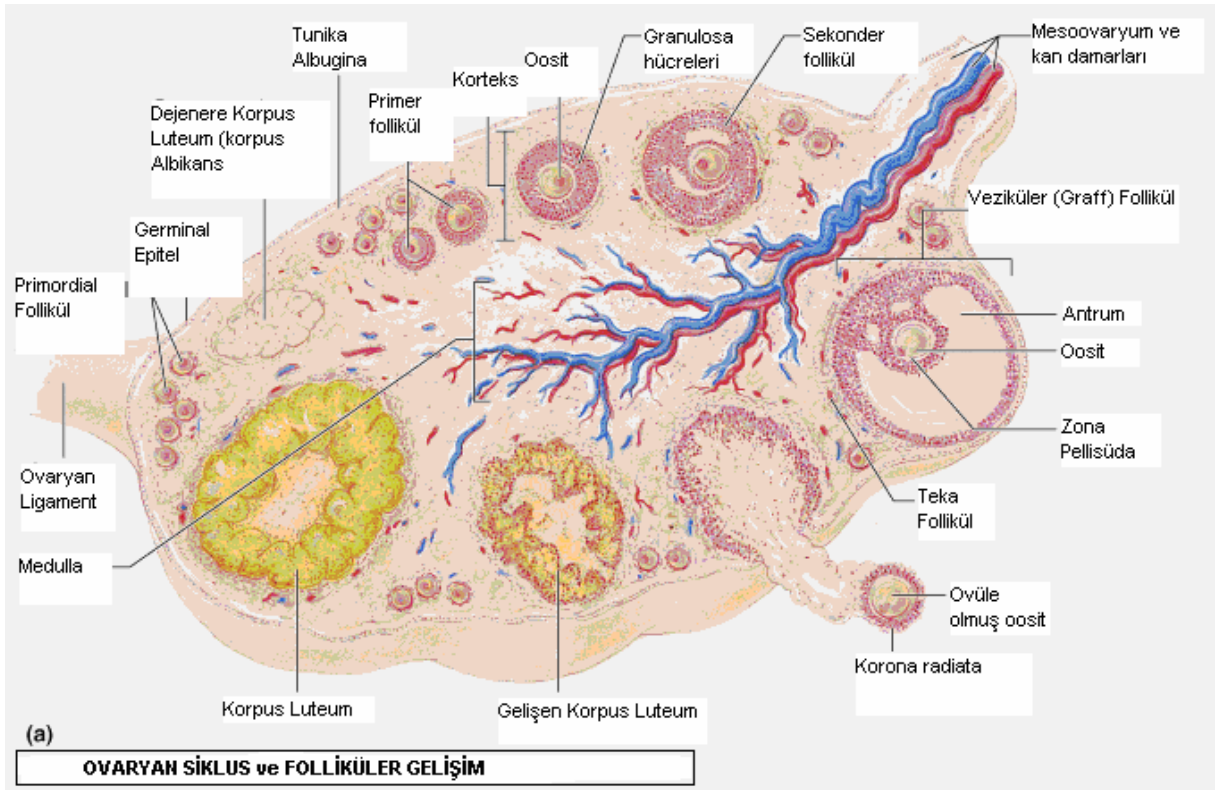
Toplanan oositlerin maturasyonu mikroskop ile değerlendirildikten sonra klasik IVF uygulanacak ise kumulus hücreleri mekanik olarak gevşetilir ardından uygun bir inkübasyon medyumuna aktararak %5–6 CO₂li inkübatörde ortalama 3 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi oositlerin ilk matürasyon durumuna göre değişebilir. ICSI uygulanacaksa matür oositlerin, kumulus korona ve oosit kompleksi enzimatik ve mekanik olarak denükle edildikten sonra iki saat inkübe edilir.

İnseminasyondan bir-iki saat önce hastanın eşinden sperm örneği alınır. Elde edilen motil spermler yıkandıktan sonra yoğunlaşma ve motilite tekrar değerlendirilerek 37 derecede %5 CO₂'li inkübatörde 30 dakika bekletilir. Uygun sayıda sperm alınarak oositlerin bulunduğu kültür ortamına aktarılır. Fertilizasyon klasik IVF'de inseminasyondan 16–18 saat; ICSI'de ise 14–16 saat sonra iki adet pronükleus oluşumu ile tespit edilir. Fertilize olmuş oositler uygun kültür ortamlarına aktararak takip edilir. Bölünmeye devam eden embriyolar değerlendirilerek yüksek kaliteli olanlar uygun görülen sayıda, 48–72 saat sonra hastaların uteruslarına transfer edilirler. Fazla sayıda iyi kalite embriyosu olan hastaların embriyoları dondurularak daha ilerde gerekirse transfer edilmek üzere saklanır.

4.2.OOGENEZİS

Ovaryumlar dişide, gametlerin üretilmesi (gametogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların sentezlenip salgılanması ile yükümlüdürler. Ovaryumlardan olgun bir oositin oluşturularak atılması (ovulasyon) pubertede başlayarak menopoza kadar devam eder. Ovulasyon menstrasyonun başlangıcından 13–14 gün sonra gerçekleşir ve her 28 günde, bir oositin atılmasıyla tekrarlanan bu olaylar ovaryan siklus olarak bilinir. Her ay gelişmeye başlayan 7–12 follükülden bir tanesi tam olgunluğa ulaşarak ovulasyonla atılırken diğerleri atreziye uğrarlar [25].

Şekil -I: Ovaryan siklus

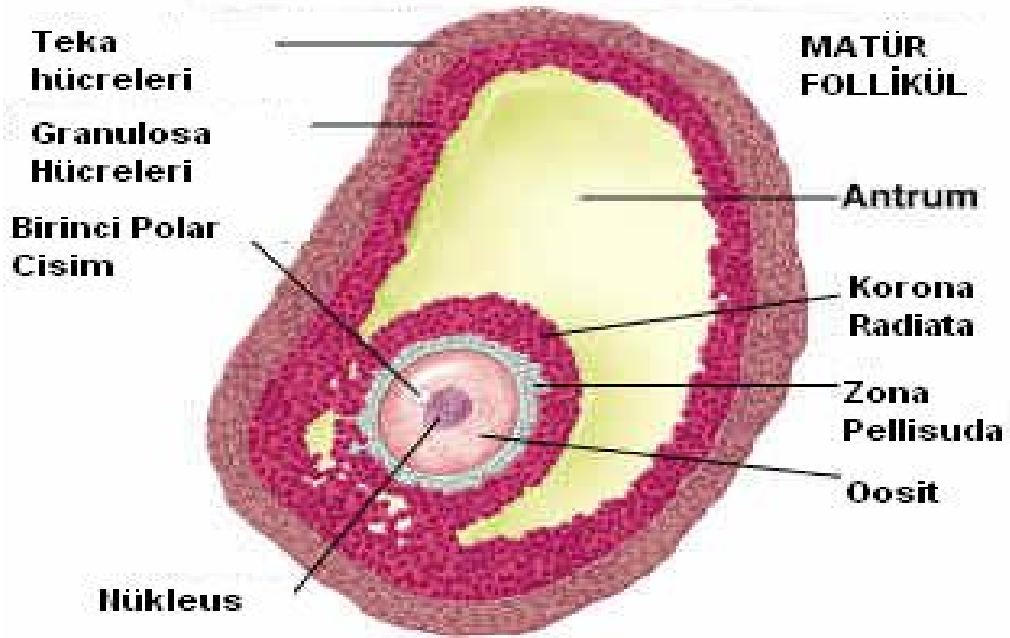


4.2.1.Follüküler Gelişim

Fetal yaşamda over farklılaşmasından sonra dişi germ hücrelerine oogonia adı verilir. Bu hücreler mitoz bölünme ile çoğalırlar sonuçta her bir overde 500.000 primordial follükül içinde diktiati faza girerler. Olgunluk çağında ovaryumlarda gözlenen üç tip follükül primordial, büyüyen ve matür follüküllerdir. (Graaf follüküleri). Primordial follükülün içerisindeki oosit birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde duraksayarak follükül gelişimine devam eder ve büyüyen follüküleri oluştururlar. Büyüyen follüküllerin primer, sekonder ve antral follüküller

olmak üzere üç farklı evresi vardır. Primordial follüküllerde oositi çevreleyen tek katlı yassı epitel hücreleri kübik epitele dönüşür ve primer follükül oluşur. Bu dönemde oosite komşu tarafında oolemanın mikrovillusları ile dış tarafta follüküler hücrelerin uzantılarını içeren glikoprotein yapıda zona pellusida oluşur. Follükül çevresindeki stroma hücreleri farklılaşarak teka interna ve teka eksterna tabakalarını meydana getirirler. Teka interna hücreleri steroid sentezleme özelliği gösterirler. Primer follüküldeki tek katlı kübik hücreler mitoz ile çoğalarak stratum granuloza denilen çok katlı bir epitel tabakası meydana getirirler. Primer follükülün içerisindeki oositin sitoplâzmasında endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı ve ribozom sayıları artarak sekonder follükülü oluştururlar. Hipofizden salgılanan follükül stimule edici hormon (FSH) etkisiyle granuloza hücrelerinin sayısı ve büyüklüğü artar ve hyalüronik asitten zengin bir sıvı follükül içinde birilmeye başlar böylece antral follükül oluşur. Antral follükül içerisindeki oositi çevreleyen hücelere kumulus hücreleri, follükül içine doğru oluşan bu yapıya da kumulus ooforus denir. Oosit çevresindeki kumulus hücrelerinin bir bölümü tek katlı prizmatik hücelerden oluşan korona radiata denilen bir tabaka oluştururlar. Oosit 10 mm boyuta ulaşınca ovaryum yüzeyinde bir çıkıntı oluşturur ki bu dönemde artık matür follükül, tersiyer follükül veya Graaf follükülü olarak tanımlanır [25].

Şekil-II: Matür follükül



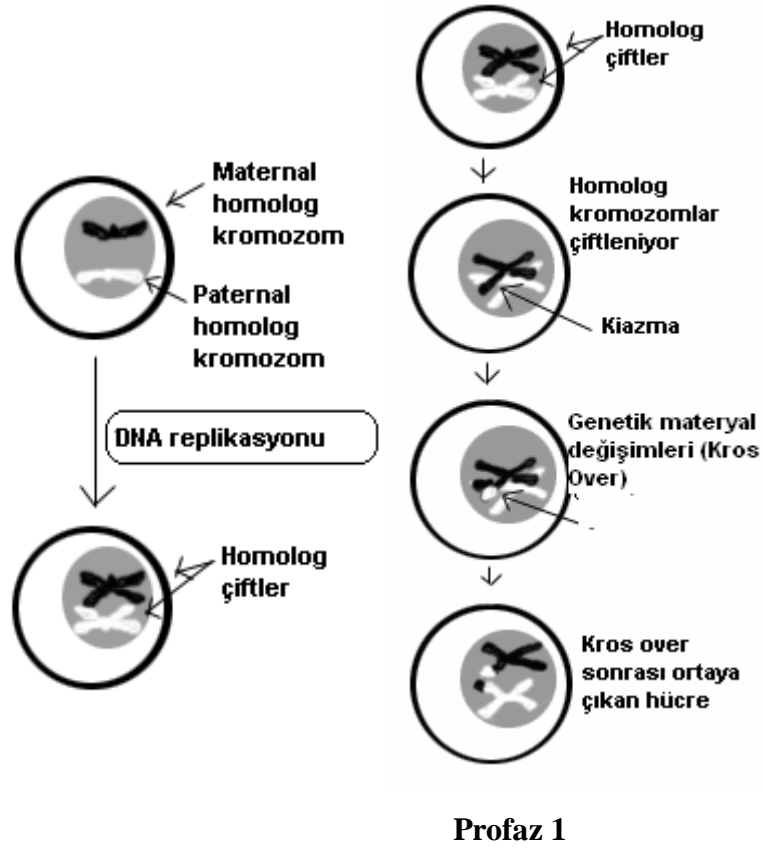
4.3. OOSİT MATURASYONU

Oosit, kadın vücudunda sadece yapısal ve fonksiyonel yönden değil, mayoz yani redüksiyonel bölünmeye uğrayan tek hücredir. Oositteki mayotik sürecin ilerlemesi oosit matürasyonu olarak bilinir ve basitçe birinci mayotik bölünmenin tekrar başlayarak metafaz II (MII) fazına ilerlemesi ve beraberinde başarılı fertilizasyon ve erken embriyonel gelişme için gerekli sitoplazmik değişikliklerin olmasıdır [26]. Aslında bu tanım nükleer ve sitoplazmik matürasyon olarak bilinen birbiri ile yakın ilişkili süreçleri tarif etmektedir.

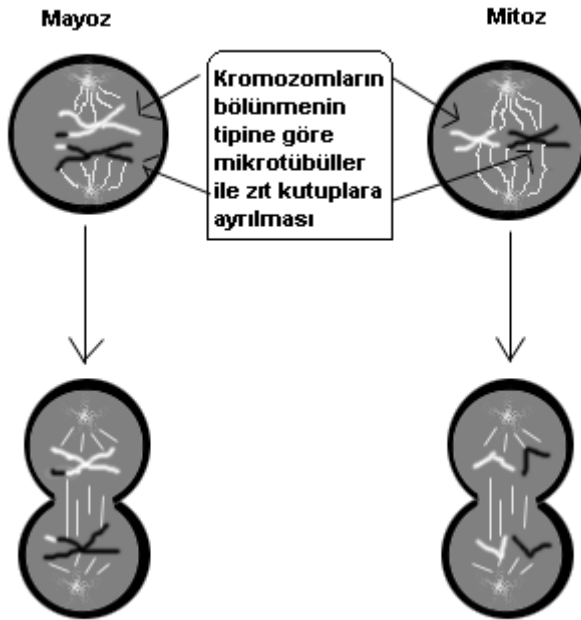
4.3.1. Nükleer Maturasyon

Oosit nükleer matürasyonu mayoz bölünme sırasındaki nükleer bileşenlerin modifikasyonudur. Doğum sırasında memeli oositlerinde birinci mayoz bölünme profaz fazının diploten aşamasında durur ve oositler gelişim yetilerini kazanırken ve büyüme sürecini tamamlarken kromatinlerin yeniden yapılandığı bu durumda kalırlar. Büyümek ve gelişme yetisini kazanmak ovulasyon öncesi dönemde olmaktadır. Bu evre salim bir nükleer zar veya germinal vezikül ile karakterizedir. Ovulasyon önce gonadotropin salınımı ile birlikte bu sessiz durum son bulur mayoz bölünme tekrar başlayarak germinal vezikül yıkılır. Birinci mayoz bölünmenin profaz fazı tamamlanırken homolog kromozomlar eşleşme ve rekombinasyon sürecine girerler. Mayotik spindle oluşur ve kondense olmuş homolog kromozomların sentromerlerine tutunur. Sonrasında kromozomlar kiazmalarından birbirlerinden ayrılırlar ve metafaz I (MI) tamamlanırken kromozomlar telofaz I evresine geçerler [27]. Oosit birinci mayoz bölünmeyi ovulasyondan hemen önce tamamlar. Birinci mayoz bölünme sonrasında kromatin iki kardeş hücre arasında eşit olarak dağılır. Orantısız sitoplazmik bölünme nedeniyle sekonder oositlerden biri hemen hemen tüm sitoplâzmaya sahip iri bir hücre olarak kalır iken diğeri zona pellisuda ile oosit arasındaki alanda (Previtellin alanda) kalan küçük bir hücredir ve birinci kutup cisimcik olarak tanımlanır. Meydana gelen sekonder oosit haploit kromozom içerir ve nükleus 2. mayoz bölünme evresine girer. Fertilizasyon sırasında spermin oosite girmesiyle oosit 2. mayoz bölünmeyi tamamlar ve 2. kutup cisimciği atılır. Ovulasyonla atılan oositler matür, sekonder oosit, ya da MII oosit olarak adlandırılırlar [25].

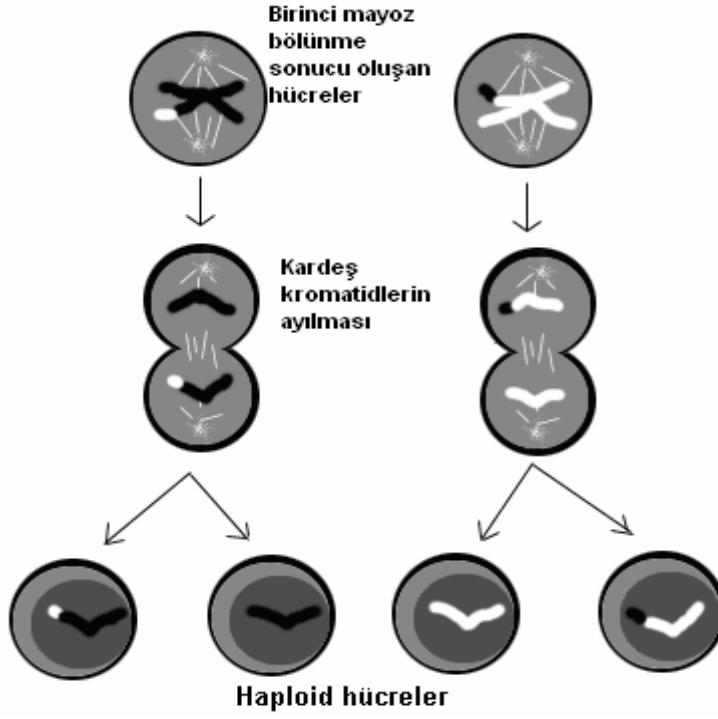
Şekil-III: Birinci mayoz bölünmenin birinci evresi (Profaz 1)



Şekil-IV: Mayoz ve mitoz arasındaki fark



Şekil-V: İkinci mayoz bölünme



Oosit nükleer matürasyon süreci altı safhaya bölünebilir [27].

- 1: Mayozun yeniden başlaması/germinal vezikül yıkımı
- 2: Kromatin kondensasyonu
- 3: Mayotik spindile aygıtının oluşması
- 4: Homolog kromozomların ayrılması
- 5: Orantısız sitoplâzma bölünmesi
- 6: Mayozun tekrar durması.

Şekil-VI: Matür oosit ve polar cisimcik



4.3.2. Sitoplâzma Maturasyonu

Sitoplâzma matürasyonu başarılı bir fertilizasyon, pronükleer biçimlenme ve implantasyon öncesi embriyonik gelişim için gerekli yapısal materyallerin sağlanması ve gerekli biyokimyasal sürecin oluşması, moleküllerin zamanında aktive olması, uygun depolanma kadar, organellerin yeniden yerleşmesi, proteinlerin ve mRNAların sentezini ve modifikasyonu içeren süreç olarak tanımlanır.

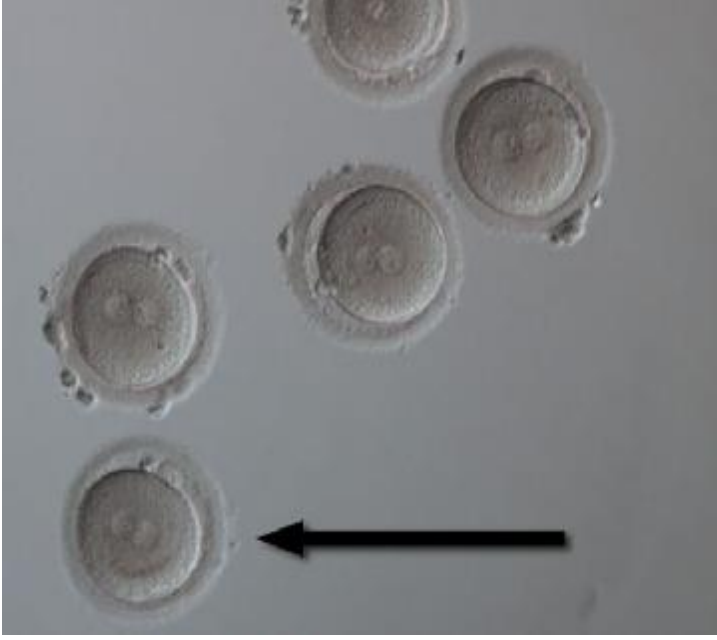
Sitoplazmik ve nükleer maturasyon, nükleer içeriğin germinal vezikülün yıkılması (GVBD) ile sitoplâzma salınmasıyla, birbiri ile koordineli hale gelen olaylardır. Her ne kadar nükleer matürasyon bazı yönlerden sitoplazmik maturasyonu etkilese de, en azında bazı durumlarda sitoplazmik matürasyon nükleer olaylardan bağımsızdır [28]. Bu nedenle oositler birinci polar cisimciği atıp nükleer maturasyon açıdan matür (MII) olsa bile, aslında bu oositler fertilizasyon, pronükleer oluşum ve embriyonik gelişim için gerekli maternal faktörleri içermeye yetersiz olabilirler [27].

4.4. EMBRİYONER GELİŞİM

4.4.1. Erken Embriyoner Gelişim

Sperm yumurtayı dölediğinde, sperm tarafından ooplazmaya taşınan sentriol ve mikrotübüller erkek ve dişi pronükleusları bir araya getirir ve inseminasyondan 16–18 saat sonra pronükleuslar oosit sitoplâzmasının ortasında gözlenir. İnseminasyondan 20–34 saat sonra pronükleuslar birleşir yani singami oluşur. Bunu 35,6 saat sonra sitoplâzmanın ikiye bölünmesiyle meydana gelen iki diploid blastomerin oluşumu izler. Bu yapı iki hücreli bir embriyo olan zigottur. Preimplantasyon evresindeki mitoz bölünmeler blastomer sayısında hızlı bir artışa yol açar ve böylece oluşan yeni blastomerler, bir önceki blastomerlere oranla daha küçüktür ve bu özellik, her bölünmede blastomer hacimlerinin daha da küçülmesi ile devam eder. İnseminasyondan 45,5–45,7 saat sonra yani ikinci günde embriyolar dört hücreli, daha sonraki bölünme ile üçüncü günde ortalama 54,3–56,4 saatlerde 8 hücreli aşamaya ulaşılır. Embriyodaki her bir blastomerin bölünmesi sırasında asenkronizasyon olabileceği için beş ve yedi gibi çift sayıda olmayan aşamalar da görülebilir.

Şekil-VII: Fertilize olmuş oositler (pronukleuslar merkezde izleniyor)



Embriyonun ikinci ve üçüncü bölünmeleri arasında (dört blastomerli evreden sekiz blastomerli evreye geçiş) maternal genden embriyonik gen dağılımı aşamasına geçiş gerçekleşmektedir. Bu nedenle, spermle birleşmeden itibaren ilk 48 saatte embriyo öncelikle maternal mRNA etkisiyle protein sentezi gerçekleştirirken, bundan sonraki aşamalarda embriyonik genom aktivasyonu ile gelişmeye devam ederler [29].

Klinik IVF’de embriyo değerlendirmesinde kullanılan en önemli ölçütlerden biri de fragmantasyondur. Fragmantasyon hücrenin plazma membranının ekstrasellüler bölgeye bir atığıdır ve sitoplazma içerir [29]. Fragmantasyon oluşumun intrasellüler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bölünme sırasında oluşan ölümcül zararlar ve apoptotik olaylara bağlı olduğu iddia edilmiştir [30]. İn vitro fertilizasyonda embriyonun gelişim özellikleri ve implantasyon potansiyeli değerlendirilirken; günü ile uyumlu blastomer sayısı ve büyüklüğünün yanında fragmantasyon miktarı, dağılımı ve büyüklüğü de uygun embriyonun bir seçim kistası olarak kullanılmaktadır [31]. Buna göre sitoplazmik fragmantasyonun miktarı ve dağılımı, embriyonun implantasyon potansiyeli ile ters orantılıdır ve embriyonun gelişimi üzerine olumsuz etkileri olabilir [32].

4.4.2. Morula ve Blastokist Gelişimi

İnseminasyondan sonraki üçüncü günde blastomerlerin sitoplazmasında granüler bir yapılanma küçük çukurlaşmalar gözlenebilir. Bu görünüm blastomerler arasında bağlanmanın artması ve sekiz hücreli bir embriyonun kompaktlaşmaya hazırlığı olarak yorumlanmıştır [29].

Fertilizasyondan sonraki dördüncü günde embriyo kompaktlaşmaya başladığı zaman morula olarak adlandırılır. Bu evrede blastomerler arasında, iletişimi ve hücreler arası bariyer oluşumu sağlayan sıkı ve gevşek bağlar oluşmuştur. Morula evresinde hücreler arasında kavite oluştuğu zaman embriyo blastokist adını alır. Kavitasyon ilerledikçe kompaktlaşma sırasında blastomerlerin kutuplaşmasıyla meydana gelen iki farklı hücre grubu (a) Ekstraembriyonik dokuyu oluşturacak trofektoderm (b) Embriyo ve daha sonra fetüsün gelişimi devam ettirecek iç hücre kütesini oluşturur. İn-vitro blastokist oluşumu inseminasyondan sonra 5 ve 7. günlerde gerçekleşir. Zona pellusida, fertilizasyonda çok önemli rolü olan ve henüz intrasellüler bağları oluşmamış blastomerleri bir arada tutarak fizyolojik bir bariyer görevi üstlenen, glikoprotein yapıda bir tabakadır. Zona pellusida, gelişen blastokistin hacim olarak büyümesi ile giderek incilir ve sonuçta açılan delikten blastokist fıtıklaşmaya başlar. Bu olaya hatching, bu aşamadan sonra 6-7. günde zona pellusidadan tamamen çıkan embriyoya ise hatch olmuş blastokist denir [29].

4.5. HÜCRESEL ENERJİ ÜRETİMİ, REAKTİF TÜRLERİN OLUŞUMU

4.5.1. Hücresel Enerji Üretimi

Hücresel adenozin trifosfat (ATP) birçok metabolik yolak ile üretilmektedir. Glikoliz altı karbonlu glikozun üç karbonlu olan iki molekül α -ketoasid prüvata dönüşmesidir. Bu dönüşüm sırasında substrat düzeyinde net olarak iki molekül adenozin difosfat (ADP), iki molekül ATP'e dönüşürken, İki molekül koenzim nikotinamid adenin dinükleotid (NAD; okside form), iki molekül NAD'ın redükte formuna (NADH; redükte form) dönüşür. Nikotinamid adenin dinükleotidin tekrar oluşturulması glikolizin devamı açısından kritik öneme sahiptir ve iki yolla gerçekleşmektedir. (1) Laktat dihidrogenaz (LDH) oksijenin kısıtlı olduğu durumlarda oksijen bağımsız bir şekilde prüvatı laktata dönüştürür. Glikolitik yol ile prüvatın laktata dönüştürülmesi ATP sentezi için hızlı bir yol olsa da net iki molekül ATP elde

edildiği için çok etkili bir yolak değildir. (2) Oksidatif glukoz metabolizması sırasında ortaya çıkan NADH mitokondrial elektron transport sistemi ile nikotinamid adenin dinükleotide dönüştürülürken beraberinde de ATP sentezlenmektedir. Oksijenin bol miktarda bulunduğu durumlarda daha verimli glukoz metabolizması mümkündür. Glikolizde ortaya çıkan piruvat Krebs siklusuna girerek daha küçük yapılara metabolize edilirken ortaya çıkan NADH ve flavin adenin dinükleotidin redükte formu olan (FADH₂) elektron transport sisteminde oksijenin kullanıldığı basamaklarla tekrar oksitlenerek NAD ve flavin adenin dinükleotide dönüştürülür ve beraberinde bol miktarda ATP üretilir. Oksidatif metabolizma ile üretilen ATP substrat düzeyinde üretilenden yaklaşık 15 kat daha fazladır. [33].

4.5.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu

Birçok memeli türünde olduğu gibi insan oositleri de enerji üretimi için okside edilebilir enerji maddesi olarak öncelikle piruvat ve az miktarda da glukoz kullanırlar. Oositteki glikolizde görev alan anahtar enzimlerin aktiviteleri düşüktür ve bu oositlerin plazma membranlarında glukoz taşıma sistemi bulunmamaktadır. Bu durum oositi mitokondrial oksidatif enerji üretimine bağımlı hale getirmektedir. Oksidatif enerji üretiminin yoğun olduğu dönemlerde elektron taşıma zincirinden %2lik bir elektron sızması olur, sızan elektronlar moleküler oksijen ile reaksiyona girerek radikal veya radikal olmayan reaktif oksijen türlerine dönüşürler. Belli başlı üç ana radikal olan reaktif oksijen türleri hidroksil (HO[•]), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksittir (O^{-•}). Oluşan ROS hücre için zararlı etkilerde bulunabilir. Mitokondrial ve nükleer DNA, proteinler ve lipitler ile etkileşerek yapısal ve fonksiyonel instabiliteye sebep olurlar sonunda hücreyi apoptoza götürebilirler [33]. Özellikle mitokondrial DNA elektron transport zincirine yakın olması, yapısında histon bulunmaması, savunma ve tamir sistemleri olmaması nedeniyle oksidatif strese karşı hassastırlar [34]. Yüksek oranda exon içerdikleri için oluşan mutasyonlar gen fonksiyonu üzerinde zararlı etkiler yapabilmektedir. Bu nedenle mitokondrial DNA'da nükleer DNA'ya göre yaklaşık 20 kat daha fazla mutasyon görülmektedir [35]. Mitokondrial fonksiyonda meydana gelen bir bozulma yetersiz enerji üretimi ve aşırı miktarda ROS oluşumuna neden olacağından oosit kalitesi azalmaktadır [36–38]. Oogenez sırasında hücre büyüyüp geliştikçe enerji ihtiyacına göre mitokondrilerin sayısı ve aktivitesi artmakta, dağılımı da sitoplazma da enerji ihtiyacının arttığı bölgelere göre değişmektedir. Yeni oluşmuş primordial germ hücresinde 10 adet mitokondri kopyası bulunurken, oogoniumda yüzlerle ifade edilen sayılarda mitokondri vardır, primordial

oositte bu rakam binlere çıkmakta, oosit matür hale gelince de sayı 400 binlere ulaşmaktadır [39].

Reaktif oksijen türleri eksojen sebeplerden dolayı da oluşabilir. Hiperoksik çevre superoksit radikallerinin oluşumu sağlayan enzimatik aktiviteyi artırabilir, bakır, demir ve gün ışığı da önemli miktarda ROS oluşuma yol açabilmektedirler [6].

Tablo-I: Reaktif oksijen türleri

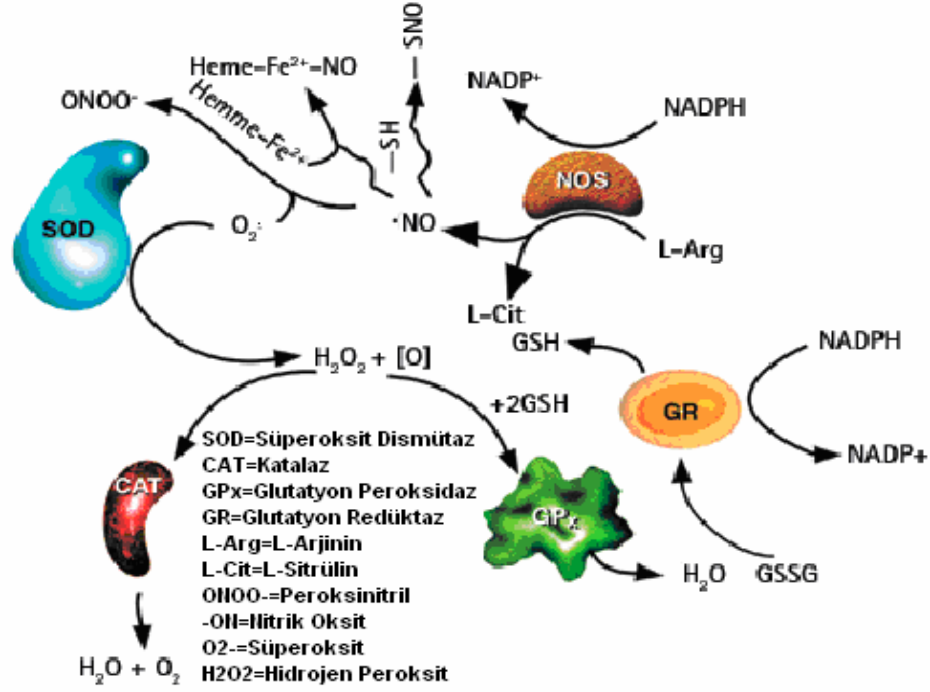
Radikaller		Radikal olmayanlar	
Hydroksil	OH^{\bullet}	Peroksinitrit	ONOO^{-}
Superoksit	$\text{O}_2^{\bullet -}$	Hipoklorik asit	HOCl
Nitrik Oksit	NO^{\bullet}	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Thyl	RS^{\bullet}	Singlet Oksijen	$^1\Delta_g (^1\text{O}_2)$
Peroksil	RO_2^{\bullet}	Ozon	O_3
Lipid peroksil	LOO^{\bullet}	Lipid peroksit	LOOH

4.5.3. Reaktif Nitrojen Türlerinin Oluşumu

Reaktif nitrojen türleri (RNS) nitrik oksit ve nitrojen dioksittir. Reaktif olmayan nitrojen türlerinden de en önemlileri peroksinitrit ve nitrosamindir. Nitrik oksit vücutta bulunan en önemli nitrojen türevlerindendir ve büyük ölçüde nitrik oksit sentetazlar (NOS) olarak bilinen enzim gurubu ile L-arjinin amino asidinin L-sitruiline dönüşümü sırasında sentezlenmektedir [40]. Nitrik oksit molekülü tedavi amaçlı vazodilatör olarak kullanılmasına rağmen fazla miktarda nitrik oksit toksik etki yapmaktadır. Bu nedenle canlıda normal nitrik oksit konsantrasyonunu sağlamak hayati önem taşımaktadır [41]. Nitrik oksit eşleşmemiş bir elektron içerdiği için yüksek derecede reaktif serbest radikaldir. Bu nedenle proteinlere, nükleotidlere, lipitlere ve karbonhidratlara zarar verebilmektedir. Nitrik oksit diğer enflammatuar medyatörler ile beraber hücre ve doku hasarı, düşük dereceli steril enflamasyon ve adezyon yapabilmektedir [42]. Nitrik oksit sentetaz enzim gurubunun hidrojen peroksit, superoksit ve nitrik oksit oluşmasına yol açtığı gösterilmiştir. L-arginin

miktarının az olduğu hücrelerde superoksit oluşumunun fazla olduğu bilinmektedir. Superoksit ile nitrik oksit tepkimeye girerek peroksinitrit oluşmasına neden olarak hücre hasarına yol açarlar.

Şekil-VIII: Reaktif nitrojen türlerinin oluşumu



Peroksinitrit ve metaboliti lipid peroksidasyonu yaparak, sinyal iletimi sağlayan ve enzim fonksiyonlarını düzenleyen birçok tirozin moleküle nitrozilasyon yaparak ve sodyum kanallarını inaktive ederek sitotoksik etki gösterirler. Bütün bu bulgular ışığında hücrede nitrik oksit aktivitesi, konsantrasyona, hücrenin redoks durumuna, metallerin, proteinlerin, thiollerin ve düşük molekül ağırlıklı thiollerin ve de diğer nükleofilik hedeflerin miktarına bağlıdır [43]. Nitrik oksit etkileri ikincil mesajcı olarak siklik guanozin monofosfat (cGMP) aracılığı ile veya süperoksit radikalleri ile etkileşmesinden ortaya çıkan ROS ile gösterdiği öne sürülmüştür [44].

Hücrede nitrik oksidin etkileri doz bağımlıdır ve düşük konsantrasyonlarda guanozin siklaz aktive olarak cGMP aracılı etki gösterirler. Yüksek konsantrasyonlarda ise nitrik oksit superoksit ile tepkimeye girerek etki etmektedir [43,45].

Tablo-II: Reaktif nitrojen türleri

Nitrik oksit	NO^{\bullet}	Nitrosil katyon	NO^+
Peroksinitrit	OONO^-	Nitrojen dioksit	NO_2^{\bullet}
Peroksinitrik asit	ONOOH	Dinitrojen trioksit	N_2O_3
Nitroksil anyon	NO^-	Nitroz asit	HNO_2
Nitril klorit	NO_2Cl		

Reaktif nitrojen türlerinden üreme sisteminde birçok mekanizmada rol alan nitrik oksittir. Folliküler sıvısı; folliküler büyümeyi maturasyonu, ovulasyonu ve follikül atrezisini etkileyen maddeyi içerir. Yapılan çalışmalar, follikül sıvısında önemli miktarda nitrik oksit bulunduğunu [46] ve bunun da büyük kısmının granuloza hücrelerinden sentezlendiğini göstermiştir [47]. Bu durumda nitrik oksidin ovaryan kan akımı, follikül büyümesi, follikül maturasyonu, steroid hormon sentezi veya ovulasyonda etkili olduğu düşünülebilir.

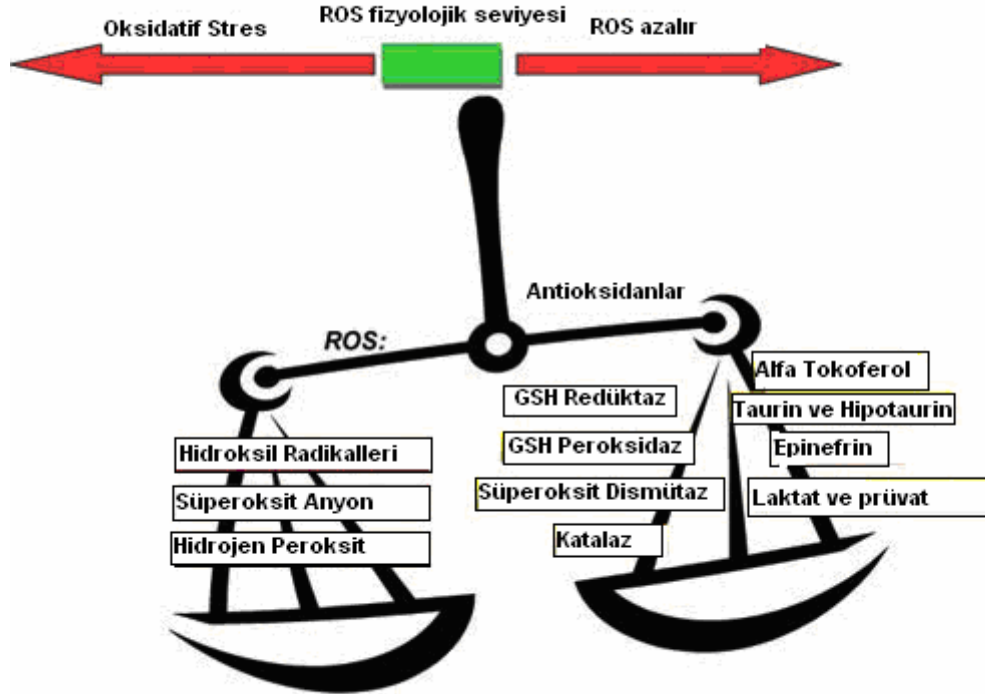
4.6. OOSİT REDOKS HEMOZTAZI

Redoks reaksiyonları veya oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları elektron transportuyla okside veya redükte bir durumun oluşmasına yol açmaktadır. Redoks durumu oksidan ve antioksidan üretimleri arasındaki dengeyle belirlenmektedir. Redoks hemostazını sağlamak yüksek kalitede oosit ve embriyo gelişimi için gereklidir. Redoks durumunda olan değişiklikler sinyal yollarını, transkripsiyon faktörlerini, epigenetik mekanizmaları olumsuz yönde etkileyip oosit ve embriyo kalitesinin azalmasına sebep olabilirler. Bu nedenle normal redoks hemostazını sağlayan reaksiyonları anlamak kadın üreme sisteminde ve yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması sırasında ortaya çıkan oksidatif stres oluşturan mekanizmaları daha iyi tanımamızı sağlar [8].

Oksijenin elektron affinitesi oldukça yüksektir ve bu nedenle en çok bilinen okside edici ajandır. Oksijen elektron alıp radikal şekle dönüşünce yağ asitleri ile tepkimeye girerek membranların biyolojik yapısını değiştirir [48]. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu oksidatif metabolizmanın kaçınılmaz bir sonucudur. Oositin kendisi ya da içinde bulunduğu folliküler sıvıdaki steroid hormonları, büyüme faktörleri, sitokinler, granuloza hücreleri ve lökositler ROS oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin etkilerine karşı çeşitli hücrel savunma sistemleri olan antioksidanlar ile kontrol altında tutulmaktadır. Hücrelerin normal

fizyolojik faaliyetlerini sürdürebilmeleri için oksidan molekül üretiminin ve antioksidan kapasitenin denge içerisinde olması gerekmektedir [19]. Oksidatif kapasite antioksidan kapasiteyi geçtiği zaman hücreler oksidatif strese maruz kalmaktadırlar. Reaktif oksijen türlerini antagonize eden belli başlı dört endojen antioksidant mekanizma bulunmaktadır. Bunlar (1) Enzim yapısında olanlar; süperoksit dismutaz (SOD): süperoksit radikallerini hidrojen perokside ve hidroksil radikallerine indirger sonrasında bu moleküller katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile suya dönüştürülürler. (2) Büyük molekül yapısında olanlar: albumin, seruloplazmin ve ferritindir.(3) Küçük molekül yapısında olanlar: askorbik asit, alfa-tokoferol, beta karoten, plazma ubiquinol, ürik asit, selenyum ve glutatyondur. (4) Hormon yapısında olanlar ise: östrojen, melatonin, angiotensin ve diğer bazı hormonlardır. Bunlar suda ya da yağda çözünen formda bulunurlar. Enzimatik olmayan küçük moleküllerden en önemli üç tanesi askorbik asit, alfa-tokoferol ve selenyumdur [49].

Şekil-IX: Redoks hemostazı



4.7. OKSİDATİF/NİTROZATİF STRES BELİRTEÇLERİ

4.7.1. Malondialdehit

Lipit peroksidasyonu bitkilerde ve hayvanlarda hücrel hasarın en iyi belirlenmiş mekanizmasıdır. Lipit peroksidasyonu hücrelerde ve dokularda oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden türeyen lipit peroksitler kararsızdırlar ve birtakım kompleks bileşiklere dönüşürler. Bunlar reaktif karbonil bileşikleridir ve büyük kısmını malondialdehit (MDA) oluşturur. Bu nedenle MDA ölçümü lipit peroksidasyonun bir göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [50]. Artmış lipit peroksidasyon ürün seviyeleri insanda [51,52] ve model sistemlerde [53,54] kronik hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Malondialdehit proteinler üzerindeki amino grupları ve diğer biyomoleküllerle kolaylıkla reaksiyona girerek çapraz bağlı ürünleri de [55] içeren bir takım bileşenler oluştururlar [50]. Malondialdehit, DNA bazları ile etkileşerek muhtemelen karsinojenik [56] olan mutajenik bileşenler oluştururlar [57,58].

4.7.2. Protein Karbonil

Protein karbonil grupları proteinlerin (lizin, arginin, threonin ve prolin) amino asit rezidülerinin direkt oksidasyonu ile veya karbonhidratların ve lipitlerin birincil oksidasyon ürünleri ile ikincil tepkimeleri sonucu oluşmaktadır [59-61]. Proteinlerde olan bu modifikasyonlar protein yapısında ve fonksiyonunda önemli değişikliklere sebep olurlar. Proteinlerin ROS'un ilk ve ana hedefi olduğu ve biyolojik sistemde öncelikle protein karbonil oluşumuna yol açtığı birçok çalışma ile gösterilmiştir [62-64]. Protein karbonillerin yükselmiş seviyelerinin tespit edilmesinin hastalığın sebep olduğu disfonksiyonun bir belirtisi olabileceği ileri sürülmüştür [65]. Protein karboniller oksidatif stresin kimyasal olarak kararlı belirteçleridir ve yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Diğer okside ürünlere kıyasla dolaşımda daha uzun süre kalırlar [66].

4.7.3.Nitrik Oksit

Nitrik oksit biyolojik sistemlerde nitrik oksit sentetaz enzimi ile sentezlenir. Nitrik oksit sentetaz, moleküler oksijen, arjinin ve NADPH üzerine etki edip, nitrik oksit, sitrülün ve NADP⁺ oluşmasını sağlayan oldukça kompleks bir enzimdir. Nitrik oksit sentezi için ek olarak (Flavin mono nükleotid, flavin adenin dinükleotid, heme, kalmodulin, tetrahidrobiopterin) adında beş tane daha kofaktör ve iki tane de divalen katyon (kalsiyum ve heme demiri) gerekmektedir. Nitrik oksit sentetaz enziminin üç tane ayrı formu tanımlanmıştır. Bunlar nöronal, endotelial ve induklenebilir Nitrik oksit sentetaz enzimleridir [67]. Nitrik oksit hemostatik uyarı sonrası nöronlardan, endotel hücrelerinden, trombositlerden ve nötrofillerden çok az miktarda salgılanırlar [68,69]. Salgılanan Nitrik oksit hızlı bir şekilde temizlenirken (yarılanma ömrü= 4 saniye) parakrin etki gösterir. Nitrik oksit guanilat siklaz enziminin prostetik heme grubuna etki ederek enzimi aktifler ve cGMP'ın seviyesini artırır. Nitrik oksit, mitojenik veya enflammatuar bir uyarı olduğu zaman makrofaj, fibroblast ve hepatosit gibi diğer hücrelerden de mikromolar konsantrasyonlarda sentezlenir. Bu durumda sentezin amacı patojenlere karşı oksidatif toksisite aracılığı ile organizmayı savunmaktır. Ancak bu yüksek nitrik oksit konsantrasyonları peroksinitrit oluşumuna, demir-sülfür kümelerinin yıkılmasına, tiollerin (SH) ve proteinlerin tirozin rezidülerinin nitrojenlenmesine yol açmaktadır. Bu nedenle değişik biyolojik sistemlerde sentezlenen nitrik oksit miktarı ve kimyasal reaktiviteleri çok farklı olmaktadır. Nitrik oksidin in-vivo en son ürünü nitrit (NO₂) ve nitrat (NO₃⁻). Nitrit ve Nitratın birbirine oranı çok değişkendir ve hiçbir zaman tam olarak belirlenemez. Bu nedenle total nitrik oksit üretimini göstermek için en uygun yol nitrit ve nitrat toplamını ölçmektir [67].

5.GEREC VE YÖNTEMLER

Bu prospektif çalışma Ağustos 2007 ile Ekim 2007 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, IVF Merkezinde IVF/ICSI uygulanan hastalardan elde edilen folliküler sıvılarda gerçekleştirildi. Çalışma üniversite etik kurulu onayı alındıktan sonra başladı. Hastalar yazılı ve sözlü onam alındıktan sonra çalışmaya katıldılar.

Çalışma tubal faktör, erkek faktör, endometriosis, anovuluar durumlar, PCOS, ileri kadın yaşı ve açıklanamayan infertilite nedenleri ile kliniğimize IVF/ICSI için başvuran hastalardan elde edilen follikül sıvılarında gerçekleştirildi. Yan tutuculuğu önleyebilmek için aynı klinisyen tarafından takip edilen 85 hasta ile çalışmaya başlandı ancak çeşitli nedenlerle dokuz hasta çıkarıldıktan sonra kalan 76 hasta ile çalışmaya devam edildi.

5.1.Ovaryan Stimulasyon Protokolü

Çalışmaya katılan 76 hastadan gerekli görülen hastalara (n=42) GnRH analogu (Lucrin; Abbot, Türkiye / Suprefact; Sanofi Aventis, Türkiye) ile bir önceki siklusun luteal fazının ortasından başlayarak uzun protokol ile hipofizer down regülasyon yapıldı. Optimum down regülasyon sağladıktan sonra bireyselleştirilmiş dozlarda rekombinant FSH (Gonal-F, Serona, Türkiye/Puregon; Organon, Türkiye) veya Human menopozal gonadotropin (Menogon; Erkim, Türkiye/ Menopur; Erkim, Türkiye) ile indüksiyon başlandı. Analog kullanılmayan hastalara (n=34) gonadotropin tedavisi başladıktan beş ile altı gün sonra GnRH antagonist (Orgalutron; Organon, Türkiye/ Cetrotide; Serona, Türkiye) tedavisi eklenerek eksojen gonadotropin uyarısına devam edildi. Folliküler büyüme düzenli olarak ultrason ölçümleri ile takip edildi. En az iki follikül çapı 18 mm olunca 10.000 IU Human koryonik gonadotropin (Pregnyl, Organon, Türkiye) uygulandı.

5.2.Oosit ve Folliküler Sıvı Toplama İşlemi

Oosit toplama işlemi hCG yapıldıktan ortalama 36 saat sonra gerçekleştirildi. Oosit toplama öncesi hastalardan idrarlarını yapmaları istendi. Hastalara intravenöz sedasyon için midazolam (dormicum ampul 5mg/5ml, Roche, Türkiye) 0,02mg/kg, fentanyl (fentanyl citrate

ampul, Abbot, Türkiye) 1mcg/kg ve propofol (propofol flakon 500mg/ml, Abbot, Türkiye) 1mg/kg dozlarında kullanıldı. Oosit toplama işlemi öncesi vajen steril salin solüsyonuyla yıkandı. Steril bir kılıf içindeki transvajinal USG probu (7,5 MHZ Endovaginal Probe, Siemens, Japonya) ve beraberinde tutturulmuş aspirasyon iğnesi (Gynetics, Hamont-Archel, Belçika) overleri görmek ve follikülleri aspire etmek için kullanıldı. Çalışmaya dâhil edilen hastalardan alınan folliküler sıvılar, 16 G'lik iğneler ile 15–20 mm büyüklüğündeki ve proba en yakın folliküllere keskin olarak girildikten sonra, 125 mmHg vakum basıncında aspire edilerek elde edildi. Her bir follikül ayrı ayrı aspire edildi. Her aspirasyondan sonra bir sonraki follikül sıvısının kontaminasyonunu önlemek için set temizlendi ve yeni toplama tüpü kullanıldı. Her bir hastadan çalışma için 1–5 arası follikül aspire edildi. Her follikülden ortalama 2–7 ml sıvı alındı. Çalışma için yapılan follikül aspirasyon işleminden sonra standart yöntemlerle hastanın yumurta toplama işlemi tamamlandı. Yıkama sıvısı ve kan ile kontamine olmuş follikül sıvıları ve oositleri çalışmaya dâhil edilmedi. Aspire edilen her follikül sıvısı 60x15 mm'lik polisteren dişlere (BD Falcon 60x15mm petri dish, Biosciences, ABD) ayrı ayrı kondu. Tek oosit elde edilen sıvı, içerisindeki oosit alındıktan sonra steril pipetle ayrı steril, apirojen, polipropilen konik tabanlı 15 ml hacimli tüplere (BD Falcon, Biosciences, ABD) kondu. Alınan follikül sıvı örneği, debris ve granuloza hücrelerini uzaklaştırmak için, 2000 devir/dk hızda, 4°C de, 10 dakika setrifüj edildi. Süpernatant 4 ayrı steril polipropilen tüpe en az 0,4 ml sıvı içerecek şekilde her bir follikül için ayrı steril pipet kullanılarak eşit miktarlarda bölündü. Materyaller -80°C'de analiz gününe kadar saklandı.

5.3.Oositlerin Elde Edilmesi, Takibi, Morfolojik Değerlendirilmesi ve ICSI

Aspirasyon işlemi ile tüp içerisine alınan her bir follikül sıvısı, laminar flow kabinin içerisindeki petri tabaklarına (BD Falcon, 353003 (100x 20 mm, Biosciences) dökülüp ve stereo-mikroskop altında oositler bulundu. Yumurta toplam günü hazırlanan Falcon 353037 (60x15 mm) center well dish dışına 2 ml iç kısmına 1 ml HEPES ile desteklenmiş Quinn's Advantage medyum (SAGE Biopharma, Bedminster, NJ, ABD) konularak hazırlanan tabağın dışında yıkanıp bulunan oositler Pasteur pipet yardımı ile içine alındı. Yumurta toplama bittikten sonra toplanan oositler OPU'dan bir gün önce hazırlanan Quinn's Advantage Protein Plus Fertilization (HTF) Medyumlu tabağa (NUNC four well dish,176740, Thermo Fisher

Scientific, ABD) aktarıldı ve bu tabakta 2–4 saat inkübe edilerek ICSI zamanına kadar bekletildiler.

Foliküllerden çalışma için elde edilen oositler ICSI işlemi öncesi mekanik ve kimyasal olarak denüedildikten sonra invert mikroskopla (Olympos IX70, Olympos, Viyana, Avusturya) morfolojik olarak değerlendirildi. Nükleer maturasyonlarına göre oositler üç gruba ayrıldı. Grup 1; matür, metafaz II (MII) oositler, Grup 2; immatür, metafaz I (MI) veya germinal vezikül (GV) olan oositler, Grup 3; dejenere olan oositler olarak belirlendi. Sitoplazmik maturasyonlarına göre oositler iki gruba ayrıldı. Grup 1; sitoplâzması normal yani şeffaf olanlar, Grup 2; sitoplâzması granüler, koyu granüler, vokual ve/veya refraktil cisim içeren oositler olarak belirlendi.

Oosit toplama işleminden sonra hastaların eşlerinden mastürbasyon ile semen örneği alındı. Bu semen örneğinde sperm bulunamayan erkeklere TESE uygulandı. Spermier swim up ve yoğunluk gradiyenti santrifugasyon yöntemi ile hazırlandı. Ayrılan spermier kapasitasyon amacıyla 0,5–4 saat protein içeren mediumda (Quin's Sperm Washing Medium, Sage Media, A.B.D) 37 °C'de, %5'lik karbon dioksitli ve %98'lik nemli ortamda inkübasyona (Heraus inkübatör, Almanya) bırakıldı. Mikroenjeksiyon prosedürü Van Steirteghem ve ark. tanımlamalarına göre yapıldı [70].

5.4.Fertilizasyon, Klivaj ve Embriyo Kalitesi

Fertilizasyon, ICSI işleminden 16–20 saat sonra mikroskop altında iki ayrı pronükleusun görülmesi ile tespit edildi. Oositler fertilize olmalarına göre iki gruba ayrıldı Grup 1; fertilize olanlar, Grup 2; olmayanlar olarak tanımlandı.

Fertilizasyondan sonra erken bölünme (bölünmenin 24 saatten önce başlaması) durumuna göre oositler iki grupta değerlendirildi. Grup 1: erken klivaj (bölünme) olanlar, Grup 2: erken bölünme olmayanlar olarak tanımlandı.

Klivaj 24 saat sonra değerlendirildi. Embriyolar klivaj durumlarına göre iki gruba ayrıldı. Grup 1 klivaj olanlar, Grup 2 klivaj olmayanlar olarak tanımlandı.

Embriyo transferi ICSI işleminden yaklaşık 48–72 saat sonra yapıldı. Transfer günü embriyolar kalitelerine göre derecelendirildi. Embriyo kalitesi; hücre sayısı, simetri, blastomerlerin şekli, perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmentasyonların büyüklüğü ve klivaj oranı dâhil edilerek morfolojik özelliklere dayanarak modifiye Veeck kıstasları

kullanılarak hesaplandı [71]. Grade 1 embriyo (en üst kalite embriyo); blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte, % 0 fragmantasyon, grade 2 embriyo; blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte %0–25 arası fragmantasyon, grade 3 embriyo; blastomerler eşit büyüklükte değil ve %25–50 arası fragmantasyon, grade 4 embriyo; blastomerler eşit büyüklükte veya değil ancak > %50 fragmantasyon oranı olarak tanımlandı [71]. Kalitelerine göre değerlendirilen embriyolar iki gruba ayrıldı. Grup 1: grade 1 (en üst kalite embriyolar), Grup 2: grade 2, grade 3 ve grade 4 embriyolar olarak tanımlandı.

Embriyo transferi öncesinde vajen steril salin solüsyonuyla yıkandı. Transabdominal ultrasonografi (Sonoline Adara, Siemens, Almanya) rehberliğinde transfer kateterinin (Wallace, Smiths, İngiltere Labotect, Almanya) ucu fundusa dokunmadan yaklaşık 0,5–1 cm altında iken midkaviteye embriyo transferi yapıldı. Transfer kateterinde embriyo kalıp kalmadığı kontrol edildikten sonra işleme son verildi. Hasta embriyo transferi sonrası 30dk istirahat ettikten sonra taburcu edildi. Luteal faz desteği doğal progesteron (Progestan kapsül,100mg, Koçak, Türkiye) 600 mg/gün, intravaginal uygulama ile sağlandı. Biyokimyasal gebelik embriyo transferi sonrası 14. günde serum β -hCG ölçümü >25 mIU/ml ise ve klinik gebelik embriyo transferinden üç hafta sonra transvaginal USG’ de bir veya daha fazla gebelik kesesi görülmesi ile tanındı.

5.5.Oksidatif Stres Belirteçlerinin Ölçülmesi

5.5.1.Malondialdehit

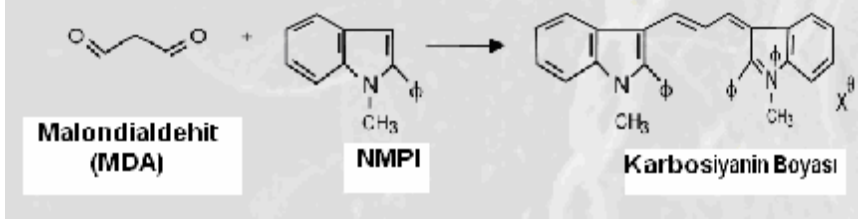
Follikül sıvılarındaki malondialdehit MDA kiti (MDA–586, Biotech, OxisResearch, Portland, ABD) kullanılarak ölçüldü.

Yöntemin Prensibi

Yöntemin prensibi MDA'nın 45°C'de kromojenik N-metil–2-fenilindol (NMPI) ile reaksiyon vermesi temeline dayanır. Reaksiyon sonucunda 586 nm'de maksimum absorbans veren karbosiyanin bileşiği meydana gelmektedir (Şekil-X). 4-hidroksialkallenlerin (HNE) reaksiyonunun engellenebilmesi için reaksiyon hidroklorik asitli (HCL) ortamda gerçekleştirildi ve ortama antioksidan ilave edilmedi. Bu koşullar altında HNE'nin 586 nm'de verdiği absorbans minimize edilmiş oldu. Antioksidan Probukol (Probuco) ve HCl kit ile beraber verilmektedir. MDA-586 yönteminde kit ile beraber verilen MDA standartları

kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Folliküler sıvının MDA içeriği, 586 nm'de verdiği absorbans ve çizilen standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

Şekil-X: MDA'nın N-metil-2-fenilindol ile reaksiyon vermesi sonucu karbosiyanin bileşiği oluşumu



Reaktifler ve Ön Hazırlıklar

Reaktif 1 (R1): Asetonitril içerisinde n-metil-2-fenilindol (3 x 18 mL). Deneme öncesinde R1 reaktifinin içeriği (18 mL) üzerine 6 mL %100 etanol eklenerek seyreltilmiş R1 reaktifi elde edildi. Bu çözelti +4C'de iki gün kararlıdır.

Reaktif 2 (R2): yoğunlaştırılmış hidroklorik asit (1 x 16,5 mL)

MDA standardı: Tris-HCl içerisinde 1.1.3.3-tetrametoksipropan (TMOP) (1 x 1,1 mL)

Bütile hidroksitoluen (BHT): Asetonitril içerisinde BHT (1 x 2 mL)

Probukol: Metanol içerisinde Probukol (1 x 1,1 mL)

Metanol: Metanol (1 x 30 mL)

Tüm reaktifler kullanılmadıkları zamanlarda +4C'de saklandı

MDA Ölçümü

MDA Standart Grafiğinin Çizilmesi

MDA standardı 10mM'lık stok çözelti halinde kit ile birlikte verilmektedir. Stok çözüldüden ve saf sudan aşağıdaki çizelgede belirtilen miktarlarda alınarak belirtilen konsantrasyonlardaki standartlar hazırlandı (Çizelge-I). Belirtilen son konsantrasyon reaksiyon ortamındaki 1000uL içerisinde MDA konsantrasyonu göstermektedir.

Çizelge-I: MDA-586 standart eğrisini çizmek için önerilen miktarlar

20 µM Standartın hacmi, µl	0	25	50	100	150	200
Su hacmi, µl	200	175	150	100	50	0
Son konsantrasyon, µM	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0

Denemenin Gerçekleştirilmesi

Tüm deney tüplerine 10 µl probukol ilave edildi. Tüplere 200'er µl örnek ya da standartlardan ilave edildi. Tüplere 640'ar µl seyreltilmiş R1 reaktifi ilave edildi. Tüm tüpler vortekslendi. Tüplere 150'şer µl R2 reaktifi ilave edildi. Tüplerin ağızları kapatılıp vortekslendi. Tüpler 45°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler 10000 x g'de 10 dakika santrifüjlenerek berrak bir süpernatan elde edildi. Berrak süpernatan temiz bir küvete aktarılarak 586 nm'de okuma gerçekleştirildi.

Hesaplamalar

Standartlardan elde edilen verilerden yararlanılarak konsantrasyonlara karşı elde edilen ortalama absorbanslar grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiğin eğimi ve kesişim noktası belirlendi (Absorbans = a x [MDA] + b). Aşağıdaki formülden yararlanılarak her bir örneğin MDA konsantrasyonu belirlendi.

A568 : Her bir örnek için elde edilen ortalama absorbans

a : Standart grafiğinden elde edilen eğim

b : Standart grafiğinden elde edilen kesişim noktası

[MDA]: MDA konsantrasyonu

df : Seyreltme faktörü

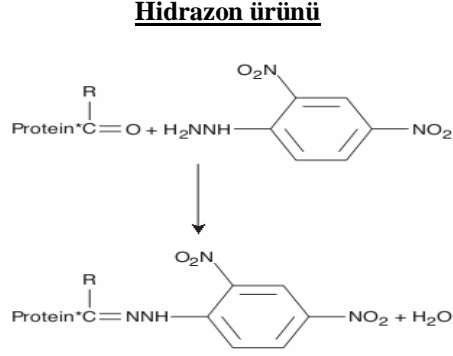
$[MDA] = \{(A568 - b) / a\} \times df$

5.5.2. Protein Karbonil

Yöntemin Prensibi

Protein preparatlarındaki karbonil miktarının belirlenmesi için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. En güvenilir yöntem ise 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile protein karbonilleri arasında meydana gelen reaksiyona dayanmaktadır. 2,4-dinitrofenilhidrazin proteinin karbonil grubu ile etkileşerek schiff bazı oluşturmaktadır ve sonuçta spektrofotometrik olarak belirlenebilen hidrazon ürünü elde edilmektedir (Şekil-XI).

Şekil-XI: 2,4-dinitrofenilhidrazin ile proteinin karbonil grubunun tepkimesinden oluşan hidrazon ürünü



Çalışmamızda Protein karbonil belirleme kiti (Protein Carbonyl Assay Kit 10005020, Cayman Chemicals, Michigan, ABD) kullanıldı. Plazmada, serumda, hücre lizatlarında ya da doku homojenatlarında güvenilir 96 kuyucuklu plate formatında protein karbonil ölçümü için DNPH'dan yararlanmaktadır. Oluşan protein-hidrazon 360–380 nm arasında maksimum absorpsiyon vermektedir ve miktarı spektrofotometrik ölçüm ile belirlenebilir.

Ön Hazırlıklar

1. Hidroklorik Asit:

Bu vial 12 M HCl içermektedir. Vial içeriği yavaşça 40 mL HPLC-derecesinde saf suya ilave edilerek 2,5 M HCl çözeltisi elde edildi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında en az 3 ay kararlıdır.

2. DNPH:

Bu vial 2,4-dinitrofenilhidrazin içermektedir. Vial içeriği 10 mL 2,5 M HCl içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti +4°C'de en az bir hafta kararlıdır. Çözelti dondurulmamalıdır ve karanlıkta saklanmalıdır.

3. TCA çözeltisi:

Bu vial 2 g /mL trikloroasetikasit çözeltisi içermektedir. Yavaşça 12 mL TCA çözeltisi 108 mL HPLC-derecesinde saf suya ilave edilir ve %20lik TCA çözeltisi elde edilmiş olur. %20lik TCA çözeltisinden 40 mL alınıp üzerine 40 mL HPLC-derecesinde saf su ilave edildiğinde %10luk TCA çözeltisi elde edilir. Her iki çözelti de oda sıcaklığında bir hafta kararlı durumda kalmaktadır.

4. Guanidin Hidroklorid:

Bu vial kullanıma hazır Guanidin Hidroklorid çözeltisi içermektedir.

5. Etanol

Bu vial kullanıma hazır etanol içermektedir.

6. Etil Asetat

Her bir vial 30 mL etil asetat içermektedir. 30 mL etil asetata 30 mL etanol ilave edilerek 1:1 etanol: etil asetat elde edilir.

Örnek hazırlığı

Toplanan örnekler 700–1000 x g'de +4Cde 10 dakika santrifüjlendi ve denemeye kadar -80°C de saklandı. Örnekler bu halde en az bir ay kararlıdır. Deneme öncesinde örnekler buz üzerinde tutuldu.

Karbonil Ölçümü

Tüm kuyucuklardaki son hacim 220 µl'dir. Çalışmanın başlangıcında örnekler dışındaki tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Her bir örnekten 200'er µl alınarak iki adet 2,0 mL'lik plastik tüpe aktarıldı. Tüplerden biri "örnek" diğeri "kontrol" olarak işaretlendi. Örnek tüplerine 800 uL DNPH, kontrol tüplerine ise 800 uL 2,5 M HCl çözeltisi eklendi. Tüm tüpler karanlıkta, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon sırasında tüm tüpler her 15 dakikada bir vortekslenerek karıştırıldı. Tüplere 1er mL %20lik TCA çözeltisinden eklendi ve tüpler vortekslenerek karıştırıldı. Tüpler buz üzerine yerleştirilir ve 15 dakika inkübe edildi. Tüpler 10000 x g'de +4Cde 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atılır ve pellet 1 mL %10luk TCA çözeltisi içinde süspanse edildi. Tüpler vortekslenerek karıştırıldı ve buz üzerine yerleştirildi ve 5 dakika inkübe edildi. Tüpler 10000 x g'de +4Cde 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atılır ve pellet 1 mL 1:1 etanol: etil asetat karışımı içerisinde süspanse edildi. Süspanسیون aşamasında spatül gibi manuel bir karıştırıcı kullanılabilir. Tüpler vortekslendi ve 10000 x g'de +4°Cde 10 dakika santrifüjlendi. Bir önceki basamak iki kez daha tekrar edildi. Son yıkamadan sonra protein pelletleri 500er uL guanidin hidroklorid çözeltisi içerisinde süspanse edilir ve vortekslenerek karıştırıldı. Tüpler 10000 x g'de +4°C'de 10 dakika santrifüjlendi. Her bir "örnek" tüpünden 220şer uL 96 kuyucuklu pleytin ikişer kuyucuğuna pipetlendi. Her bir "kontrol" tüpünden 220şer uL 96 kuyucuklu pleytin ikişer

kuyucuğuna pipetlendi.. Örnek ve kontrollerin absorbanları 360 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Hesaplamalar

Her bir örnek ve kontrol için ortalama absorban hesaplandı. Her bir örneğin ortalama absorbanından o örneğe ait kontrolün ortalama absorbanı çıkartıldı. Elde edilen absorban doğrulanmış absorbanı (CA). Proteinlerin karbonil içerikleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = [(CA)/(0,011 \mu\text{M}^{-1})] (500 \mu\text{l}/200\mu\text{l})$$

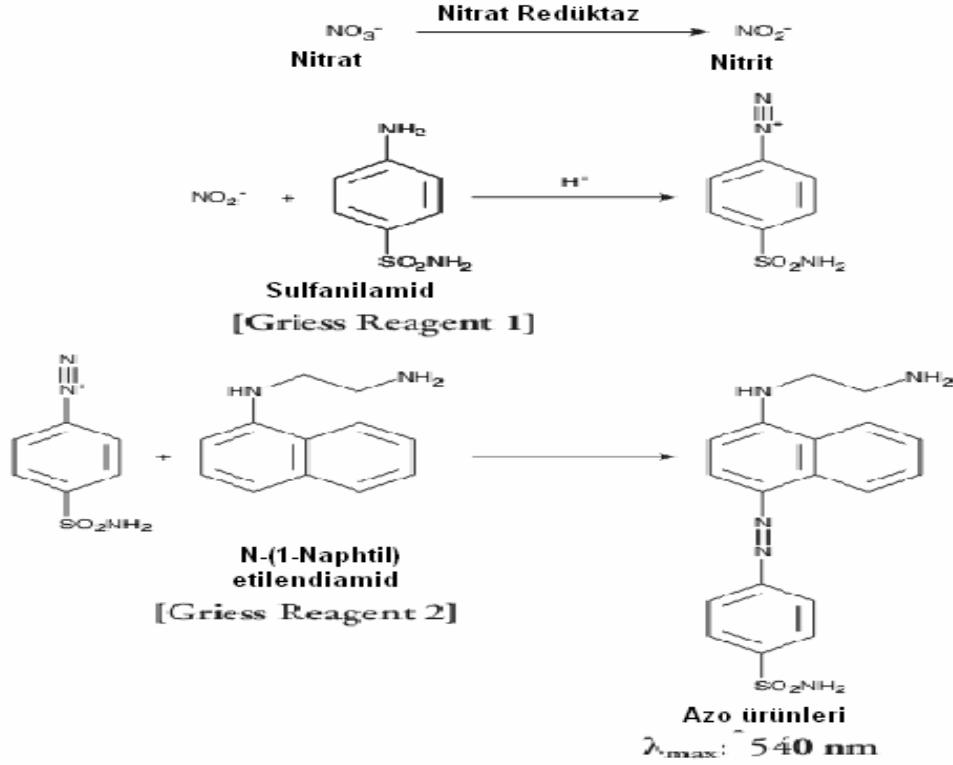
Dinitrofenilhidrazinin tükenme sabiti = $(0.022 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ dir. Yukarıdaki değer 96 well kuyucuklarındaki sıvı yüksekliğine göre bu değer kullanılmasıyla elde edilmiştir

5.5.3. Nitrik Oksit

Yöntemin Prensipleri

Çalışmada nitrat/nitrit belirleme kiti (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit 780001, Cayman Chemical, Michigan, ABD) kullanıldı. Yöntemde toplam nitrat/nitrit iki basamaklı bir yöntem ile sağlanmaktadır. İlk basamak, nitrat redüktaz aracılığı ile nitrat'ın nitrit'e indirgenmesidir. İkinci basamakta ise Griess Reaktifinin eklenmesi ile nitrit koyu mor azo türevine dönüştürülür (Şekil XII). Bu azo kromoforunun 540 nm'de fotometrik absorban ölçümü, nitrit konsantrasyonunun doğru olarak belirlenmesini sağlamaktadır.

Şekil-XII: Nitratın Azo türevine dönüştürüldüğü iki basamaklı mekanizma



Ön Hazırlıklar

- 1. Çalışma Tamponu** :Vial içeriği 100 mL ultra-saf su içerisinde çözüldü. Bu tampon çalışma öncesinde örneklerin seyreltilmesi için kullanıldı. Tampon +4C'de yaklaşık iki ay kararlıdır.
- 2.Nitrat Redüktaz**: Vial içeriği 1,2 mL çalışma tamponu içerisinde çözüldü. Kullanım sırasında buz üzerinde bekletildi. Kullanılmadığı zamanlarda ise -20°C'de saklandı. Enzim çözeltisi en fazla bir kez dondurulup çözüldü.
- 3. Enzim Kofaktörleri**: Vial içeriği 1,2 mL çalışma tamponu içerisinde çözüldü. Kullanım sırasında buz üzerinde bekletildi. Kullanılmadığı zamanlarda ise -20°C'de saklandı. Enzim çözeltisi en fazla bir kez dondurulup çözüldü.
- 4. Nitrat Standardı**: Vial içeriği 1,0 mL çalışma tamponu içerisinde çözüldü. Tüm içeriğin çözüldüğünden emin olunabilmesi için yeterli miktarda karıştırma ve vorteks yapıldı. Standartlar kullanılmadığı zamanlarda +4°C'de saklandı. Standartlar +4°C'de 4 ay kadar saklanabilir.

5. Nitrit Standardı: Vial içeriği 1,0 mL çalışma tamponu içerisinde çözüldü. Tüm içeriğin çözüldüğünden emin olunabilmesi için yeterli miktarda karıştırma ve vorteks yapılmadı. Kullanılmadığı zamanlarda +4°C'de saklandı. Standart +4°C'de 4 ay kadar kararlıdır.

6. Griess Reaktifleri R1 ve R2: Bu reaktifler kullanıma hazır haldedir. Reaktifler kullanılmadıkları zamanlarda +4°C'de saklandı.

Örnek hazırlığı

Örnekler 10 ya da 20 kDa moleküler ağırlık cut-off değerine sahip filtreler kullanılarak mikrosantrifüj ile filtrelendi.

Nitrat + Nitrit Ölçümü

Nitrat Standart Grafiği

Kantitatif nitrat + nitrit ölçümünün sağlanabilmesi için nitrat standart grafiği çizildi. Bu amaçla bir adet test tüpü içerisine 0,9 mL çalışma tamponu ve 0,1 mL hazırlanan nitrat standardından (ön hazırlıklar basamak:4) ilave edildi ve karışım vortekslendi. Bu stok standardının konsantrasyonu 200 uM idi. Bu stok kullanılarak diğer standartlar aşağıdaki çizelge-II'e göre 96 plate kuyucuklarında hazırlandı.

Çizelge-II: Nitrit/Nitrat standart hazırlama çizelgesi

Kuyu	Nitrat standardı (µl)	Assay buffer (µl)	Son nitrat konsantrasyonu* (µM)
A1,A2	0	80	0
B1,B2	5	75	5
C1,C2	10	70	10
D1,D2	15	65	15
E1,E2	20	60	20
F1,F2,	25	55	25
G1,G2	30	50	30
H1,H2	35	45	35

*Griess Reaktifleri eklendikten sonra toplam 200 uL hacim için hesaplanan konsantrasyon değerleri.

Çalışmanın Gerçekleştirilmesi

Bu 96 kuyucuklu pleytin kör için kullanılacak kuyucuklarına çalışma tamponundan 100'er µl ilave edildi. Her bir örnek için 3 adet kuyucuğa örnek sıvılarından 80'er uL ilave edildi Her bir kuyucuğa enzim kofaktör karışımından 10'ar µl ilave edildi. Her bir kuyucuğa nitrat redüktaz karışımından 10'ar µl nitrat redüktaz karışımından ilave edildi. Plate yüzeyi koruyucu ile kaplanarak oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 50'şer µl Griess Reaktif R1 ilave edildi. Hemen ardından her bir kuyucuğa 50'şer µl Griess Reaktif R2 ilave edildi. Renk oluşumu için oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra 540 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

Nitrit Ölçümü

Nitrit Standart Grafiği

Bazı substrat ve enzimlerin kullanılmamasıyla nitrit ölçümü doğrudan gerçekleştirilebilir. Bu amaçla örnek ortamındaki nitratin nitrite indirgendiği basamaklar (nitrat redüktaz) atlanarak ortamdaki nitratin nitrite dönüşmesi engellenir ve ölçüm sonucu elde edilen sonuç çözeltinin içerisindeki nitrit miktarını vermektedir. Bu işlemin gerçekleştirilebilmesi için nitrit standart grafiği çizilmelidir. Bu amaçla bir adet test tüpü içerisine 0,9 mL çalışma tamponu ve 0,1 mL hazırlanan nitrit standardından ilave edilir ve karışım vortekslenir. Bu stok standardının konsantrasyonu 200 µM'dür. Bu stok kullanılarak diğer standartlar aşağıdaki çizelge-III'e göre 96 plate kuyucuklarında hazırlanır.

Çizelge-III: Nitrit konsantrasyonu belirlemek için hazırlanan stok çizelgesi

Kuyu	Nitrit standardı (µl)	Assay buffer (µl)	Son nitrit konsantrasyonu** (µM)
A1,A2	0	100	0
B1,B2	5	95	5
C1,C2	10	90	10
D1,D2	15	85	15
E1,E2	20	80	20
F1,F2,	25	75	25
G1,G2	30	70	30
H1,H2	35	65	35

Çalışma tamponu yerine ultra-saf su da kullanılabilir

**Griess Reaktifleri eklendikten sonra toplam 200 uL hacim için hesaplanan konsantrasyon değerleri

Çalışmanın Gerçekleştirilmesi (96-kuyucuklu plate için)

Kör için kullanılacak kuyucuklara 200'er µl çalışma tamponundan ilave edildi. Her bir örnek için 3 adet kuyucuğa 100'er µl örnek sıvılarından ilave edildi. Her bir kuyucuğa 50'şer uL Griess Reaktifi R1 ilave edildi. Hemen ardından her bir kuyucuğa 50'şer µl Griess Reaktifi R2 ilave edildi. Renk oluşumu için oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra 540 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

Hesaplamalar

Kör değerlerinin çıkartılması: Kör için ayrılmış olan kuyucukların absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak elde edilen değer tüm diğer kuyucuklardan elde edilen absorbans değerlerinden çıkartıldı.

Standart Grafiklerinin Çizilmesi: Bilinen nitrat ya da nitrit konsantrasyonlarına karşı 540 nm'de ölçülen absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Nitrat grafiğinin eğimi toplam nitrat + nitrit konsantrasyonunun belirlenebilmesi için kullanılırken, nitrit grafiğinin eğimi sadece nitrit miktarının belirlenmesi için kullanıldı.

Hesaplama:

A540 = Her bir örnek için 540 nm'de ölçülen ve köre göre düzeltilen absorbans değerlerinin ortalaması

Eğim = Standart grafiklerinden (nitrat ya da nitrit) hesaplanan eğim

Örnek hacmi (Ö.H) = nitrit + nitrat denemesi için 80µl, nitrit denemesi için 100 µl

Nitrit + nitrat (µM) = (A540 / eğim) x (200 µl / Ö.H.) x seyreltme faktörü

Nitrit (µM) = (A540 / eğim) x (200 µl / Ö.H.) x seyreltme faktörü

Nitrat (µM) = (Nitrit + nitrat) - nitrit

5.6. İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11,0) programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar sunulurken ortalamalar standart hataları ile birlikte verildi ($Ort \pm SH$). Çalışma ve genel hasta popülasyonu arasında MII, fertilizasyon ve Klivaj oranları açısından ve oluşturulan bazı gruplar arasında gerekli olan durumlarda farkı belirlemek Ki Kare Analizi (Yates düzeltmeli) yapılmıştır. Oluşturulan iki grup ortalaması arasında fark olup olmadığını belirlemek için parametrik koşullarda bağımsız gruplarda **t** Testi, non-parametrik koşullarda bağımsız gruplarda Mann-Whitney U Testi kullanıldı. İki den fazla bağımsız grubun ortalamaları karşılaştırılırken parametrik koşullarda Varyans Analizi (One Way ANOVA), non-parametrik koşullarda Kruskal-Wallis Varyans Analizi yapıldı. Anlamli çıkan sonuçların hangi gruptan kaynaklandığını tespit etmek için Varyans Analizi kullanılan durumda Bonferroni Düzeltmeli t Testi, Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanılan durumda Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U Testi yapıldı. Nitrik oksit ile embriyo kalitesi, yaş ile oksidatif stres belirteç düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Pearson'un Korelasyon Analizi yapıldı. Lipit peroksidasyon, NO ve protein karbonil düzeylerinin ART sonuç parametrelerini tahmin etmedeki sensitivite ve spesifite hesaplamaları için ROC Eğrisi oluşturuldu. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışma Ağustos 2007- Ekim 2007 tarihleri arasındaki hastalardan elde edilen follikül sıvılarında gerçekleştirildi. Çalışmaya başlanan 85 hastadan dokuz tanesi daha sonra çalışma dışı bırakıldı. Bu dokuz hasta ilk üç follikülün ponksiyonundan oosit elde edilemeyip follikül yıkaması yapıldığı için çalışma dışı bırakıldı. Dokuz hasta çıktıktan sonra kalan 76 hastadan toplam 287 follikül sıvısı ve oosit alındı. Ancak alınan follikül sıvılarından toplam 38 tanesi çalışma dışı bırakıldı. Nedenleri: analiz için sıvının yetersiz olması (n=14), kan ile kontaminasyon (n=9), tüp içinde bir önceki folliküle ait oosit olması (n=6) ve oksidatif stres belirteç analizinde sonuç vermemesi (n=9) idi. Azospermi nedeniyle TESE uygulanan 10 hastadan beşinde sperm bulunamadı. Ancak bu beş hastadan elde edilen 21 oosit ve ait oldukları follikül sıvıları sadece oosit kalitelerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı. Kalan 228 follikül sıvısı ve oosit ise tüm parametreler açısından değerlendirildi.

Hastaların ortalama yaşları 31,8 (20–44) idi. Hastalara 33'üne erkek faktör, 20'sine kadın faktör, 9'üne hem kadın hem erkek faktör ve 14 tanesi de açıklanamayan infertilite nedeniyle IVF/ICSI uygulandı.

Tablo -III: Hastaların infertilite nedenleri, hasta sayıları ve çalışma için alınan follikül sayıları

Endikasyonlar	Hasta sayısı (n)	Alınan oosit ve ait oldukları follikül sıvısı sayısı (n)
PCOS	9	35
Tubal faktör	12	30
Endometriosis	3	7
Poor responder	1	2
İleri kadın yaşı	4	10
Erkek faktör	33	119
Açıklanamayan infertilite	14	46
Toplam	76	249

Çalışmada kullanılan follikül sıvılarının ortalama±standart hata ile MDA, Nitrit/Nitrat ve protein karbonil seviyeleri Tablo-IV'te gösterilmiştir.

Tablo- IV: Follikül sıvılarının MDA, Nitrit/Nitrat ve protein karbonil düzeyleri

n=249	Ort ±SH	Sınır Değerler
MDA (µmol/L)	5,80 ±0,41	0,4–40,5
Nitrit/Nitrat (NO) (nmol NO/mg protein)	44,07±0,71	9,63–71,38
Protein Karbonil (nmol/ml)	14,46±0,38	4,30–44,32

-(NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Çalışmaya dâhil edilen 76 hastadan, ortalama 13,6±6,8 (2–33) toplam 1031 adet oosit alındı. Bu 76 hastaya ait 1031 oositin 822 tanesi MII oosit. Bu 822 MII oositin 60 tanesine TESE’de sperm bulunamayan hastalara ait olduğu için ICSI yapılamadı. Kalan 762 MII oosite, iki adette kültür ortamında MII’ e ilerleyen oosite eklenince toplamda 764 oosite ICSI yapıldı. Bu 764 oositten 604 tanesi fertilize olurken toplam 575 adet embriyo elde edildi. Çalışma grubunu ise ortalama 3,3±1,2 (1–5) toplam 249 oosit ve ait oldukları follikül sıvıları oluşturdu. Follikül sıvıları çalışmaya dâhil edilen 249 oositten ise 224 tanesi MII, iki tanesi de kültür ortamında MII’e ilerleyen MI idi. Bu 226 oositin 21 tanesi TESE’de sperm bulunamayan hastalara ait olduğu için kalan 205 oosite ICSI yapıldı. Bu 205 oositin 164 tanesi fertilize olurken toplam 155 embriyo elde edildi. Çalışmaya katılan 76 hastanın 70 tanesine embriyo transferi yapıldı. Embriyo transferi yapılamayan altı hastadan beş tanesi TESE’de sperm bulunamadığı için ICSI yapılamayan hastalardı. Bir hastada ise ICSI sonrası embriyo elde edilemediği için transfer yapılamadı. Hasta başına ortalama 3,34±1,28 (1–6) embriyo transfer edilirken genel hasta popülasyonunda embriyo transfer başına %50 gebelik ve % 44,3 klinik gebelik gerçekleşti.

Çalışma grubu (249 oosit) ve genel (1031 oosit) arasında matür oosit oranları arasında fark tespit edilirken, çalışma ya da genel hasta grubunda olma fertilizasyon ve klivaj oranları açısından anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Ancak embriyo transfer günü çalışma grubunu ve genel popülasyonu oluşturan embriyolar karışık transfer edildiği için transfer edilen ortalama 3,34±1,28 (1–6) embriyonun hangisinden gebelik veya gebeliklerin elde edildiğinin belirlenememesinden dolayı, çalışma grubuna ait gebelik oranı vermek mümkün olmamıştır (Tablo–V).

Tablo-V: Çalışma grubu ile genel hasta grubunun karşılaştırılması

	Matürasyon					*P Değeri
	M II		Diğer		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%		
Çalışma Grubu	224	89,9	25	10,04	249	<0,001
Genel Popülasyon	822	79,7	209	20,3	1031	
	Fertilizasyon					*P Değeri
	Var		Yok		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%		
Çalışma Grubu	164	80	41	20	1205	0,894
Genel Popülasyon	604	79,1	160	20,9	2764	
	Klivaj					*P Değeri
	Var		Yok		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%		
Çalışma Grubu	155	94,5	9	5,5	164	0,876
Genel Popülasyon	575	95,2	29	4,8	604	
	**Biyokimyasal Gebelik		**Klinik Gebelik		**Toplam Gebelik	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Çalışma Grubu	4	5,7 (4/70)	31	44,3 (31/70)	35	50 (35/70)
Genel Popülasyon						

¹ Çalışma grubunda TESE'de sperm bulunamayan hastaların ICSI yapılmayan oositleri çıkarılmıştır. [(224 MII+2 MII) -21 MII =205 MII' e ICSI yapıldı].

² Genel hasta popülasyonunda TESE'de sperm bulunamayan hastaların ICSI yapılmayan oositleri çıkarılmıştır [(822 MII+2 MII -60 MII =764 MII' e ICSI yapıldı].

* Yates düzeltmeli Ki-Kare testi

** Embriyo transfer başına düşen gebelik (embriyo transfer sayısı 70)

Çalışmada germinal vezikül ve atretik oositler (n=23) çıkarıldığı zaman geriye kalan 226 oosit (224 adet MII+2 adet MI) sitoplazma morfolojilerine göre değerlendirildi. Bu oositlerden 32 tanesi normal sitoplazmalı (şeffaf) (Grup 1) ve 194 tanesi anormal sitoplazmalıydı (koyu granüler, vakuol, refraktil cisim ve/veya granüler) (Grup 2). Her iki grup karşılaştırıldığında

normal sitoplâzmalı grupta anormal sitoplâzmalı gruba göre MDA'nın anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo-VI).

Tablo -VI: Normal ve anormal sitoplâzmalı oosit elde edilen follüküller sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri

Oksidatif Stres Belirteçleri n=226	Grup 1 n=32 Ort ±SH	Grup 2 n=194 Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı %95	
				Alt Değer	Üst Değer
MDA (µmol/L)	9,02 ±1,99	5,43 ±0,39	P=0,004	1,13	6,05
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mg protein)	45,26± 2,00	44,04 ±0,84	P=0,577	—3,17	5,62
Protein karbonil (nmol/ml)	14,11± 3,60	15,21± 0,64	P=0,261	—3,02	0,83

* t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Nükleer morfolojik değerlendirmesi yapılan 249 oosit, nükleer maturasyonlarına göre karşılaştırıldığında matür oositler (MII: Grup 1) ile diğerleri (MI, GV, atretik: Grup 2) arasında elde edildikleri follüküllerin sıvılarındaki oksidatif stres belirteç düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo- VII).

Tablo-VII: Oositlerin nükleer maturasyonlarına göre oksidatif stres belirteç düzeyleri

Oksidatif Stres Belirteçleri n=249	Grup 1 n= 224 Ort ±SH	Grup 2 n= 25 Ort ±SH	P* değeri
MDA (µmol/L)	5,80± 0,43	6,26 ±1,22	P=0,739
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mg protein)	44,06± 0,74	43,69± 2,06	P=0,874
Protein karbonil (nmol/ml)	14,88 ±0,51	13,00 ±0,77	P=0,569

* Mann -Whitney Test, (NO)=Nitrik Oksit, (MDA)=Malondialdehit

Çalışma grubundaki 249 oositin 21 tanesine TESE işleminde sperm bulunamayan hastalara ait olduğu için ve 23 tanesine de immatür olduğu için ICSI yapılmadı. Mikroenjeksiyon yapılan 205 oositin 164 tanesi fertilize oldu (% 80, Grup 1) ve 41 tanesi fertilize olmadı (%20, Grup 2).

Her iki grup karşılaştırıldığında da fertilize olan oositlerin follikül sıvılarında MDA düzeyinin fertilize olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo-VIII)

Tablo–VIII: Fertilizasyona göre folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.

Oksidatif Stres Belirteçleri n=205	Fertilize olan n=164 (%80) Ort ±SH	Fertilize olmayan n=41 (%20) Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı %95	
				Alt Değer	Üst Değer
MDA (µmol/L)	<u>6,37±0,57</u>	3,70±0,33	P=0,022	0,38	4,94
Nitrit/Nitrat (nmol NO/mprotein)	43,88± 0,81	42,65 ±2,09	P=0,58	-3,27	5,74
Protein karbonil (nmol/ml)	14,72 ±0,65	16.00 ±1,26	P=0,37	-4,16	1,60

*t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Fertilize olup bölünmeye devam eden (klivaj olan) (Grup 1) ve bölünmeye devam etmeyen (Grup 2) embriyoların folliküler sıvıları karşılaştırıldığında her iki grup arasında oksidatif stres belirteç düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Tablo IX).

Tablo–IX: Bölünmeye devam eden ve devam etmeyen embriyoların ait oldukları folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri

Oksidatif Stres Belirteçleri n=164	Grup–1 n=155 (% 94,5) Ort ±SH	Grup–2 n=9 (% 5,5) Ort ±SH	P* değeri
MDA (µmol/L)	6,36 ±0,60	6,31±1,75	P=0,586
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	44,12±0,82	39,79 ±3,66	P=0,398
Protein karbonil (nmol/ml)	14,71 ±0,68	14,85±1,34	P=0,498

*Mann –Whitney Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Fertilize olup erken bölünmeye başlayan (24 saatten önce) (Grup 1) ve erken bölünme olmayan (Grup 2) embriyoların folliküler sıvıları karşılaştırıldığında her iki grup arasında oksidatif stres belirteç düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo–X).

Tablo–X: Erken klivaj olan ve olmayan embriyoların ait oldukları folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.

Oksidatif Stres Belirteçleri n=155	Grup 1 n=22 (%14,2) Ort ±SH	Grup 2 n=133 (%85,8) Ort ±SH	P* değeri
MDA (µmol/L)	5,85± 0,87	6,45± 0,68	P=0,561
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	42,19±1,34	44,46±0,94	P=0,168
Protein Karbonil (nmol/ml)	16,17±1,98	14,41±0,71	P=0,258

*Mann –Whitney Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Çalışmaya dâhil edilen oositlerin mikroenjeksiyonu sonrası 48. saatte, elde edilen embriyolar kalitelerine göre gruplandırıldı. Buna göre en üst kalite (grade,1:Grup–1) ve diğer alt kalite embriyolar (grade2+3+4:Grup–2) elde edildikleri oositlerin folliküler sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri açısından her iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo- XI).

Tablo–XI: İkinci gün embriyo kalitesine göre folliküllerin sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri

Oksidatif Stres Belirteçleri n=155	Grup 1 n=72 (%46,5) Ort±SH	Grup 2 n=83 (%53,5) Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı (%95)	
				Alt değer	Üst değer
MDA (µmol/L)	6,50 ±0,80	6,24 ±0,88	P=0,827	—2,10	2,63
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	42,99 ±1,21	45,20 ±1,12	P=0,182	—5,47	1,04
Protein Karbonil (nmol/ml)	15,89±1,45	13,80± 0,43	P=0,128	—0,61	4,79

* t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Çalışmaya dâhil edilen oositlerin mikroenjeksiyonu sonrası 72. saatte elde edilen embriyolar elde edildikleri folliküler sıvıların, oksidatif stres belirteç düzeyleri karşılaştırıldı. Grup 2’de (alt kalite, grade 2, 3, 4) Nitrit/Nitrat düzeyleri Grup 1’e göre (en üst kalite, grade 1) anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi. Protein karbonil düzeylerinin Grup 2’de Grup 1’e göre anlamlı

olarak daha düşük olduğu bulundu (Tablo–XII). Yaptığımız korelasyon analizinde de folliküler sıvı NO konsantrasyonu ile embriyo kalitesinin negatif korelasyon gösterdiğini tespit ettik ($r = -0,273$; $P=0.006$).

Tablo–XII: Üçüncü gün embriyo kalitesine göre follikül sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri.

Oksidatif Stres Belirteçleri n=111	Grup 1 n=52 (%46,8) Ort±SH	Grup 2 n=59 (%53,1) Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı %95	
				Alt değer	Üst değer
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	7,02 ±1,04	7,47 ±1,20	P=0,780	—3,63	2,73
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	40,12 ±1,49	<u>45,50 ±1,21</u>	P=0,006	—9,18	—1,54
Protein karbonil (nmol/ml)	<u>16,91± 1,85</u>	13,45 ±0,58	P=0,045	0,08	6,84

* t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Follikül sıvılarını elde edildikleri hastaların yaşlarına göre 35 yaş altı (Grup 1), 35 yaş ve üzeri (Grup 2) olarak iki gruba ayrıldı. Her iki grup oksidatif stres belirteç düzeyleri açısından karşılaştırıldığında MDA konsantrasyonunun 35 yaş altı kadınlardan elde edilen oositlerin ait oldukları follikül sıvılarında anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo XIII). Yapılan korelasyon analizinde yaş ile MDA düzeyleri arasında zayıfta olsa ters bir korelasyon ($r=-0,133$, $P=0,049$) olduğu görüldü

Tablo -XIII: 35 yaş sınır değerine göre oksidatif stres belirteç düzeyleri

Oksidatif Stres Belirteçleri (n=249)	Grup 1 (35 yaş altı) (n=170) Ort ±SH	Grup 2 (35 yaş ve üstü) (n=79) Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı %95	
				Alt Değer	Üst Değer
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	<u>6,42 ±0,57</u>	4,64 ±0,36	P=0,049	0,08	3,47
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	44,04±0,85	43,98±1,22	P=0,969	-2,88	3,00
Protein Karbonil (nmol/ml)	14,89±0,61	14,56±0,68	P=0,332	-1,47	2,14

* t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Foliküler sıvılar PCOS'lu hastalardan elde edilenler (Grup-1, n=35), PCOS olmayan ancak overleri polikistik görünümde (PCO) olan (Grup 2, n=54) ve diğerleri (Grup 3, n=160) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Gruplar oksidatif stres belirteç düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Foliküler sıvı MDA ve Nitrit/Nitrat düzeylerinin gruplar arasında anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi. Malondialdehit için yapılan varyans analizinde MDA düzeyindeki farkın PCOS grubundan kaynaklandığı ve ikinci ve üçüncü gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve ikinci ve üçüncü gruplar arasında fark olmadığı tespit edildi. Nitrit/Nitrat düzeyinin de PCO'lu (Grup 2) hastalarda üçüncü gruba göre anlamlı olarak yüksek fakat PCOS grubuyla anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Protein karbonil düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı. (Tablo XIV).

Tablo-XIV(a): PCOS, PCO ve diğer hastaların oksidatif stres düzeyleri

Oksidatif Stres Belirteçleri (n=249)	Grup 1 (PCOS) (n=35) Ort±SH	Grup 2 (PCO) (n=54) Ort±SH	Grup 3 (Diğer) (n=160) Ort±SH	P* değeri
MDA (µmol/L)	10,50±1,96	4,25±0,32	5,25±0,36	P<0.001
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	44,89±1,49	49,54±1.04	41,82±0,94	P<0.001
Protein Karbonil (nmol/ml)	15,89±1,62	13,65±0,67	14,99±0,61	P=0.334

*Oneway Anova, Post Hoc Benferroni t test. (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Polikistik over sendromu ve PCO grubu arasında yaş, elde edilen total oosit sayıları, MII, fertilizasyon, klivaj, elde edilen total embriyo, transfer edilen embriyo ve gebelik oranları açısından aralarında anlamlı bir fark saptanmazken (Tablo-XIV-b) PCOS grubunda MDA düzeyinin PCO grubuna göre anlamlı olarak yüksek olmasının PCOS'un kendi patofizyolojisinden kaynaklandığı düşünüldü.

Tablo–XIV-(b): PCOS ve PCO gruplarının karşılaştırılması

n=Hasta Sayısı	PCOS (n=9) Ort±SH	PCO (n=13) Ort±SH	P Değeri
Yaş	28,56±1,41	31,77±1,64	*P=0,365
Total Oosit Sayısı	22,11±1,72	17,90±1,71	*P=0,094
M II Sayısı	18,56±1,88	15,5±157	*P=0,748
M II (%)	83,89±5,97	84,31±3,80	*P=0,794
Fertilizasyon (%)	81,22±4,61	86,77±3,67	*P=0,297
Klivaj (%)	95,89±1,84	80,85±9,18	*P=0,324
Total Embriyo Sayısı	14,33±1,73	12,90±1,65	*P=0,331
Transfer Embriyo Sayısı	3,00±0,24	3,92±0,37	*P=0,107
Gebelik (%)	44,4	61,5	**P=0,467
Gonadotropin dozu (Ünite)	1539,14±69,63	2636,11±230,77	§P<0,0001

Mann –Whitney Test, ** Yates düzeltilmeli Ki-Kare testi, § t Testi

Polikistik over sendromlu hastalardan alınan folliküler sıvı MDA düzeyleri diğer folliküler sıvılara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu için PCOS’lu hastaların folliküler sıvıları (n=35) çıkarılarak kalan 214 follikül sıvısı her bir hastadan elde edilen toplam oositler Tablo-XV’de belirtilen sınır değerlere göre beş gruba ayrıldı. Gruplar oksidatif stres belirteç düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Folliküler sıvı MDA ve Nitrit/Nitrat düzeylerinin gruplar arasında anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi. Malondialdehit için yapılan varyans analizinde Grup 1 ve Grup 5 arasında fark olmadığı ancak Grup 1 ve Grup 5’nin Grup 2, Grup 3, Grup 4’ten anlamlı olarak farklı olduğu görüldü (P=0,003). Nitrik oksit için yapılan varyans analizinde de Grup 1 ve Grup 5 arasında fark olmadığı ancak Grup 1 ve Grup 5’nin Grup 2, Grup 3, Grup 4’ten anlamlı olarak farklı olduğu görüldü (P=0,021). Buna göre kötü cevap veren (elde edilen oosit sayısı 1–5) ve aşırı cevap veren grup (oosit sayısı 21 ve üzeri) olarak da tanımlayabileceğimiz gruplarda MDA düşük iken NO yüksek olduğu bulundu. Normal cevap veren grup olarak da tanımlayabileceğimiz (elde edilen oosit sayısı 6–20) grupta ise MDA düzeyi yüksek, NO düzeyi düşük olarak tespit edildi. Hastalara verilen gonadotropin dozları gruplara göre değerlendirildiğinde kötü cevap verenlerde gonadotropin dozlarının diğer gruplara göre anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edildi.(Tablo-XV). Yapılan korelasyon analizinde PCOS dahil ve PCOS hariç grupların her ikisinde birden kullanılan total gonadotropin dozları ile oksidatif stres belirteçleri arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir. MDA için (P=0,987), Protein karbonil için (P=0,546) ve NO için (P=0,505).

Tablo-XV: PCOS dışındaki hastalarda elde edilen oosit sayısı sınır değerlerine göre oksidatif stres belirteç düzeyleri

	Elde edilen oosit sayısı sınır değerleri	Elde edilen ortalama oosit sayısı Ort±SH	Oosit sayısı (n)	MDA (µmol/L) Ort±SH	NO (nmolNO/mgprotein) Ort±SH	Protein Karbonil (nmol/ml) Ort±SH	Gonadotropin Dozları (Ünite) Ort±SH (min-max)
Grup 1	1-5	3,53±0,22	15	3,35±0,44	45,35±2,34	13,92±1,23	5253,33±486,76 (3500-8550)
Grup 2	6-10	8,04±0,21	49	6,26±0,76	42,68±1,38	14,26±0,66	3668,46±294,45 (1000-8400)
Grup 3	11-15	12,68±0,15	78	5,36±0,41	42,66±1,02	15,58±1,09	3140,70±178,03 (800-6675)
Grup 4	16-20	17,59±0,19	46	4,60±0,67	42,60±2,36	13,87±0,56	3065,98±270,48 (1500-8920)
Grup 5	21+	25,27±0,46	26	3,35±0,26	50,49±1,96	14,02±0,83	2465,38±269,20 (675-4500)
	Toplam	13,56±0,43	214	4,99±0,28	43,87±0,77	14,62±0,48	3311,51±126,47 (765-8920)
*P değeri				P=0,003	P=0,021	P=0,988	P<0.001

NO:Nitrik Oksit, **MDA:**Malondialdehit. *Kruskal-Wallis Varyans Analizi, Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U

Tablo-VIII'den farklı olarak polikistik over sendromlu hastalardan alınan follükler sıvılar değerlendirme dışı bırakılıp, fertilize olan ve olmayan oositlerin ait oldukları follükler sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri analiz edildiğinde aynen PCOS dâhil grupta olduğu gibi fertilize olan grupta MDA düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo XVI).

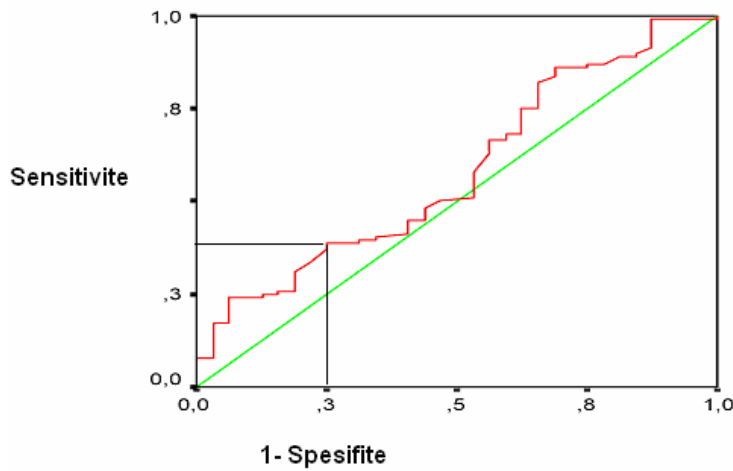
Tablo-XVI: Fertilizasyon ile follükül sıvıları oksidatif stres düzeyleri (PCOS çıkarılmıştır)

Oksidatif Stres Belirteçleri	Fertilize olan (%78,8) Ort ±SH	Fertilize olmayan (%21,2) Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı %95	
				Alt Değer	Üst Değer
MDA (µmol/L)	<u>5,24±0,35</u>	3,69±0,34	P=0,027	0,18	2,93
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	43,93± 0,88	42,34 ±2,12	P=0,491	—3,03	6,22
Protein Karbonil (nmol/ml)	14,47 ±0,62	15,99 ±1,26	P=0,285	—4,39	1,33

t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit.

Fertilizasyonu belirlemek için MDA'nın 4,39 µmol/L cut-off değeri alındığında sensitivite % 40, spesifite % 69, Pozitif Prediktif Değer (PPD) % 82,1 ve Negatif Prediktif Değer (NPD) % 23,9 olarak tespit edildi (Şekil-XIII).

Şekil-XIII: Fertilizasyon ve MDA için yapılan ROC Eğrisi



Tablo XI ve XII' den farklı olarak polikistik over sendromlu hastaların oositlerinden gelişen embriyolar çıkarılıp kalan en üst kalite embriyolar (Grup 1, grade 1) ile diğer alt kalite embriyoların (Grup 2, grade 2, 3, 4) ait oldukları folliküler karşılaştırıldığında aynen PCOS dâhil grupta olduğu gibi ikinci gün embriyolarda bir fark bulunamazken, üçüncü gün embriyolarda birinci gruptaki Nitrit/Nitrat düzeyleri **ikinci** gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu (P=0,039). Protein karbonil düzeyleri ise birinci grupta anlamlı olarak yüksek bulundu. (P=0,032) (Tablo- XVII)

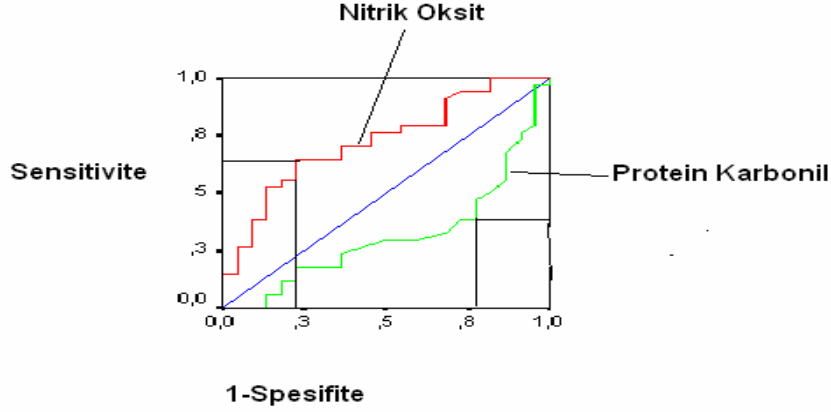
Tablo–XVII: Üçüncü gün embriyo kalitesine göre oksidatif stres düzeyleri (PCOS çıkarılmıştır)

Oksidatif Stres Belirteçleri n=93	Grup 1 n=43 Ort±SH	Grup 2 n=50 Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı %95	
				Alt Değer	Üst Değer
MDA (µmol/L)	6,17±0,80	5,43±0,60	P=0,469	—1,27	2,74
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	40,85±1,79	<u>45,62±1,40</u>	P=0,039	—9,30	—0,25
Protein Karbonil (nmol/ml)	<u>17,94±2,31</u>	13,58±0,63	P=0,032	0,38	8,35

*t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

Üçüncü gün embriyo kalitesini belirlemede PCOS dışında kalan embriyolar için yapılan analiz sonucu NO'in 43,06 nmol NO/mgprotein cut-off değerinde kötü kalite embriyoyu tahmin etmedeki sensitivitesi % 65, spesifitesi %74, PPD % 61,4 ve NPD % 62,2 olarak bulundu. Protein karbonil için ise iyi kalite embriyoyu tahmin etmede 13,75 nmol/ml cut-off değerinde sensitivite %77, spesifite % 60, PPD % 54,8 ve NPD % 80,8 olarak tespit edildi (Şekil-XIV).

Şekil-XIV: Embriyo kalitesi için yapılan ROC Eğrisi



Çalışmaya katılan hastaların folliküler sıvıları embriyo transferi yapıp gebelik elde edilenler ve embriyo transfer sonrası gebelik elde edilmeyenler olarak iki gruba ayrılıp oksidatif stres belirteç düzeyleri incelendi. Gebelik elde edilen gruba, gebelik elde edilmeyen gruba göre MDA düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğu, ancak NO ve protein karbonil düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo-XVIII).

Tablo-XVIII: Hastaların gebelik durumuna göre oksidatif stres belirteç düzeylerinin karşılaştırılması.

Oksidatif Stres Belirteçleri **n=70	Gebelik Var n=35 Ort±SH	Gebelik Yok n=35 Ort ±SH	P* değeri	Güvenlik Aralığı %95	
				Alt Değer	Üst Değer
MDA (µmol/L)	<u>7,18±0,79</u>	4.70±0,60	P=0,005	0,76	4,18
Nitrit/Nitrat(NO) (nmol NO/mgprotein)	43,39±1,23	44,04±0,80	P=0,658	—3,55	2,25
Protein Karbonil (nmol/ml)	15,41±0,77	14,04±0,65	P=0,175	—0,61	3,35

* t Test, (NO):Nitrik Oksit, (MDA):Malondialdehit

** Embriyo transferi yapılan hasta sayısı

Gebelik elde edilen grup ile gebelik elde edilmeyen gruplar yaş, elde edilen total oosit ve MII sayısı, MII, ve klivaj oranları yönünden benzerdi. Ancak gebelik gerçekleşen grupta normal sitoplâzma ve fertilizasyon oranları ile elde edilen total embriyo sayıları fazla olsa da muhtemelen hasta sayısının az olmasından dolayı anlamlılık düzeyine ulaşmadı. Gebelik gerçekleşen grupta transfer edilen embriyo sayıları yüksek bulundu. (Tablo-XIX).

Tablo-XIX: Hastaların gebelik durumuna göre özelliklerinin karşılaştırılması

	Gebelik Var (n=35) Ort±SH	Gebelik Yok (n=35) Ort±SH	P Değeri
Yaş	32,2±0,81	31,3±0,98	*P=0,478
Total Oosit Sayısı	13,54±1,05	12,91±1,18	*P=0,694
M II Sayısı	11,3±0,96	9,9±1,00	*P=0,318
M II (%)	82,5±2,71	76,3±3,25	*P=0,153
En üst kalite sitoplâzma (%)	18,3	9,4	**P=0,07
Fertilizasyon (%)	83,9±2,51	76,7±3,42	*P=0,057
Klivaj (%)	90,77±3,72	89,3±4,36	*P=0,762
Total Ortalama Embriyo Sayısı	9,00±0,94	6,97±0,80	*P=0,106
Transfer Embriyo Sayısı	3,71±0,16	2,91±0,18	*P=0,001

* t Test, ** Yates düzeltilmeli Ki-Kare testi

7.TARTIŞMA

Kadın İnfertilitesi prevalansı yaşa bağımlı olarak %7 ile %28 arasında değişmektedir. Genellikle çiftlerin %84'ü korunmasız ilişki sonrası bir yıl içerisinde, %92'si de iki yıl içerisinde gebe kalmaktadır. İnfertilitenin %40-50'si kadına bağlı sebeplerden olmaktadır [8]. İn vitro fertilizasyon alanında son 25 yılda olan önemli gelişmeler olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri genelinde ART uygulamalarında embriyo transferi başına canlı oranları % 34' e kadar ulaşmıştır. [1,2]. Yardımcı üreme tekniklerinde sonucu en çok etkileyen iki faktörden birincisi hasta yaşı diğeri ise elde edilen oosit ve embriyo kalitesidir. Oosit kalitesinin fertilizasyon hızına, embriyo kalitesine ve viabilitesine direkt olarak etki ettiği bilinmektedir [5, 19, 72, 73]. Bu nedenle in vitro fertilizasyonda amaç uygun sayıda, en iyi kalite oositi elde edip yüksek oranda fertilizasyon ve ilk üç bölünmeyi sağlayıp yine en iyi kalite embriyolar elde ederek gebelik şansını artırmaktır.

Overdeki fagositik makrofajların, parenkimal steroid sentezleyen hücrelerin ve endotel hücrelerinin reaktif oksijen türlerini ürettiklerinin tespit edilmesi ile oksidatif stresin over fizyolojisinde rol aldığı gösterilmiştir [18,74–76]. Reaktif oksijen türleri ve antioksidan mekanizma arasındaki dengesizlikten kaynaklanan oksidatif stresin apoptozu uyarak embriyo fragmentasyonuna ve embriyonun hatching hızında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir [77]. Fallop tüplerinde oksidatif stresin embriyoya zararlı etkilerde bulunabilmektedir [78]. Embriyonun implantasyonu endometriumdaki oksidatif stres nedeniyle olumsuz yönde etkilenebilmektedir [79]. Oksidatif stresin luteal regresyon yaparak yetersiz luteal hormon sentezine neden olarak gebeliğin devamı için gerekli desteğe engel olabileceği öne sürülmüştür [80]. Sonuç olarak endometriosis, PCOS, açıklanamayan infertilite, hidrosalfinks ve tekrarlayan gebelik kayıpları gibi infertilitenin diğeri birçok bilinen nedeninin de oksidatif stres ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür [81]. Folliküler sıvının da bu süreçte oositin ve sonrasında gelişecek embriyo kalitesini yansıtan oksidatif duruma ait bir takım belirteçleri içerebileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda OPU günü folliküler sıvı oksidatif stres belirteçlerinin düzeyleri ile elde edilen oositin ve sonrasında gelişen embriyonun kalitesi, fertilizasyon, klivaj oranları ve genel hasta popülasyonundaki gebelik başarısı arasındaki ilişkiyi incelerken aynı zamanda da hastanın yaşı ve her bir hastadan elde edilen toplam oosit sayısı ile oksidatif stres arasında bir ilişki olup olmadığını da değerlendirdik. Çalışmamızda genel hasta popülasyonu ile çalışma

grubunun matür oosit oranları açısından farklı olmasına rağmen gruplar fertilizasyon ve klivaj açısından farklı değildir. Çalışma grubunda matür oosit (MII) oranı genel hasta popülasyonuna göre anlamlı olarak daha yüksektir. Bu durum OPU sırasında çalışma grubu için yapılacak ilk ponksiyonun ultrason probuna en yakın, normal büyüklükteki ve normal görünümlü folliküllere yapılmasından ve bu folliküllerden diğer folliküllere göre oransal olarak daha fazla MII oosit elde edilmesinden kaynaklanmış olabilir. Çalışma grubunda fertilizasyon ve klivaj oranlarının benzer olması çalışma grubunun genel hasta popülasyonunu temsil ettiğini düşündürebilir.

Çalışmamızda ilk olarak oositlerin sitoplazmik ve nükleer maturasyonlarının oksidatif stres belirteç düzeyleri ile ilişkisini analiz ettik. Normal sitoplazmalı oositlerin folliküler sıvılarındaki MDA düzeyinin anormal sitoplazmalı oositlerin folliküler sıvılarındakine göre anlamlı oranda daha yüksek olduğunu gördük ($P=0,004$) (Tablo-VI). Oositlerin nükleer maturasyonlarına göre yapılan değerlendirmede ise MII (matür) ile diğer (MI, germinal vezikül ve atretik) oositlerin ait oldukları folliküler sıvılarındaki oksidatif stres belirteçleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo-VII). Normal sitoplazma oositlerin folliküler sıvılarında MDA'nın anlamlı olarak yüksek olması sitoplazma morfolojisi ile MDA'nın ilişkili olabileceği kanısını uyandırmıştır. Kaliteli oositten kaliteli embriyo gelişme oranı dolayısı ile gebelik şansı da yüksek olacağı için elde edilecek gebelik hızı ile MDA'nın ilişkili olabileceği düşünülebilir. **Pasqualotto ve ark** IVF uygulanan 41 hastadan aldıkları 115 follikül sıvısı ve oosit üzerinde yaptıkları bir çalışmada; folliküler sıvı lipit peroksidasyonunu gösteren MDA düzeyi ve total antioksidan kapasite ile oosit maturasyonu, fertilizasyon, klivaj ve embriyo kalitesi arasında bir korelasyon bulamamışlardır. Ancak gebelik hızı ile MDA ve total antioksidan kapasite arasında pozitif bir korelasyon tespit ederlerken, MDA'nın follikül içi metabolik aktivitenin iyi bir belirteci olabileceği ve bir miktarının gebeliğin oluşması için gerekli olduğu sonucuna varmışlardır [72]. Bizim çalışmamızda da gebelik ile MDA arasında pozitif korelasyon ortaya çıkmıştır. Öte yanda **Das ve ark** tubal infertilite nedeniyle ART uygulanan hastaların folliküler sıvı lipit peroksidasyonu ile oosit kalitesi arasında bir ilişki gösterememişlerdir. Ancak çalışmanın tartışmaya açık tarafı sadece en üst kalite ve kaliteli oositler değerlendirilmeye alınırken, kötü kalite oositler dâhil edilmemiştir. Çalışmada; araştırmacılar folliküler sıvıdaki ROS düzeyinin belli bir seviyeden sonra fertilizasyonu ve embriyo kalitesini olumsuz yönde etkilediğini ileri sürerlerken, folliküler sıvı reaktif oksijen türlerinin embriyo oluşumunda ve kalitesinde önemli bir rol oynayabileceği sonucuna

varmışlardır [82]. Ancak bu çalışmada gebelik hızları ile MDA arasındaki ilişki incelenmemiştir. Lipit peroksidasyon düzeyinin gebelik hızını olumsuz etkilediğini savunan yazarlar da vardır. **Oral ve ark** IVF uygulanan 45 hastada yaptıkları bir çalışmada gebelik hızı ile MDA düzeyinin ters korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir [83].

Çalışmamızın ikinci basamağında, elde edilen oositleri fertilize olup olmamalarına göre değerlendirdik. Fertilize olan grubun folliküler sıvılarında fertilize olmayan grubunkine göre nitrik oksit ve protein karbonil düzeyleri arasında anlamlı bir fark yok iken, fertilize olan oositlerin folliküler sıvılarında MDA düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($P=0,022$) (Tablo-VIII). Bu sonuçlar ışığında fertilize olan oositlerin folliküler sıvılarında artmış LPO seviyesinin iki açıklaması olabilir. Birincisi; lipit peroksidasyonuna sebep olan oksidatif stres, fertilizasyon için gereklidir ve follikül içerisindeki yapılar oksidatif stresi artırarak fertilizasyon kabiliyetini artırmaktadırlar. İkincisi; fertilize olma kapasitesi yüksek oositlerin fertilizasyon öncesinde, sırasında veya sonrasında gerekli hormonların, enzimlerin veya genlerin sentezlenmesi, salınması, tekrar kullanılması veya depolanması gibi ihtiyaçlarının artacağı açıktır. Bu durumun follikül içindeki enerji gereksinimini artırması kaçınılmazdır. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ana kaynağı olan mitokondrilerin artmış enerji ihtiyacına yönelik sayısının ve fonksiyonun artmasının ROS miktarının artışına sebep olacağı ve buna bağlı olarak da lipit peroksidasyonunu yani MDA'yı artırdığı düşünülebilir. Bu durumda artmış oksidatif stres, fertilizasyonun fizyolojik basamaklarında yer alan bir olay değil de, artmış fertilizasyon kabiliyetinin bir sonucu gibi değerlendirilebilir. Bu düşünceyle paralel olarak çalışmamızdaki normal sitoplazmik maturasyon gösteren oositlerin folliküler sıvılarında MDA'nın yüksek bulunmasını aynı mantıkla açıklayabiliriz. Ancak bizim görüşümüzü desteklemeyen veya tam tersini savunan çalışmalar da vardır. **Jozwik, Attaran ve Pasqualotto** yaptıkları çalışmalarda fertilizasyon ile folliküler sıvı lipit peroksidasyonu arasında bir korelasyon bulamamışlardır [18,19,72]. **Oyawoye, Paszkowski ve Das** ise çalışmalarında folliküler sıvıdaki yüksek ROS düzeyinin düşük fertilizasyon oranına neden olduğunu öne sürmüşlerdir [5, 12, 82]. Bütün bu çalışmalar incelendiğinde hasta gruplarının birbiri ile aynı olmadığı gibi bazılarının aralarında çok fark olduğu da görülmektedir. Bunun yanında kullandıkları yöntemler de birbirinden çok farklıdır. Bu nedenle elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde farklar olması kaçınılmazdır. Oosit maturasyonunun ve fertilizasyonun oksidatif stres ile ilişkisini değerlendirmek için homojen ve geniş hasta

gruplarında güvenilirliği kanıtlanmış aynı zamanda standart yöntemlerle yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda üçüncü basamakta yapılan genel değerlendirmede fertilizasyon sonrası erken klivaj ve klivaj olan ile olmayan, en üst kalite ve diğer alt kalite embriyo gelişen oositlerin ait oldukları folliküler sıvılarının, oksidatif stres belirteç düzeylerini karşılaştırdık. Yaptığımız analiz sonucunda MDA, NO ve protein karbonil ile klivaj (Tablo-IX), erken klivaj (Tablo-X) ve ikinci gün embriyo kaliteleri (Tablo-XI) arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Ancak üçüncü gün grade II, III ve IV embriyoların oluşturduğu alt kalite grupta, en üst kalite (grade I) embriyoların oluşturduğu gruba göre NO seviyelerinin anlamlı olarak yüksek ($P=0,006$), protein karbonil seviyelerinin anlamlı olarak düşük olduğunu tespit ettik ($P=0,045$). Malondialdehit düzeyleri arasında ise bir fark bulunmadı (Tablo-XII). İyi kalitedeki embriyoların gebelik hızını artıracak için embriyo gelişimine etki eden faktörler IVF uygulamasında son derece önemlidir. Oksidatif stresin, birçok mekanizmanın rol aldığı bir süreçte embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu öne süren çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda oksidatif stresin, mitokondrial değişiklikler [84], artmış lipit peroksidasyonu ile blastomer bölünmesinde duraksama [85,86] ve adenosin trifosfat düzeyinde azalma yaparak [87], aynı zamanda apoptoza yol açarak [88,89] embriyo gelişimine olumsuz etkilerde bulunduğu öne sürülmüştür. Oosit sperm ile fertilize olduktan sonra üçüncü bölünmeye kadar yaklaşık 48 saat boyunca maternal mRNA etkisi ile protein sentezi gerçekleşmektedir. Bundan sonraki aşamalar embriyonik genom aktivasyonu ile olmaktadır [29]. Bu nedenle follikül içerisindeki oksidatif stres durumunun ve hangi mekanizmanın gelişecek embriyoyu nasıl ve ne yönde etkileyeceği çok karmaşık bir olaydır. Yine de follikül sıvısından elde edilecek oksidatif stres belirteçleri ile ilgili bilgi oositin bölünmesi, gelişecek embriyonun kalitesi ve gebelik hızı hakkında bize önceden ipucu verebilir. Bu konuda karşıt görüşleri savunan çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda ortaya çıkan lipit peroksidasyonunun klivaj ve ikinci gün embriyo kalitesi ile anlamlı bir ilişkisinin olmadığı sonucumuzu destekleyen **Pasqualotto ve ark**, LPO ile klivaj ve embriyo kalitesi arasında bir korelasyon bulamamışlardır [72]. **Attaran ve ark** çalışmalarında folliküler sıvı ROS seviyelerinin gebelik elde edilen oositlerin follikül sıvılarında daha yüksek olduğunu bulmuşlardır ve folliküler sıvı ROS düzeylerinin özellikle düşük konsantrasyonda olduğu durumlarda IVF başarısını tahmin etmede kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir [19]. **Wiener-Megnazi ve ark** gebelik oluşması için folliküler sıvı oksidatif stresin belli eşik değerleri

arasında olması gerektiğini öne sürmüşlerdir [7]. **Jozwik ve ark** ise folliküler sıvıdaki oksidatif stres belirteçlerinin düzeylerinin IVF uygulanan kadınların gebelik sonuçları ile korelasyon göstermediğini öne sürmüşlerdir [18].

Oksidatif stresin bir diğer mekanizması da protein oksidasyonudur. Proteinlerin ROS'un ilk ve ana hedefi olduğu ve biyolojik sistemde ROS'un öncelikle protein oksidasyonuna yol açarak protein karbonil oluşumuna neden olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir [62–64]. Fakat IVF sikluslarında folliküler sıvı protein karbonil düzeyi ve IVF sonuç parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma yoktur. Çalışmamızda fertilizasyon sonrası üçüncü günde en üst kalitede embriyo elde edilen oositlerin ait oldukları follikül sıvılarındaki protein karbonil düzeylerinin diğer alt kalitede embriyo elde edilenlere göre anlamlı derecede yüksek protein karbonil içerdiğini tespit ettik ($P=0,045$) (Tablo-XII). Bu sonuç, daha önce elde ettiğimiz; normal sitoplazmalı veya fertilize olan oositlerin follikül sıvılarında oksidatif stres belirteç düzeylerinin yüksek olması sonucunu destekler niteliktedir. Bu durum yukarıda öne sürdüğümüz gibi en üst kalite embriyo gelişecek oositin ait olduğu folliküler sıvıdaki artmış metabolik aktiviteden ya da iyi kalite embriyo gelişimi için follikül içerisinde protein oksidasyonunun gerekli olmasından kaynaklanıyor olabilir. Sonuç olarak iyi kalite embriyo demek artmış gebelik şansı demek olduğu için IVF/ICSI-ET uygulamalarında protein karbonil gelişecek embriyolar için kullanışlı bir belirteç olabilir.

Aerobik organizmalarda metabolik sürecin bir ürünü olarak ROS yanında reaktif nitrojen türleri de üretilmektedir. Antioksidan sistem organizmayı ROS'da olduğu gibi RNS'e karşı da savunmaktadır [67]. Reaktif nitrojen türlerinden üreme sisteminde birçok mekanizmada rol alan nitrik oksittir. Folliküler sıvı; folliküler büyümeyi, maturasyonu, ovulasyonu ve follikül atrezisini etkileyen sitokinler ve büyüme faktörleri gibi birçok maddeyi içerir. Yakın geçmişte yapılan çalışmalar, folliküler sıvıda önemli miktarda NO bulunduğunu [88] ve bunun da büyük kısmının granuloza hücrelerinden sentezlendiğini göstermiştir [89]. Bu durumda NO'in ovaryan kan akımı, follikül büyümesi, follikül maturasyonu, steroid hormon sentezi veya ovulasyonda etkili olduğu düşünülebilir. Bizim çalışmamızda, üçüncü gün en üst kalite embriyo gelişen oositlerin folliküler sıvılarında NO düzeylerini anlamlı olarak düşük bulduk ($P=0,006$) (Tablo-XII). Yaptığımız analizde folliküler sıvı NO konsantrasyonu ile embriyo kalitesinin negatif korelasyon gösterdiğini tespit ettik ($r= -0,273$; $P=0.006$). Nitrik oksit ve IVF sonuç parametreleri ile ilgili literatürde bulunan çoğu çalışmada da bizim sonuçlarımızı destekleyen sonuçlara ulaşılmıştır. **Barosso**

ve ark IVF-ET uygulanan 16 hastadan elde ettikleri 55 oositi, fertilizasyon, klivaj ve üçüncü gün embriyo morfolojisi açısından değerlendirmişler ve folliküler sıvı NO konsantrasyonunun embriyo kalitesiyle negatif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir [90]. **Battaglia ve ark** ise NO'nun sentezinde nitrik oksit sentetazın kullandığı ana substrat olan L-arginin amino asidi desteği verdikleri 16 hasta ile plasebo verdikleri 16 hastanın embriyo kalitelerini karşılaştırmışlar ve aynen bizim sonuçlarımız gibi folliküler sıvı NO konsantrasyonu ile embriyo kalitesinin ters korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır ($r = -0,609$; $P = 0.021$). L-arginin desteğinden dolayı artmış NO konsantrasyonunun embriyo kalitesi ve gebelik hızı üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği sonucuna varmışlardır [91]. **Bedaiwy ve ark** folliküler sıvı NO konsantrasyonunun embriyo kalitesi ve klivaj hızı ile negatif korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir [92]. **Vignini ve ark** 15 IVF-ET hastasından 53 follikül aspire edip, elde edilen oositlerden gelişen embriyoların kaliteleri ile ait oldukları folliküllerin NO konsantrasyonlarını analiz ettikleri çalışmalarında; folliküler sıvı NO ile embriyo dereceleri arasında direkt korelasyon tespit etmişlerdir ($r = 0,61$; $P < 0.001$). Sonuç olarak folliküldeki yüksek seviyedeki NO'nun oluşacak embriyo kalitesini olumsuz yönde etkilediğini öne sürmüşlerdir [93]. Öte yandan **Manau ve ark** NO ile embriyo kalitesi arasında bir korelasyon bulamamışlardır [94].

Çalışmamızda hasta yaşı ile folliküler sıvı oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi de araştırdık. Hasta yaşı ile lipit peroksidasyonunun yani MDA düzeyinin zayıfta olsa negatif korelasyon gösterdiğini tespit ettik ($r = -0,133$ $P = 0,049$). Hasta yaşının 35 ve üzerine çıktığında follikül sıvısı LPO düzeyinin anlamlı olarak azaldığını tespit ettik (Tablo-XIII). Çalışmada korelasyonun zayıf çıkması hasta gruplarının çok heterojen olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle homojen ve fazla sayıda örnek içeren bir popülasyon üzerinde yapılacak benzer bir analiz daha sağlıklı sonuçlar verebilir. Yaptığımız İngilizce literatür araştırmasında bu konuyla ilgili sadece bir çalışmaya ulaşabildik. Bu çalışmada **Wiener-Megnazi ve ark** hasta yaşı ile serbest oksijen radikal aktivitesi arasında negatif korelasyonu göstermişlerdir [7]. Yaş artışı ile beraber folliküler metabolizmanın yavaşlamasının lipit peroksidasyonunun azalmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Azalmış LPO fertilizasyon ve gebelik başarısını tahmin etmede kullanılabilir bir belirteç olabilir.

Foliküler sıvılar, PCOS'lu hastalardan elde edilenler, PCOS olmayan ancak overleri polikistik görünümde (PCO) olanlar ve diğerleri olmak üzere üç gruba ayrılıp analiz edildiğinde folliküler sıvı MDA ve NO düzeylerinin anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi (Tablo-XIV-a). Yapılan varyans analizinde PCOS grubundaki MDA düzeylerinin ikinci ve üçüncü gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. İkinci ve üçüncü gruplar arasında ise fark olmadığı tespit edildi. Nitrik oksit düzeyi de PCO'lu (Grup 2) hastalarda üçüncü gruba göre anlamlı olarak yüksekti. Ancak PCO ile PCOS grubu karşılaştırıldığında NO düzeyinin PCOS grubuna göre PCO grubunda yüksek olduğu ancak bu yüksekliğin anlamlı olmadığı tespit edildi. Polikistik over sendromunda folliküller sıvı oksidatif stres durumu henüz açıklığa kavuşmuş bir olay değildir ve üzerinde neredeyse yok denecek kadar az çalışma vardır. Yaptığımız İngilizce literatür taramasında bu konu ile ilgili sadece bir çalışmaya ulaşabildik. **Yıldırım ve ark** yaptıkları çalışmada IVF-ET uygulanan PCOS'lu hastaların preovulatar follikül sıvılarında lipit peroksidasyonunu araştırmışlar ve PCOS'lu hastalarda preovulatar follikül sıvılarında MDA düzeyinin erkek faktör nedeniyle IVF-ET uygulanan kontrol grubu hastalarinkine göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Çalışmada plazma LH/FSH ve progesteron düzeylerinin folliküler sıvı MDA seviyesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak PCOS'lu hastaların overlerindeki lipit peroksidasyonun muhtemelen yetersiz progesteron sentezi ve yüksek plazma LH/FSH seviyeleri ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir [95]. Başka bir çalışmada **Sabuncu ve ark** PCOS'lu hastaların eritrositlerinde oksidatif stres belirteçlerini araştırmışlar ve MDA seviyesinin PCOS'lu hastalarda anlamlı olarak yüksek, önemli antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin anlamlı olarak yüksek, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin anlamlı olarak düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu hastalarda aynı zamanda MDA seviyesi ile insülin sensitivitesi arasında da anlamlı bir negatif korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir [96]. Çalışmamızda PCOS ve PCO grupları arasında, oksidatif stres belirteç düzeylerini etkileyen yaş, toplanan total oosit sayısı, fertilizasyon ve gebelik parametreleri açısından fark olmaması, bize PCOS'daki lipit peroksidasyon yüksekliğinin hastalığın kendine özgü patofizyolojisinden kaynaklanabileceğini düşündürdü (Tablo-XIV-b). Bu nedenle yanlış sonuçlara ve yorumlara neden olmamak için bazı analizlerde PCOS grubu değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Çalışmamızda PCOS grubunu ayrı tutarak kontrollü ovaryan hiperstimulasyona verilen yanıtlar ile oksidatif stres belirteçlerinin ilişkisini de inceledik. Elde edilen oosit sayıları Tablo XV' de belirtilen sınır değerlere göre gruplandırıldığında, gruplar arasında MDA (P=0,003) ve NO (P=0.021) açısından anlamlı fark olduğunu tespit ettik. Yapılan varyans analizinde ise kötü cevap veren ile (oosit sayısı 1–5, Grup 1) aşırı cevap veren gruplar arasında (oosit sayısı 21 ve üzeri, Grup 5) MDA düzeyinin farklı olmadığı ancak her iki grupta da normal cevap veren gruplara göre (oosit sayısı 6–10, 11–15, 16–20, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4) MDA düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğunu ve normal cevap veren gruplar arasında ise fark olmadığını tespit etmiştik. Nitrik oksit için yapılan analizde ise kötü ve aşırı cevap veren gruplarda NO düzeyinin normal cevap verenlere göre anlamlı olarak yüksek, kendi aralarında ise farklı olmadığı bulunmuştu. Buna göre kötü cevap veren grup ile aşırı cevap veren grupların normal cevap veren gruplara göre lipid peroksidasyonu ve NO açılardan farklı davrandıkları kanısını uyandırdı. Kötü cevap veren grupta lipid peroksidasyonun düşük olması overin oksidatif metabolizma ile enerji üretim kapasitesinin muhtemelen düşük olmasından kaynaklanabilir. Bu hastalarda NO seviyesinin yüksek olması ise ovaryan hiperstimulasyon uygulandığında zaten sınırlı olan oksidatif metabolizmaya oksijen temin etmek amacıyla overin NO artışı ile kanlanmasını artırma çabasından olabilir. Aşırı cevap veren hastalarda ise artan follikül sayısı ile overin enerji ihtiyacının artacağı açıktır. Bu durum, elde edilen oosit sayısı arttıkça overde oksijen ihtiyacının artmasına ve vücudun bu ihtiyacı karşılamakta zorlanması sonucu overin oksidatif enerji metabolizmasına alternatif olan ve oksijen gerektirmeyen enerji sağlama yollarına yönelme isteğinden kaynaklanıyor olabilir. Bu sayede oksidatif metabolizma azaldıkça lipid peroksidasyonunun da azaldığı düşünülebilir. Bu hastalardaki NO artışı ise artmış oksijen ihtiyacını karşılamaya yönelik overin kanlanmasını artırma çabalarından olabilir. Bu nedenle induksiyon rejimleri aşırı cevaba sebep olup over metabolizmasındaki dengeyi değiştirerek, gelişecek oositlerin fertilizasyonu ve ardından embrioyu olumsuz yönde etkilememesi için dikkatli bir şekilde modifiye edilmelidirler.

Polikistik over sendromlu hastalardan alınan folliküler sıvılar değerlendirme dışı bırakılıp, fertilize olan ve olmayan oositlerin ait oldukları folliküler sıvılarının oksidatif stres belirteç düzeyleri analiz edildiğinde aynen PCOS dahil grupta olduğu gibi fertilize olan grupta MDA düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu (P=0.027) (Tablo XVI). Fertilizasyon ile

MDA yüksekliği arasındaki bu ilişkinin yukarıda değindiğimiz gibi artmış fertilizasyon kabiliyetinin bir sonucu olarak artmış metabolik hızdan kaynaklandığı düşünülebilir. Lipit peroksidasyon düzeyinin fertilizasyonu tahmin etmedeki etkinliğini değerlendirmeye yönelik olarak (Şekil–XIII) 4,39 $\mu\text{mol/L}$ cut-off değeri alındığında MDA'nın duyarlılığı düşük olmasına rağmen PPD yüksektir. Buna göre OPU sırasında fertilizasyonu tahmin etmede sensitivitesi düşükte olsa kullanılabilir. Çalışmamızda hasta gruplarının heterojen olması MDA'nın duyarlılığındaki yetersizliğin sebebi olabilir. Bu nedenle geniş homojen hasta gruplarında yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Polikistik over sendromlu hastaları ayrı tutup üçüncü gün embriyo morfolojisine göre yaptığımız bir diğer değerlendirmede ise alt kalite embriyo grubunda folliküler sıvı NO düzeyleri anlamlı oranda yüksek iken ($P=0,039$), protein karbonil düzeyleri alt kalite embriyo grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($P=0,032$), malondialdehit düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo-XVII). Bu durumda NO düzeyindeki artışın embriyo morfolojisini olumsuz yönde etkilediğini söyleyebiliriz. Üreme fizyolojisinde değişik fonksiyonları olduğu düşünülen NO düzeylerinin gelişecek embriyo kalitesini olumsuz etkileyecek patolojik seviyelere ulaşmasına ne sebep olmaktadır? Nitrik oksidin follikülogenezde büyüme ve proliferasyon üzerinde promitojenik ve antimitojenik etkilerinin yanında, anjiyogenetik ve vazodilatör etkilerinin de olduğu gösterilmiştir [43, 97–99]. Bazı yazarlar NO'in hipoksi belirteci olduğunu savunmaktadırlar [43, 92, 97]. Bu nedenle overde hipoksiye neden olacak vazooklüzyon ve diğer bazı damarsal olaylar veya overin aşırı büyümesine neden olan follikül hacimlerinin ve sayısının artışına bağlı artmış kanlanma ihtiyacı göreceli hipoksi yaparak NO sentezinin aşırı artmasına neden olabilir. Bu nedenle IVF uygulamalarında patolojik seviyede NO artışına neden olan overin aşırı büyümesini engellemeye yönelik olarak sadece PCOS veya PCO'lu hastalarda değil bütün IVF/ICSI uygulanacak hastalarda kontrollü over stimülasyon yaparken aşırı cevaptan kaçınmak yararlı olacaktır. Bu amaçla tedavi rejimlerinin modifiye edilmesi uygun durmaktadır. **Lubna ve ark** yaptıkları retrospektif bir çalışmada agresif kontrollü ovaryan hiperstimülasyon uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı derecede siklus iptalini engellediğini, ancak gonadotropinlerin aşırı kullanımının klinik gebelik ve canlı doğum olasılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığını ve spontan abortus olasılığını artırdığını göstermişlerdir [100]. Bütün bu bulgular ışında NO'in üreme fizyolojisi üzerine olan etkileri akılda tutulmalıdır.

Mesela in vitro fertilizasyon uygulaması yapılırken hastada bulunan vazooklüzif veya diğer bazı damarsal bozukluklardan dolayı nitrat kullanımını varsa NO'in IVF parametreleri üzerine olan olumsuz etkileri olabileceği göz ardı edilmemelidir. Oosit toplama işleminin zamanlaması, folliküllerin aşırı büyüyerek kısmi hipoksiye girip, NO sentezinde artışa ve durumun oosite ve sonrasında gelişecek embriyoya zarar vermesini, bu sayede de gebelik hızını olumsuz yönde etkilemesini önlemek için iyi planlanmalıdır. Nitrik oksit ve protein karbonilin üçüncü gün embriyo kalitesini tahmin etmedeki etkinliğini değerlendirdiğimiz analizde OPU günü NO'in 43,06 nmol NO/mgprotein cut-off değerinde kötü kalite embriyoyu Protein karbonil için ise 13,75 nmol/ml cut-off değerinde iyi kalite embriyoyu tahmin etmede kullanılabilir (Şekil-XIV). Aynen MDA içinde düşündüğümüz gibi bu belirteçlerin klinikte kullanım alanı bulması için homojen geniş hasta gruplarında yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda genel hasta popülasyonunda gebelik gerçekleşen hastaların ortalama folliküler sıvı MDA düzeyleri gebelik gerçekleşmeyen hastalarinkine göre anlamlı olarak yüksekti. Ancak biz çalışmamızda folliküllerden elde edilen oositleri ayrı ayrı değerlendirip takip ettiğimiz fakat embriyo transfer aşamasından sonra hangi embriyodan gebelik oluştuğunun tespit edilememesinden dolayı, MDA için gebelik belirlemede bir cut-off değer ve buna ait sensitivite ve spesifite hesaplaması yapamadık. Buna rağmen çalışma grubunun genel hasta popülasyonunu temsil ettiği düşüncesinden yola çıkarak folliküler sıvı lipit peroksidasyon düzeyi gebelik oluşumu tahmin etmede önemli bir belirteç olarak kullanılabilir. Lipit peroksidasyon düzeyinin gebelik oluşumunu tahmin etmedeki duyarlılık ve seçiciliğini belirlemek için hastalardan elde edilen oositler ve follikül sıvıları toplu halde analiz edilmelidir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma grubu ile genel hasta popülasyonunun fertilizasyon ve Klivaj oranları benzerdir. Bu durumda follikül sıvıları çalışmaya alınan oositlerin genel popülasyonu da temsil ettiği şeklinde yorumlandı. Oksidatif stresin kadın üreme fizyolojisinde değişik basmalarda önemli etkileri vardır. Oositin sitoplazmik maturasyonu ve fertilizasyonu folliküler lipit peroksidasyonu ile ilişkili görünmektedir. Oositin nükleer maturasyonu ile folliküler sıvı

oksidatif stres belirteçleri arasında direkt ilişki tespit edilememiştir. Erken veya fertilizasyon sonrası 24 saatten sonra bölünmeye başlayan ve bölünmeye başlamayan embriyoların ait olduğu folliküller sıvılarındaki oksidatif stres belirteçleri ile aralarında belki de grupların birbirine denk olmamasından kaynaklandığı için anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Hasta yaşının artışı ile beraber lipit peroksidasyonu azalmaktadır. Bu durum yaşlanmaya bağlı metabolik aktivitenin azalmasından kaynaklanıyor olabilir. Üçüncü gün embriyo kalitesi ile protein karbonil düzeyi pozitif korelasyon gösterirken NO ters korelasyon göstermektedir. Polikistik over sendromunda kendine özgü patofizyolojisinden kaynaklanan nedenlerle folliküler sıvı lipit peroksidasyonunda artış olduğu düşünülebilir. İn vitro fertilizasyon uygulamasında kontrollü over hiperstimulasyonuna kötü ve aşırı cevap veren hastalarda lipit peroksidasyonu normal cevap verenlere göre anlamlı olarak düşük ve nitrik oksit düzeyleri ise kötü ve aşırı cevap verenlerde normal cevap verenlere göre anlamlı olarak yüksektir. Hastalara kontrollü ovaryan hiperstimulasyon uygulanırken kötü ve aşırı cevaptan kaçınmak ve bu sayede oosit kalitesini, fertilizasyonu, embriyo kalitesini ve gebelik oranlarını olumsuz etkilememek için indüksiyon rejimleri hastaya göre modifiye edilmeli ve OPU zamanlamasına dikkat edilmelidir. Polikistik over sendromu dışlandığında da fertilize olan oositlerin folliküler sıvılarında MDA düzeyleri fertilize olmayanlarınkine göre anlamlı olarak yüksektir. Yine PCOS dışlandığında üçüncü günde embriyo kötü kalite embriyoların folliküler sıvılarında NO düzeyleri yüksekken protein karbonil düzeyleri düşüktür. Gebelik elde edilen hastaların folliküler sıvı ortalama MDA düzeyleri anlamlı olarak yüksektir. Yardımcı üreme teknikleri uygulanacak hastalarda antioksidan özellik içeren madde veya ilaç kullanımında ART sonuçlarını etkileyebilme ihtimali açısından dikkatli olunmalıdır. Yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında OPU günü folliküler sıvı MDA, NO ve protein karbonil IVF kliniklerinde sonuç parametrelerini öngörmek açısından faydalı belirteçler olarak kullanılabilirler. Oksidatif stres ile over fizyolojisinin ilişkisini değerlendirmek için homojen ve geniş hasta gruplarında güvenilirliği kanıtlanmış aynı zamanda standart yöntemlerle yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

9.KAYNAKLAR

- 1:** Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2005. *MMWR Surveill Summ.* 2008;57:1-23.
- 2:**Wright VC, Schieve LA, Reynolds MA, Jeng G; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2002. *MMWR Surveill Summ.* 2005;54:1-24.
- 3:**Sikka SC; Andrology lab corner-role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004;25:5-18.
- 4:**Aitken RJ; The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;115:1-7.
- 5:**Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N ve ark; Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003;18;2270-2274.
- 6:**Guerin, P, El Mouatassim, S. and Menezo, Y.Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update*,2001;7;175-189.
- 7:**Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S ve ark; Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82,1171-1176.
- 8:**Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R.Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction:from molecular mechanisms to health implications.*Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1375-403.
- 9:** Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H, Steegers, E.A. Glutathione and glutathione related enzymes in reproduction: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1999;82;171-184.
- 10:** Ho, J.S., Gargano, M., Cao, J., Bronson, R.T. ve ark. Reduced fertility in female mice lacking copper±zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 1998;273;7765-7769.
- 11:**Matzuk, M.M., Dionne, L., Guo, Q., Kumar, T.R. ve ark.Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology*, 1998;139; 4008-4011.
- 12:**Paszkowski, T., Traub, A.I., Robinson, S.Y., McMaster, D.Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta*, 1995;236;173-180.

- 13:**Paszkowski, T. and Clarke, R.N. Antioxidant capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Hum. Reprod.* 1996;11;2493-2495.
- 14:**Agarwal A, Gupta S and Sharma RK; Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. *Reprod Biomed Online* 2005;11;641–650.
- 15:**Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S.Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos *Hum. Reprod.*, 1998;13;998-1002.
- 16:**Endo, T., Aten, R.F., Leykin, L. ve ark. Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993;76;337–342.
- 17:**Shimamura, K., Sugino, N., Yoshida, Y. ve ark; Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *J. Reprod. Fertil.* 1995;105;253–257
- 18:**Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M and Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 1999;5;409–413.
- 19:**Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM ve ark; The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2000;45;314–320.
- 20:**Devrim Kara H, Klasik İn Vitro Fertilizasyon. Delilbaşı L. editör. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni Uygulamalar Ve Güncel Yaklaşımlar) 1. baskı. 2008;s: 127–142
- 21:** De Kretzer D, Dennis P, Hudson B, Wood C. Transfer of a human zygote.*Lancet.* 1973;2.728–9.
- 22:** Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet.* 1976;1:880–2.
- 23:** Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978;2:366.
- 24:**Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;4:17–8.
- 25:**Karabulut O, Delilbaşı L: Oogenezis, Oosit Toplama (OPU) Prosedürü, Oosit Morfolojisi ve İn Vitro Matürasyon (IVM); Delilbaşı L. editör. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni Uygulamalar Ve Güncel Yaklaşımlar),1.baskı.2008;s:85–116
- 26:**Smith GD. In vitro maturation of oocytes. *Curr Womens Health Rep.* 2001;2:143–51.

- 27:**Swain EJ, Smith; Mechanism of oocyte maturation . In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM editors. In-Vitro Maturation of Human Oocytes, Basic Science to Clinical Application, 1st ed. Montreal, Informa Health Care press. 2007; p: 83–101
- 28:**Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.* 1994;164:1–9.
- 29:** Özcan C. Embriyoner Gelişim. Delilbaşı L. editör. *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni Uygulamalar Ve Güncel Yaklaşımlar)*, 1. baskı. 2008; s:117–125
- 30:** Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:93–8.
- 31:**Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod.* 1995;10:2427–31.
- 32:**Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999;2:429–47.
- 33:** Haris SE, Picton HM. Metabolism of follicles and oocytes during growth and maturation. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM editors. *In-Vitro Maturation of Human Oocytes, Basic Science to Clinical Application*, 1st ed. Montreal, Informa Health Care press. 2007; p:15–36
- 34:**Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:463–71.
- 35:**Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G et al. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet.* 1987;12:81–90.
- 36:**Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 2001;16:909–17.
- 37:** Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1995;10:415–24.
- 38:** Tarín JJ, Pérez-Albalá S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev.* 2002;61:385–97.
- 39:** Jansen RP. Germline passage of mitochondria: quantitative considerations and possible embryological sequelae. *Hum Reprod.* 2000;15:112–28.
- 40:**Halliwell B, Gutteridge JMC editors. *Free radicals in biology and medicine.* 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1999. p. 246–350

- 41:**Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;14:3–28.
- 42:**Dong M, Shi Y, Cheng Q, Hao M. Increased nitric oxide in peritoneal fluid from women with idiopathic infertility and endometriosis. *J Reprod Med.* 2001;46:887–91.
- 43:**Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* 1998;4:3–24.
- 44 :**Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:126–34.
- 45:**Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit.* 2001;7:801-19
- 46:**Anteby EY, Hurwitz A, Korach O, Revel A ve ark. Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. *Hum Reprod* 1999;11:1947–1951
- 47:** Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1994;135:1799–1806
- 48:**Baker MA, Aitken RJ.The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology.*Mol Cell Endocrinol.* 2004;15:47–54.
- 49:**Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H. and Steegers, E.A.Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1999;82: 171–184.
- 50:**Esterbauer, H.Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyde and Related Aldehydes, *Free Rad. Biol. Med.*1991;11:81–128.
- 51:**De Maria, N. et. al., Association Between Reactive Oxygen species and Disease Activity in chronic Hepatitis C, *Free Radicals Biol. Med.* 1996; 21; 291–295.
- 52:**Browne, S.E. Oxidative Stress in Huntington’s Disease, *Brain Pathol.* 1999;9:147- 163.
- 53:**Vento, R. Induction of Apoptosis by Arachidonic Acid in Human Retinoblastoma Y79 Cells: Involvement of Oxidative Stress, *Exp. Eye Res.* 2000;70:503–517.
- 54:**Valerio, L.G. and Petersen, D.R.Formation of Liver Microsomal MDA-Protein Adducts in Mice with Chronic Dietary Iron Overload, *Toxicol. Lett.* 1998; 98:31–39.
- 55:**Beppu, M.Interaction of Malondialdehyde-Modified Bovine Serum Albumin and Mouse Peritoneal-Macrophages, *Chem. Pharm. Bull.* 1988; 36; 4519–4526.
- 56:**Marnett, L.J.Lipid Peroxidation-DNA Damage by Malondialdehyde, *Mutat. Res.* 1999;424;83–95

- 57:**Mao, H.Solution and Structure of an Ologonucleotide Containing the Malondialdehyde Deoxyguanosine Adduct N2-(3-oxo-1-propenyl)-dG (ring-opened M1G) Positioned in a (CpG)₃ Frameshift Hotspot of the Salmonella typhimurium hisD3052 Gene, *Biochemistry*.1999; 38:13491-13501.
- 58:**Marnett L. J. Chemistry and Biology of DNA Damage by Malondialdehyde, *IARC Sci. Publ.* 1999;150 17–27.
- 59:**Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006;10:389–406.
- 60:**Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;15:20313–6.
- 61:**Levine RL.Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;1:790–6.
- 62:**Gieseg S, Duggan S, Gebicki JM. Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochem J.* 2000;15:215-8.
- 63:**Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208.
- 64:**Du J, Gebicki JM. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:2334–43
- 65:**Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000;32:307–26. .
- 66:**Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ et al. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1080-6
- 67:**Halliwell B, Gutteridge JMC editors. *Free radicals in biology and medicine.* 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1999. p. 36-104
- 68:**Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* 1992;145:201-27.
- 69:**Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6: 3051–64.
- 70:** Van Steirteghem A, Liu J, Nagy Z, Joris H et al. Use of assisted fertilization. *Hum Reprod.* 1993;11:1784–5.
- 71:**Veeck LL. Preembryo grading. *Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus.* Baltimore: Wiliams and Wilkins. 1991;2:121–149

- 72:** Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, and Rose BI. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 2004;81:973–976
- 73:** Paszkowski T, Clarke RN, and Hornstein MD. Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum Reprod* 2002;17:921–925,
- 74:** Tamate K, Sengoku K, Ishikawa M. The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynaecol.* 1995;21:401–9
- 75:** Sugino N, Takiguchi S, Ono M, Tamura H ve ark. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum Reprod.* 1996;11:2484–7
- 76:** Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T. ve ark. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1999 ;72:1027-34.
- 77:** Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M ve ark. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. *Obstet Gynecol.* 2005;105:653–60.
- 78:** Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM ve ark. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril.* 2002;78:1272–7.
- 79:** Iborra A, Palacio JR, Martinez P. Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman. *Chem Immunol Allergy.* 2005;88:150–62
- 80:** Agarwal A and Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2004;9:338–347,.
- 81:** Agarwal A, Gupta S, and Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:325–332
- 82:** Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S ve ark. Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod.* 2006 ;21:2403-7.
- 83:** Oral O, Kutlu T, Aksoy E, Fiçicioğlu C ve ark. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. *Assist Reprod Genet.* 2006;23:81–5.
- 84:** Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999;26:463–71.
- 85:** Nasr-Esfahani MH, Aitken RJ, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development* 1990;109: 501–7.

86:Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, ve ark. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 1991;28:356–60.

87:Hyslop PA, Hinshaw DB, Hasley WA Jr, Schraufstatter IU. ve ark: Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988;263:1665–75.

88: Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 1991;46:181– 6.

89: Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998;13:998 –1002.

90:Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L ve ark. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril.* 1999;72:1024–6.

91:Battaglia C, Regnani G, Marsella T, Facchinetti F ve ark.Adjuvant L-arginine treatment in controlled ovarian hyperstimulation: a double-blind, randomized study. *Hum Reprod.* 2002 ;17:659-65.

92:Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA ve ark. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril.* 2004;82:593–600

93:Vignini A, Turi A, Giannubilo SR, Pescosolido D ve ark. Follicular fluid nitric oxide (NO) concentrations in stimulated cycles: the relationship to embryo grading. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277:229–32.

94:Manau D, Balasch J, Jiménez W, Fábregues F ve ark. Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response. *Hum Reprod.* 2000;15:1295–9.

95:Yildirim B, Demir S, Temur I, Erdemir R ve ark. Lipid peroxidation in follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome during assisted reproduction cycles. *J Reprod Med.* 2007;52:722–6

96: Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2001;34:407–13.

97: Koos RD. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biol Reprod.* 1995;52:1426–35.

98: Powers RW, Chen L, Russell PT, Larsen WJ Gonadotropin-stimulated regulation of blood-follicle barrier is mediated by nitric oxide. *Am J Physiol.* 1995;269:290–8

99: Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:74–84.

100: Pal L, Jindal S, Witt BR, Santoro N. Less is more: increased gonadotropin use for ovarian stimulation adversely influences clinical pregnancy and live birth after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008;6:1694–701.