

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ART (YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ) SIKLUSLARINDA
AGONİST –ANTAGONİST TEDAVİ MODALİTELERİNİN
FOLLİKÜL SIVISI SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE
KALSİYUM ÜZERİNE ETKİLERİ İLE BUNUN OOSİT
KALİTESİ VE SONUÇLARA ETKİSİ**

Dr. Melek CANBABA

UZMANLIK TEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Gökhan BAYHAN

ISPARTA - 2011

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ART (YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ) SIKLUSLARINDA
AGONİST –ANTAGONİST TEDAVİ MODALİTELERİNİN
FOLLİKÜL SIVISI SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE
KALSİYUM ÜZERİNE ETKİLERİ İLE BUNUN OOSİT
KALİTESİ VE SONUÇLARA ETKİSİ**

Dr. Melek CANBABA

UZMANLIK TEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Gökhan BAYHAN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 1959 -TU- 09 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2011

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince verdiği yakın destek ve değerli katkılarından dolayı tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Gökhan BAYHAN ve bölüm başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Muhittin Tamer MUNGAN, tez hazırlamamda bana yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Hilmi Baha ORAL başta olmak üzere, tüm hocalarıma, birlikte çalıştığımız tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, başta Embriyolog Hilal AYDINCAK ALTAN ve hemşire Nilüfer EREM olmak üzere tüm İVF ünitesi çalışanlarına ve personeline saygı ile teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışması sırasında gösterdikleri yakın ilgi ve desteklerinden dolayı tüm Biyokimya A.D. çalışanlarına, özellikle Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ hocama saygıyla teşekkür ederim.

Çalışma süresince verdikleri destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve çalışanlarına saygıyla teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlama dönemimdeki tüm sıkıntı ve mutlulukları benimle paylaşan değerli eşim Cankut'a, bana her zaman anlayış gösteren çocuklarım Zeynel Umut ve Güney'e sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimle...

Dr. Melek CANBABA
ISPARTA - 2011

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite Nedenleri.....	3
2.1.1. Oosit üretimindeki Anormallikler	3
2.1.2. Tubal Faktör	5
2.1.3. Uterin Faktörler	6
2.1.4. İmmunolojik Faktörler	6
2.1.5. Erkeğe Bağlı Faktörler	6
2.2. Ovaryan Fizyoloji ve Follikülojeniz.....	7
2.2.1. Ovulasyon	8
2.3. Oosit Kalitesinin Değerlendirilmesi	9
2.4. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi	9
2.5. Yardımcı Üreme Teknikleri	10
2.5.1. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Tedavi Aşamaları	11
2.5.1.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon.....	11
2.5.1.1.1. GnRH Agonistleri.....	11
2.5.1.1.2. Agonist Tedavi Protokolleri	12
2.5.1.2. GnRH Antagonistleri	13
2.6. Luteal Faz Desteği	15
2.7. Monitorizasyon.....	16
2.8. Oosit Toplanması.....	16
2.9. Gamet Hazırlanması ve Kültürü	17
2.10. Embriyo Transferi.....	17
2.11. Serbest Radikaller	17
2.11.1. Süperoksit Radikali (O ₂ ·-)	18
2.11.2. Hidrojen Peroksit	18
2.11.3. Hidroksil Radikali.....	19

2.11.4. Singlet Oksijen	19
2.12. Organizmada Serbest Radikal Reaksiyonlarını Artıran Faktörler	19
2.13. Serbest Radikallerin Etkileri.....	20
2.13.1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri	20
2.13.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	21
2.13.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	22
2.13.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	22
2.14. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	22
2.14.1. Endojen Antioksidanlar.....	22
2.14.1.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	23
2.14.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	23
2.14.1.1.2. Glutasyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)	23
2.14.1.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	23
2.14.1.1.4. Katalaz	24
2.14.1.2. Enzimatik Olmayan Endojen Antioksidanlar	24
2.14.1.3. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar	25
2.14.2. Eksojen Antioksidanlar	25
2.15. Antioksidan aktivitenin ölçülmesi	26
2.15.1. Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçülmesi.....	26
2.16. Folliküler Sıvı İçeriği	27
2.17. Folliküler Sıvı Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	28
2.18. Kalsiyum ve Hücre Düzeyinde Etkileri	29
3. MATERYAL ve METOD.....	30
3.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimulasyon Protokolü.....	30
3.1.1. Agonist Protokolü.....	30
3.1.2. Antagonist Protokolü	31
3.2. Luteal Faz Desteği	32
3.3. YÜT Sonuçlarının Değerlendirilmesi	32
3.4. Ros ve Kalsiyum Ölçümü.....	33
3.4.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	33
3.4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
3.4.2.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar	33
3.4.2.2. GSH-Px Tayini İçin Kullanılanlar	34
3.4.3. SOD Aktivitesinin Ölçümü	34

3.4.3.1. Deneyin Prensibi.....	34
3.4.3.2. Deneyin Yapılışı	34
3.4.4. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü.....	35
3.4.4.1. Deneyin Prensibi.....	35
3.4.4.2. Deneyin Yapılışı	35
3.4.5. Lipid Peroksidasyonunun (MDA) Tayini	36
3.4.5.1. Deneyin Prensibi.....	36
3.4.5.2. Deneyin Yapılışı	36
3.5. İstatistiksel Analizler.....	36
4. BULGULAR.....	37
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ	58
ÖZET.....	59
ABSTRACT.....	60
KAYNAKLAR.....	61

KISALTMALAR DİZİNİ

ART	: Artificiel Reproduction Tecnigue
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
İVF	: İnvitro Fertilizasyon
LH	: Luteinize Edici Hormon
FSH	: Folliküler Stimulan Hormon (Follikül geliştirici hormon)
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormon (Gonadotropin salıcı hormon)
TSH	: Tiroid Stimulan Hormon
hMG	: Human Menopozal Gonadotropin
OPU	: Oosit Peack Up(Oosit toplama işlemi)
ROS	: Reakyif Oxygen Species(Reaktif oksijen türleri)
Ca⁺²	: Kalsiyum
SOD	: Süperoksid Dismutaz
MDA	: Malondialdehit
GSH-Px	: Glutasyon Peroksiksidaz
CAT	: Katalaz
GIFT	: Gamet İntrafallopian Transfer
ZIFT	: Zigot İntrafallopian Trasfer
ICSI	: İntrocytoplasmic Sperm İnjektion (İntrasitoplazmik enjeksiyon)
LPS	: Lipopolisakkarid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
PUFA	: Doymamış Yağ Asitleri
RNA	: Ribonükleik Asit
TAC	: Total Antioksidan Kapasite
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LOOH	: Lipid Hidroperoksitler
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
GSH	: Redükte Glutasyon
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
OHSS	: Ovaryan Hiperstimulasyon Sendromu
KOH	: Kontrollü Ovaryan Hiperstimulasyon
TVUSG	: Transvaginal Ultrasonografi
HSG	: Histerosalpingografi
HPLC	: Yüksek performans likit kromatografisi
TBA	: Tiyobarbitürik asit

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Reaktif oksijen ürünleri	18
Tablo 2. Agonist ve antagonist tedavi grubunun yaş, follikül ROS, Kalsiyum değerleri ve sonuçlar açısından karşılaştırılması	46
Tablo 3. Agonist ve antagonist tedavi gruplarının infertilite sebepleri ve sonuçlar açısından karşılaştırılması	46
Tablo 4. Follikül büyüklüklerine göre ROS ve Kalsiyum değerleri.....	47
Tablo 5. Agonist tedavi grubunun follikül büyüklüklerine göre ROS ve Kalsiyum değerleri.....	47
Tablo 6. Antagonist tedavi grubunun follikül büyüklüklerine göre ROS ve Kalsiyum değerleri.....	48
Tablo 7. Agonist ve antagonist tedavi grubunun 14-16 mm folliküllerinin ROS ve Kalsiyum değerlerine göre karşılaştırılması.....	48
Tablo 8. Agonist ve antagonist tedavi grubunun ≥ 17 mm folliküllerinin ROS ve Kalsiyum değerlerine göre karşılaştırılması.....	49

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Agonist ve antagonist grupların follikül sıvılarının SOD değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması	39
Grafik 2. Agonist ve antagonist grupların follikül sıvılarının GSH-Px değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması	40
Grafik 3. Agonist ve antagonist grupların follikül sıvılarının MDA değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması	41
Grafik 4. Agonist ve antagonist grupların follikül sıvılarının kalsiyum değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması	42
Grafik 5. Agonist ve antagonist grupların elde edilen kaliteli oosit sayısına göre karşılaştırılması.....	43
Grafik 6. Agonist ve antagonist grupların elde edilen kaliteli embriyo sayısına göre karşılaştırılması.....	44
Grafik 7. Agonist ve antagonist grupların transfer edilen embriyo sayısına göre karşılaştırılması.....	45

1. GİRİŞ

İnfertilite, kontrasepsiyon yöntemleri kullanmadan bir yıl korunmasız cinsel ilişki sonucunda konsepsiyonun gerçekleşmemesi olarak tanımlanır. Sağlıklı genç çiftlerin %85-90'ında bir yıl içinde gebelik oluşurken, %10-15'inde infertilite problemi mevcuttur. Son 30 yılda infertilitenin insidansı değişmemiştir ancak infertilitenin değerlendirilmesi ve tedavisi alanında önemli gelişmeler olmuştur. İnfertilite, daha önce hiç gebelik oluşmamışsa; primer infertilite, canlı doğumla sonuçlansın ya da sonuçlanmasın, en az bir gebelik oluşmuşsa; sekonder infertilite olarak tanımlanır. Evlilik yaşının ilerlemesi, geç çocuk sahibi olma isteği, kontrasepsiyon kullanımının artışı, toplumda kadınların rolünün değişmesi çevresel ve sosyoekonomik faktörler, fertilitenin azalmasını etkilemiştir. Otuzlu yaşların sonlarında olan kadınlarda, infertilite görülme oranı %25'e ulaşırken, 40 yaşından sonra fertilitede azalma daha hızlı olur (1,2). Fekondabilite bir menstrüel siklusta, gebe kalabilme olasılığı, fekdite ise bir siklusta canlı doğuma kadar gidebilecek gebelik oluşma olasılığıdır (2).

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesi ile infertil çiftlerin tedavi şansları artmıştır. İn vitro fertilizasyon (IVF) ilk ve hala en sık kullanılan YÜT (Yardımcı üreme teknikleri) şeklidir, ancak günümüzde bu teknikle ilişkili intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), gamet intrafallopian transfer (GIFT), zigot intrafallopian transfer (ZIFT) gibi birçok yöntem uygulanmaktadır (2). 1992'den itibaren uygulanan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemleri erkek faktör infertilitesi başta olmak üzere günümüzde çeşitli nedenlere bağlı infertilitede umut olmuştur. YÜT kullanılacak hastalarda kontrollü over hiperstimulasyonu (KOH) ile multiple folliküllerin, bunun sonucunda çok sayıda oosit ve embriyoların elde edilebilmesi ile YÜT başarısını artırmak amaçlanmıştır. Ne var ki, IVF'in ilk yıllarında, KOH uygulanan sikluslarda luteinize edici hormonun (LH) tahmin edilemeyen ani yükselmesinin %20'lere varan sıklıkla oluşmasının gebelik sonuçlarını olumsuz etkilediği görülmüştür. Pituiter bez gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) reseptörleri üzerinde desensitizasyona neden olarak endojen LH artışının engellenebileceğinin bulunması ile gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analoglarının kullanıma girmesi, bu tahmin edilemeyen

LH yükselmelerini %2'lere düşürmüş, gebelik oranlarını arttırmıştır (3,4). Ancak, bu tedavi protokolü 2–3 haftalık bir desensitizasyon süresi gerektirdiğinden, tedavi süresi, ihtiyaç duyulan gonadotropin miktarı ve over hiperstimulasyon sendromu (OHSS) riski artmıştır. Hastalar desensitizasyon periodunda sıcak basması, baş ağrısı, kanama ve vajinal kuruluk gibi yan etkilere maruz kalmışlardır. GnRH zincirinde aminoasitlerin birçok noktada başka moleküllerle yer değiştirmesi ile elde edilen, reseptöre yüksek afinite ile bağlanan ve endojen gonadotropin salınımını engelleyen GnRH antagonistlerinden beklenti oldukça fazla olmuş, olumlu farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri ile agonistlerin yerini alabilecekleri düşünülmüştür. İlk alevlenme etkisinin olmaması, uzun desensitizasyon süresi gerektirmemesi ve böylece östrojen eksikliği semptomları yaşanmaması, kısa sürede yeterli LH baskılaması sağlaması, etkisinin doza bağımlı olması ve antagonist etkinin GnRH ya da agonisti ile hızlıca geri döndürülebilmesi antagonistleri agonistlere üstün kılan özellikleridir (3,4). Ayrıca yapılan çalışmalar tedavi süresinin ve kullanılan gonadotropin dozunun antagonist protokolda daha az olduğu yönündedir (4,5).

YÜT alanındaki tüm gelişmelere rağmen gebelik oranları aynı ölçüde artış gösterememiştir. Transfer edilen embriyo başına düşen implantasyon oranı %15 gibi düşük seviyelerde kalmıştır (6,7). Kontrollü ovaryen stimülasyon tedavi başarısını direkt olarak etkileyen bir faktördür. Antagonist protokolün uygulanmaya başlandığı yıllarda uzun protokolle kıyaslandığında siklus başına gebelik oranları daha düşük çıkma eğiliminde iken, öğrenme ve uygulama pratiğinin gelişmesi ile gebelik oranları iki protokol arasında hemen hemen aynı seviyelere gelmiştir.

Bir zamanlar kimyagerlerin ilgi alanında olan serbest radikallerin, şimdi birçok biyolojik sistemde esas rol oynadıkları gerçeği kabul edilmiştir ve serbest radikallerin, oosit, spermatozoa, embriyo ve bunların mikroçevrelerini etkilediği artık anlaşılmıştır. Folliküler sıvıda serbest radikallerin artması implantasyon ve erken embriyo gelişimi ile doğrudan bağlantılıdır ve yardımcı üreme tekniklerinde de başarı oranlarını etkilemektedir (7,8).

2. GENEL BİLGİLER

İnfertilite 1 yıllık korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalamama olarak tanımlanır. Sağlıklı çiftlerin yaklaşık %85-90'ında ilk bir yıl içinde gebelik gerçekleşmektedir. İnfertilite çiftlerin %10-15'ini ilgilendiren bir sorundur. Daha önce gebelik oluşmamışsa primer infertilite, canlı doğumla sonuçlansın ya da sonuçlanmasın, en az bir gebelik oluştuysa sekonder infertilite olarak adlandırılır. İnfertilite nedenleri WHO'nun standart tanimsal protokolleri kullanarak oluşturduğu verilere göre incelendiğinde; ovulatuvar disfonksiyon %15, tubal ve peritoneal patolojiler %30– 40, erkeğe ait faktörler %30–40 oranında görülür. Uterusa ait patolojiler nadirdir ve geri kalan olgular ise çoğunlukla açıklanamayan infertilite olarak tanımlanır (9).

2.1. İnfertilite Nedenleri

Fekondabiliteyi etkileyen durumlar 5 ana başlık altında toplanabilir:

1. Oosit ve ovulasyon anormallikleri
2. Sperm, oosit ya da embriyonun transportunu engelleyen reproduktif sistem anormallikleri
3. İmplantasyonu etkileyen anormallikler
4. Diğer nedenler (immünojenik, genetik nedenler ve açıklanamayan infertilite)
5. Sperm üretimindeki anormallikler

2.1 1. Oosit üretimindeki Anormallikler

Kadın infertilitesinin en sık nedenlerindendir (% 15-20).Anovülasyon, oligoovülasyon, over foliküllerinin yaşlanması en sık rastlanılan durumlardır. Ovülasyonunun tespiti için bazı gösterge ve testler kullanılmaktadır:

Hikaye: Düzenli aylık menstrasyon gören ve meme hassasiyeti ya da dismenore gibi siklik semptomları olan hastalar tipik olarak ovulatuvar kabul edilirler.

Bazal vücut ısısı ölçümü: Bazal vücut sıcaklığı folliküler fazda düşüktür, ovulasyondan sonra luteal fazda progesteronun termojenik etkisi sonucu 0.4-0.8 santigrad derecede artar. Menstruasyondan hemen önce tekrar bazal seviyelere düşer. Bu bifazik patern sabah yapılan ölçümlerle kolaylıkla tespit edilmiştir. Bu bifazik patern hemen hemen her zaman ovülasyon göstergesidir.

Mid luteal progesteron ölçümü: Folliküler fazda genelde 1ng/ml'nin altında olan progesteron miktarı orta luteal fazda 10 ng/ml progesteron seviyesine yükselir. Progesteronun pulsatil karakterinden dolayı siklusun 20-24 günleri arasında en az 3 örnekle serum progesteron tayini gerekir (1).

USG: Dominant follikülün varlığı ve çatlamasının ultrasonografik olarak tespit edilmesi ovülasyonun olduğunu göstermektedir.

LH: Seri LH ölçümlerinde LH yükselmesinin oluşması ovulatuvar siklus olabileceğini gösterir.

Endometrial biyopsi: Premenstruel dönemde yapılan biyopside sekretuar değişikliklerin gözlenmesi ovülasyonunun göstergesidir, ayrıca luteal faz progesteronun ve endometrial cevabın yeterliliği hakkında bilgi verir. İnvaziv bir girişim olduğundan luteal faz defekti ya da endometrial reseptivitede bozukluk düşünüldüğünde uygulanır (3).

Anovülasyon ve infertilite ile giden hastalıkların WHO sınıflaması şöyledir:

a. WHO I hipogonadotropik hipogonadizm (kilo ve vücut kompozisyonunda değişiklikler, stres, aşırı egzersiz, prolaktinoma, hipotalamusun infiltran hastalıkları, Cushing hastalığı, akromegali, boş sella sendromu, sheehan sendromu.)

b. WHO II östrojenik ovulatuvar disfonksiyon [Polikistik over sendromu (PCOS)]

c. WHO III hipergonadotropik hipogonadizm (over yetmezliği)

Vücut kitle indeksi (VKİ), serum FSH, prolaktin, TSH ve gerektiğinde androjenlerin ölçümü anovülasyonun özellikli nedenini anlamaya yönelik tetkiklerdir.

Anovulatuvar hastalıkların tedavisi ile normal çiftlerin fekonditesine yakın sonuçlar alınabilir (3).

2.1.2. Tubal Faktör

İnfertil çiftlerin yaklaşık %30-40'ında neden tubal ya da peritoneal faktördür. Pelvik inflamatuvar hastalıklar, apendisit, septik abortus, önceki tubal cerrahi, pelvik enfeksiyona neden olan intrauterin araç kullanımı, C.trahomatis ile subklinik pelvik enfeksiyonlar tubal hastalığa katkıda bulunurlar. Tubal durumu değerlendirmek için en çok kullanılan testler histerosalpingografi (HSG) ve laparoskopidir. HSG uterin kavite ile ilgili bilgi sağlayarak ve peritoneal ortamı değiştirmek suretiyle fekondabiliteyi arttırabilmektedir. Prosedürün ağırlı olması ve adhezyonlar ya da endometriozis gibi peritoneal hastalıklar hakkında fikir vermemesi işlemin dezavantajlarıdır. HSG'de proksimal tubal oklüzyon görüldüğünde doğrulayıcı testler (selektif tubal kataterizasyon veya laparoskopi) yapılması gerekir. (3). Laparoskopinin HSG'ye üstünlüğü tubal hastalıkları tespit etmede daha sensitif ve spesifik olmasıdır. Laparoskopi ayrıca endometriozisi tespit edebilir ve saptanan anormalliklerin tedavisini sağlar. Cerrahi ile tedavi edilen hastaların kümülatif gebelik oranı %20 olup bunların %20'si ektopik gebeliktir (3).

Servikal faktör infertilitesi

Normal servikste salgılanan mukus spermin geçişini kolaylaştıran özelliklere sahiptir. Konjenital malformasyon ve servikal travma normal mukus üretimini engeller. Servikal mukus yeterliliğini ve sperm-mukus etkileşimini değerlendirmek için postkoital test kullanılmaktadır. Ancak normal ve anormal sonuçların tahminsel değerinin az olması bu testle ilgili problem oluşturmaktadır (10).

Endometriozis

Laparoskopi ile saptanan endometriozis prevalansı infertil kadınlarda %21-47 iken fertil kadınlarda %5'tir. Tubal adhezyona neden olmamış minimal endometriozisin infertiliteye neden olup olmadığı kesin değildir. Endometriozisin ablasyonunun gebelik hızını arttırdığı belirtilmektedir. Buna karşın ovülasyonu baskılamanın beklentisel tedavi ya da YÜT tedavisine göre sadece potansiyel

konsepsiyonu geciktirdiği yolunda veriler mevcuttur mevcuttur (5). İleri evre endometriozis ise cerrahi tedavi endikasyonudur (11).

2.1.3. Uterin Faktörler

Uterin deformiteler, submuköz leiomyomlar, İntrauterin septumlar ve sineşiler, uterin infertilite nedenleridir. Histeroskopik olarak tanı ve tedavisi infertilite tedavisine katkı sağlar.

2.1.4. İmmunolojik Faktörler

Otoantikör oranı infertil kadınlarda %15, fertil kadınlarda % 1-4 olarak bulunmuştur (11).

Açıklanamayan infertilite

İnfertil çiftlerin %10-30'unda infertilite nedeni bulunamaz. Bu hastalar, normal semen ve ovulatuvar fonksiyonlu, normal uterus yapısı ve bilateral tubal açıklığı olan hastalardır. Bu hastaların %30'u tedavi edilmediği takdirde 3 yıl içinde gebe kalmaktadır. Açıklanamayan infertil hastalar IVF ile tedavi edildiğinde tubal faktör infertilitesi olan hastalara göre düşük oosit fertilizasyonu ve embriyo klivaj hızı göstermişlerdir. Bu durum açıklanamayan infertilitenin oosit ya da sperm fonksiyon anomalilerine bağlı olabileceğini göstermektedir. Bu hastalarda IVF ile ilk siklustaki gebelik oranı %18 olarak tespit edilmiştir (3,11).

Genetik nedenler

Turner sendromu, x kromozomu translokasyon ve delesyonu, fertilite ve fekondebilitate ile ilgili genlerdeki mutasyonlar (FSH, LH reseptör mutasyonu vb.), galaktozemi gibi enzim eksiklikleri infertilite nedenleri arasındadır (11).

2.1.5. Erkeğe Bağlı Faktörler

Değerlendirme, kadındakine benzer ve hipotalamik-hipofizer-testiküler aksın, spermin dışarı atım yollarının ve testiküler fonksiyonun incelenmesinden oluşur. Semen analizi kriterlerine göre erkek infertilite nedenleri şunlardır:

- a. Ejakülasyon yokluğu: ilaçlar, cerrahi, vasküler oklüzyon, diabet, psikolojik bozukluklar
- b. Azoospermi: Seminifer tübüler skleroz (kleinfelter sendromu), germinal aplazi (idiopatik, ilaç, radyasyon, mozaik Kleinfelter sendromu, XYY sendromu), matürasyon arresti (idiopatik, XYY sendromu, varikosel), duktal obstrüksiyon, endokrinopati
- c. Oligospermi: İdiopatik, kriptoorşidizm, varikosel, ilaçlar, sistemik enfeksiyonlar, endokrinopati
- d. İnfertil ancak normal: Jinekolojik anormallik, anormal koit alışkanlığı, akrozomal defektler, immunolojik, açıklanamayan
- e. Sperm yapısal defekti, uzamış abstinens, idiyopatik, genital enfeksiyonlar, antisperm antikor (4).

2.2. Ovaryan Fizyoloji ve Follikülogenez

Üreme biyolojisinin ana organı overin 2 fizyolojik görevi vardır:

1. Follikülogenez,
2. Steroidogenez.

Follikülogenez intrauterin hayatta başlar, steroidogenez puberteye kadar baskılanır. Puberteden itibaren overde follikül olgunlaşması, ovulasyon, korpus luteum fonksiyonu, steroid hormon biyosentezi ve salınımı birbirleri ile bağlantılı olarak başlar.

Fetal hayatta, germ hücreleri mitoz ile bölünerek gebeliğin 16–20. haftalarında yaklaşık olarak 6–7 milyon oogoniaya ulaşılır. Bu haftadan sonra germ hücre popülasyonu gen düzeyinde apoptozis ile gittikçe azalır. Birinci mayoz bölünme sonrası oosite dönüşen germ hücrelerinin sayısı doğumda 1–2 milyona, pubertede ise 300.000–500.000'e düşer. Üreme çağının 35–40 yılı boyunca, yalnızca 400 ile 500 tane oosit ovule olur, geri kalanlar ise atrezi yoluyla kaybedilirler. Reprodüktif dönemde foliküler tükenme 37–38 yaşına kadar sabit bir hızla yavaşça olurken, menopozdan önceki 10–15 yıl boyunca hızla gerçekleşir ve oosit sayısı menopoz döneminde 1000'in altına düşer (5).

Oogoniadan ovum gelişimi 2 mayoz bölünme sonucunda oluşur: 1.mayoz bölünme ovulasyondan hemen önce, 2.mayoz bölünme sperm penetrasyonu sırasında tamamlanır.

Profaz sırasında duraklamış olan oositlerin etrafını tek kat saran granüloza hücreleri ve bazal lamina primordial follikülü oluşturur. Primordial follikül 150 gün gibi uzun bir sürede ovulasyon yapacak hale gelir. Buna follikülogenez denir. İlk olarak çevresindeki yassı granüloza hücreleri küboidal şekle dönüşür ve bu hücreler FSH reseptörü sentezlemeye başlar. Granüloza hücreleri çoğalmaya başlar ve 6-7 tabaka olduğunda teka interna tabakası oluşur. Böylece sekonder follikül oluşmuş olur. Teka interna tabakası vaskularize olur. Daha sonra teka interna ve eksterna tabakaları oluşmaya başlar. Granüloza hücreleri içinde kavitasyon görülmesi ile follikül artık tesiyer follikül olarak adlandırılır ve kavite oluşumuna da antrum denir (12). Burada hücrelerde bulunan gap junction 'ların rolü büyüktür. Bunlar konneksin denen proteinlerden oluşur ve sentezleri FSH tarafından artırılır. Konneksinler granüloza hücrelerinin ovulasyona kadar büyümesini sağlarlar. Bu yol LH tarafından kapatılır ve bu yüzden anormal LH düzeyleri preovulatuvar folliküllerde atreziye neden olur (13,14). Teka interna, eksterna, bazal lamina, granüloza hücreleri, oosit ve folliküler sıvıdan oluşan follikül graaf follikül olarak adlandırılır. Antral follikül oluşumundan önceki sekonder ve tersiyer follikül aşamalarına preantral follikül adı da verilir. Bunlar en az 5 siklus önceden seçilirler. Eğer yeterli gonadotropin desteği olmazsa preantral dönemden antral döneme geçemezler ve atreziye uğrarlar. Atrezi apoptozis yoluyla olur.

Dominant follikül seçimi için follikül içindeki östrojen ve FSH etkisi, hipofiz FSH sekresyonu üzerine östrojenin etkisi önemli faktörlerdir. Mikroçevredeki artmış FSH seviyeleri dominant olmayan follikülleri atreziden kurtarabilir.

2.2.1. Ovulasyon

Ovulasyon genellikle LH artışından 10-12 saat, Östradiol artışından ise 24-36 saat sonra oluşur. Oosit over yüzeyinden LH pikinden 36 saat sonra atılır. Serum östradiol seviyesi ovulasyondan bir gün önce yükselmeye başlar. Östradiol ve progesteron pozitif feed-back etki göstererek serum LH seviyesini 10 kat artırır. LH seviyesinin ovulasyondan hemen önce pik yapmasıyla oositte germinal vezikülün

yıkılması gerçekleşir ve kromozomlar metafaz 1'den telofaz 1 evresine geçer. Oosit 1. Mayoz bölünmeyi ovulasyondan hemen önce tamamlar. Meydana gelen sekonder oosit haploid kromozom içerir ve nükleus 2. Mayoz bölünme evresine girer. Fertilizasyonla 2.mayoz bölünme tamamlanır ve 2. Kutup cisimciği atılır. Ovulasyonla atılan oosit matür, sekonder oosit ya da metafaz 2(MII) oosit olarak adlandırılır.

Klasik IVF'den farklı olarak ICSI'de işlemden önce oositin çevresindeki hücreler kimyasal ve mekanik yöntemlerle uzaklaştırıldığı için oosit maturasyonu ve yapısal özellikleri daha net gözlenebilmektedir. Kaliteli oosit tanımı şöyledir; iyi kalitedeki bir MII oosit şeffaf veya hafifçe granüler sitoplazmaya sahip, perivitellin aralığı dar ve zona pellucidanın renksiz görüldüğü bir hücredir (15).

2.3. Oosit Kalitesinin Değerlendirilmesi

Oosit morfolojisi için şu kriterler değerlendirilir:

- 1) Sitoplazmadaki granülasyon (homojen, santral, periferik). Aşırı granülasyon oosit kalitesini azaltır.
- 2) Vakualizasyon ve inklüzyon cisimcikleri.
- 3) Polar body: Fragmente ya da yassı olabilir. Fragmentasyonun çok olması kaliteyi azaltır.
- 4) Perivitellin aralık: Geniş veya dar olabilir. Geniş olması kaliteyi azaltır.
- 5) Zona pellucida: Düzensiz ve kalın olması kaliteyi azaltır.

ICSI için M II oositler kullanılır. Profaz I,M I,anomalili ve dejenere oositler işlem dışı bırakılır.

2.4. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi

Fertilize olmuş oosit zigot olarak adlandırılır. Zigot sferik, küçük ve vertikal eksen boyunca polarizasyon gösteren bir hücredir. Mitotik aktivasyonla bölünmeye başlayan zigotta hücre bölünmesi sonucu blastomerler oluşur. Blastomer morfolojisi embriyo grade sisteminde önemlidir. Blastomerlerin aynı büyüklükte olup olmaması, granülasyon ve vakualizasyon olup olmamasına göre embriyolar Grade I-IV arasında

derecelendirilir. İkinci günde 4 hücreli veya 3. Günde 7 hücreli, fragmantasyonu %20 altında, olan blastomerleri simetrik, vacualizasyon ve granülasyon içermeyen embriyolar kaliteli yani grade I olarak sınıflandırılır.

2.5. Yardımcı Üreme Teknikleri

Overden oosit alımını takiben yapılan işlemlere Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) adı verilir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan Yardımcı Üreme Teknikleri Klasik IVF ve ICSI'dir. YÜT de başarıyı etkileyen en önemli faktör hasta seçimidir. IVF ilk olarak tubal patolojilerden kaynaklanan infertilitede kullanılmıştır, ancak günümüzde daha geniş bir alanda uygulanmakta olup infertilitenin tüm nedenlerinde kullanılmaktadır. IVF, başka tedavi seçenekleriyle çözümlenemeyecek bir veya daha fazla sayıda infertilite nedeni olduğunda kesin olarak endikedir. Önceden geçirilmiş infeksiyon veya ileri evre endometriozisten kaynaklanan ağır tubal hastalık ve ağır erkek faktörüne bağlı infertilite problemi yaşayan çiftler için de en uygun tedavi seçeneğidir.

IVF, yaşa bağlı olarak veya başka nedenlerle ortaya çıkan açıklanamayan infertilite ve diğer tüm tedavi seçeneklerinin denendiği ve başarısız olduğu hastalar için de uygun tedavi seçeneği olmaktadır.

YÜT'lerinin başarısını etkileyen ana faktörler maternal yaş, over rezervi ve daha önceki reproduktif performanstır. Daha önce canlı doğum yapmış kadın için başarı şansı nulliplarlara göre daha fazla iken, başarısız bir IVF siklusu geçirmiş olan kadının gebe kalma ihtimali daha düşüktür. Kadın yaşı ve infertilite arasındaki ilişki net olarak bilinmektedir. Buna göre kadın fertilitesi 20-24 yaşları arasında zirveye ulaşmakta, 30-32 yaşına kadar göreceli olarak çok az değişiklik olmakta ve bundan sonra fertilitite kapasitesi hızla düşmektedir. İlerleyen yaşla birlikte overlerde kalan folikül sayısı giderek azalırken, uyarılmış siklulardaki gözlemler, yaşlanan foliküllerin gonadotropinlerle uyarılmaya karşı hassasiyetinin azaldığını göstermektedir (5). Yaşlanan oositlerde mayotik içcik oluşumu ve fonksiyonunu düzenleyen mekanizmadaki bozukluk sonucunda anöploidi insidansının arttığı ve bu nedenle fertilitede düşüş ve spontan abortus oranlarında artışın görüldüğü saptanmıştır (16,17).

2.5.1. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Tedavi Aşamaları

2.5.1.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon

Tedavinin ilk adımı yeterli sayıda fertilize olabilir oosit elde edilmesidir. Bu amaçla KOH kullanılır. KOH değişik ajanlarla ve değişik protokollerle uygulanabilir. En sık kullanılan ajanlar klomifen sitrat, Human Menopozal Gonadotropin (hMG), saf, rekombinant FSH'dır.

İVF'de ideal ovulasyon indüksiyonu rejimi; düşük maliyetli, yan etki insidansı ve siklus iptal oranı düşük olan rejimdir. Aynı zamanda bu rejimle gebelik oranları da maksimum olmalıdır. Bu amaçla birçok ovulasyon indüksiyon rejimi kullanılmaktadır. Her bir rejimin kendine ait avantaj, dezavantaj ve kullanım alanı vardır. Hastanın yaşı, daha önceki stimülasyon rejimine olan cevabı ve over rezervi göz önünde bulundurularak uygun tedavi şekli seçilmelidir.

Günümüzde sıklıkla GnRH agonistleri veya GnRH antagonistleri ile ovülasyon indüksiyonu rejimleri uygulanmaktadır.

2.5.1.1.1. GnRH Agonistleri

GnRH agonistleri, endojen hipofizer gonadotropin sekresyonunu suprese eder. Böylece ekzojen gonadotropin stimülasyonu sırasında gelişebilecek ve % 20 oranında siklus iptaline neden olan prematür luteinizasyon engellenmiş olur. GnRH agonisti kullanılan çalışmalarda, sadece gonadotropin kullanılanlara oranla oosit sayısı ve gebelik oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (18,19).

Kullanımdaki GnRH agonistleri;

Leoprolid asetat (subcutan)

Nafarelin asetat (intranasal)

Buserelin asetat (subcutan, intranasal)

Triptorelin asetat (subcutan)

2.5.1.1.2. Agonist Tedavi Protokolleri

Long protokol

Bu protokolda GnRH agonist tedavisine bir önceki siklusun luteal fazında (genelde 21. Günde) başlanır. Bu dönemde endojen gonadotropinler en düşük seviyededir. Siklusun 2-3. gününde hipofizer-ovaryan supresyonun sağlanıp sağlanmadığı kontrol edilir. Eğer serum E2 düzeyi 50 pg/ml'den düşükse supresyonun yeterli olduğuna karar verilir ve tedaviye gonadotropin eklenirken GnRHa uygulamasına da HCG gününe kadar devam edilir. Bu protokolün tek dezavantajı ardı sıra yapılan gonadotropin stimülasyonuna olan cevabın bazen azalarak, foliküler gelişim için gerekli olan gonadotropin dozunun artması ve tedavi süresinin uzamasıdır. Uzun protokol (bir önceki siklusun midluteal fazında başlayacak şekilde) erişilen oosit ve gebelik oranları bakımından en iyi IVF sonuçlarını vermiştir. Bu protokol erken folliküler faz sırasındaki endojen gonadotropin salınımının supresyonunu derin bir şekilde indükleyerek erken antral folliküllerin eksojen gonadotropinlere bir yanıtla koordine gelişimlerini sağlar ve simültane matürasyon gerçekleşir Bu, FSH penceresinin uzamış genişlemesine, artmış FSH gereksinimine ve sonuçta daha fazla matür follikül ve oosit sayısına ulaşılmasına yol açar (20). Avantajları dezavantajlarından fazla olduğundan, long protokol 10 yılı aşkın süredir standart ovaryan stimülasyon rejimi olarak kullanılmaktadır (3).

Kısa protokol

Bu protokolda agonist tedaviye siklusun 1. gününde başlanıp, HCG gününe kadar devam edilirken siklusun 3. Gününden başlayarak tedaviye gonadotropinler eklenir. Flare-up etki ile endojen FSH ve LH salınımını artıracığından ovaryan stimülasyon üzerinde olumlu etki sağlar. Takip eden dönemde oluşan hipofiz supresyonu ise prematür LH salınımı ve prematür luteinizasyon riskini azaltır.

Ultra-kısa protokol

Siklusun ilk günü GnRHa başlanır ve 3 gün verildikten sonra kesilir. Tedaviye gonadotropinlerle devam edilir. Amaç sadece flare-up etkiden yararlanmaktır.

GnRH agonistinin kullanılması sayesinde endojen olarak hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin sekresyonu baskılanarak ekzojen gonadotropin stimülasyonu sırasındaki erken LH yükselmesi engellenmiş olur. GnRH agonistiyle hipofizer baskılama yapılan siklusların %2'sinden azında erken LH yükselmesi görüldüğünden, stimülasyona foliküller daha büyük ve olgun olana kadar devam edilebilmektedir. Klinik çalışmalarda, bu sikluslarda sadece ekzojen gonadotropinlerle stimülasyon yapılan siklusa göre daha fazla sayıda oosit elde edildiği ve gebelik oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (20,21).

GnRH agonistiyle hipofizer baskılamayı takiben, ovaryan folikül gelişimini uyarmak için kullanılan ekzojen gonadotropinlerin başlangıç dozu hastanın ihtiyacına göre ayarlanmalıdır. Tipik başlangıç dozları yaşa, over rezervine ve önceki ovaryan stimülasyona olan cevaba bağlı olarak günlük 75–300 IU üriyer FSH, rekombinan FSH veya üriyer menotropinler (hMG-insan menopozal gonadotropinleri) arasında değişmektedir. Kademeli olarak düşük doz ile başlanıp cevaba göre doz arttırılan (step-up) veya kademeli olarak yüksek doz ile başlanıp cevaba göre doz düşürülen (step-down) rejimlerinden biri kullanılabilir.

2.5.1.2. GnRH Antagonistleri

GnRH antagonistleri, agonistlerden daha karmaşıktır ve gonadotropin salgılanmasını baskılamada başka bir mekanizma ile çalışır. GnRH antagonistleri, GnRH reseptörlerini doza bağlı kompetitif şekilde bloke eder. Flare etki yaratmaz ve gonadotropinleri suprese eder (22). Yakın zamanda GnRH antagonistlerinin klinik kullanıma girmesiyle birlikte YÜT sikluslarında ovaryan stimülasyon için yeni bir seçenek sunulmuştur. Reseptör sayısının azaltılması yoluyla, gonadotrop hücrelerin GnRH'a karşı hassasiyetini azaltarak hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin miktarını önce uyaran daha sonra baskılayan uzun etkili agonistlerin aksine, antagonistler doza bağımlı şekilde GnRH reseptörlerini bloke eder, alevlenme etkisi yoktur ve gonadotropinlerin baskılması hemen gerçekleşir (3). Antagonistlerin agonistlere göre avantajları çoktur. Tedavi süresi agonistlere oranla daha kısadır ve kullanılan gonadotropin dozu daha azdır (23,24). LH yükselmesini engelleme etkisini hemen gösterdiğinden tedavi folliküler gelişimin geç dönemine kadar ertelenebilir. Hatta E2 seviyeleri yükseldikten sonra bile uygulanabilir. Böylece

agonist tedavisi ile gözlenen östrojen eksikliğine bağlı semptomlar izlenmez (25). Agonistlerle görülen alevlenme etkisi olmadığından, antagonistlerle tedavide folikül kisti gelişme riski de ortadan kalkmış olur. Ağır ovaryan hiperstimulasyon gelişme riski agonistlere göre daha azdır (26,27,28).

GnRH antagonistlerinin bazı dezavantajları da vardır. Antagonistler, endojen gonadotropin sekresyonunu agonistlere göre daha fazla baskılar, dolayısıyla agonist tedavisi sırasında stimülasyon için rekombinant FSH (rFSH) veya üriner FSH (uFSH) kullanıldığında, düşük LH seviyeleri normal foliküler steroid sentezini desteklemek için yeterli olurken, antagonistlerle tedavi edilenlerdeki daha da düşük olan LH düzeyi yeterli olmayabilir. Bu nedenle bazı klinisyenler antagonistlere ek olarak düşük doz (75 IU) hMG eklemeyi tercih ederler. Ayrıca antagonist tedaviyle long protokolün karşılaştırıldığı beş randomize çalışmada eş sayıda ve aynı kalitede embriyolar transfer edilmesine rağmen, antagonistle tedavide gebelik oranlarının %5 daha düşük olduğu bildirilmiştir (49).

Klinik kullanımda olan iki GnRH antagonisti vardır: Ganirelix (Organon, Oss, Hollanda) ve Cetrorelix (ASTA-Medica, Frankfurt, Almanya)

Tek ve çoklu olmak üzere iki antagonist tedavi protokolü mevcuttur. Tek doz uygulamalarda spontan siklusun 2-3. Gününde gonadotropin stimülasyonuna başlanmakta ve en büyük follikülün çapı 14 mm olduğunda yada serum E₂ düzeyi 150-200 pg/ml ulaştığında antagonist enjeksiyonu yapılmaktadır. Bu genelde siklusun 7-9. Gününe denk gelmektedir. Sabit veya esnek protokol uygulamaları içeren iki çoklu antagonist protokolü geliştirilmiştir. Her iki tedavi planı da, antagonistlerin geç folikül fazında uygulanmasına olanak sağlar.

Sabit protokolde, gonadotropinlerle stimülasyondan 5 gün sonra, human chorionic gonadotropin (hCG) uygulanan güne kadar antagonist aynı dozda sürekli olarak verilmeye başlanır. Prematür LH ani yükselişini önleyen en düşük doz 0,25 mg olarak bulunmuştur (29,30).

Esnek protokolde, GnRH antagonisti önde giden follikül 13-14 mm olduğunda tedaviye başlanır. hCG gününe kadar devam edilir.

Uygulanan tedavi protokollerinde stimülasyona olan cevap, kan E₂ seviyelerinin seri ölçümü ve ovaryan foliküllerin transvaginal ultrasonografi ile

görüntülenmesi ile takip edilir. Bu takip ile kullanılan gonadotropin dozu ayarlanabilir. Çoğu hastada 7-12 günlük stimülasyon süresinin sonunda genel olarak ortalama çapı 17-18 mm olan en az iki folikül ve birkaç adet 14-16 mm'lik folikül elde edilmesi amaçlanır. Serum E₂ seviyesi, 14 mm veya daha büyük olan her folikül için ortalama 200 pg/mL olarak ölçülmelidir. Amaçlanan foliküler gelişim sağlandığında, foliküler olgunlaşmayı tamamlamak için 5000-10000 IU human koryonik gonadotropin (hCG) uygulanır. Buna alternatif olarak 250 µg rekombinan hCG de kullanılabilir.

Endometriyal kalınlık ve ekojenite, normal bir menstrüel siklus boyunca değişim gösterir. Menstrüel fazda endometrium ince ve myometriuma oranla hiperekojen bir yapıda izlenir (31).

Hiperekojen görünümün nedeni kanama ve dökülmüş endometrium olabilir (32). Proliferatif fazda foliküler büyüme oldukça endometriyal kalınlık artar ve bu fazın sonunda trilaminar görünüm alır (31). İki endometriyal tabakanın dış ve iç sınırı ekojenik (bazal tabaka ve endometriyal kanal), diğer kısımlar ise hipoekojen (fonksiyonel tabaka) görünür. Bunun nedeni glandların düz ve düzgün sıralı olup az miktarda sekresyon içermeleridir. Sekretuar fazda ise progesteronun etkisi ile glandlar büyür ve kıvrımlanır, glikojen ve mukus içeriğinin artması nedeniyle endometrium daha kalın ve hiperekojen bir görünüm alır (33).

2.6. Luteal Faz Desteği

Doğal sikluslarda ovülasyondan yaklaşık 4 gün sonra tepe noktasına ulaşan steroid hormonlar 1 hafta bu seviyede kalır ve menstrual perioddan 5 gün önce düşmeye başlar. Uyarılmış sikluslarda luteal faz hormon üretimi multiple korpus luteum varlığından dolayı suprafizyolojiktir, ancak daha kısa sürelidir. Stimüle edilmiş IVF sikluslarında ovum toplanmasından sonraki ilk haftada steroid üretimi yeterli görülmektedir. Ancak, KOH sikluslarında GnRH'nin kullanılması ile korpus luteum fonksiyonunun anormal olduğu görülmüş ve luteal faz desteğinin önemi açığa çıkmıştır. Progesteron kadar östrojen de direkt olarak luteinizasyonu sağlamasa da progesteron reseptörü yenilenmesinde gerekli olduğu için önemlidir. Bu nedenle korpus luteumdan hem östrojen hemde progesteron salınımı üzerindeki uyarıcı etkisinden dolayı hCG kullanımı ileri sürülmüştür. Teorik olarak korpus luteum

devamlılığını sağladığı için GnRH-a sikluslarında hCG'nin progesterondan daha etkili olması beklenir. Ancak yapılan klinik çalışmalara göre GnRH-a kısa ya da uzun protokollerinde, tek başına veya östrojenle kombine i.m. progesteron ya da vajinal yolla verilen progesterona göre hCG nin üstünlüğü olmadığı sonucuna varılmıştır. İntramusküler progesteron, vajinal yolla karşılaştırıldığında klinik gebelik oranı ve doğum oranı açısından daha etkili olduğu ve tüm tedavi formlarına göre oral progesteronun en etkisiz olduğu görülmüştür (4,5).

2.7. Monitorizasyon

Monitorizasyondaki amaç foliküler matürasyonu kontrol etmek, hCG verilme zamanını tespit etmek ve siklusun geleceğini tahmin edebilmektir. Yüksek over cevaplılarda siklusu iptal ederek OHSS'yi engellemek, düşük cevaplıları tespit ederek tedavide ayarlamalar yapmak için monitorizasyon gereklidir. KOH takibinde serum östrodiol, LH ölçümü ve USG kullanılır.

Serum östrodiol seviyesi her zaman folikül büyümesi ile korele değildir (5).

Uzun dönem GnRH-a protokolünde pituiter desensitizasyonun değerlendirilmesinde de E2 seviyesi kullanılmaktadır (USG'de 10 mm'den büyük folikül olmaması ile birlikte E2'nin 50 pg/ml altında olması). GnRH antagonistlerinin kullanımı E2 cevap paternini değiştirebilir.

Folikül boyutları 13-14 mm çapa ulaştığında veya E2 düzeyi 250 pg/ml seviyesine yükseldiğinde LH pikinin takip edilmesi gerekir. Bu ölçüm oosit toplanma saatinin ve prematür luteinizasyonun saptanması için bilgi sağlamaktadır. (5) Foliküler büyüme ultrasonografi ölçümü ile değerlendirilerek foliküler matürasyon ve hCG zamanlaması hakkında bilgi edinilebilir. Endometrial kalınlık ölçümü E2 sekresyonu hakkında indirekt bilgi sağlayabilir. Bir çalışmada hCG günü endometrial kalınlığın <6mm olduğu olgularda gebelik oluşmadığı görülmüştür (5).

2.8. Oosit Toplanması

hCG enjeksiyonunu takiben 34-36 saat sonra oosit toplama (oocyte pick-up, OPU) işlemi gerçekleştirilir. Transvaginal ultrasonografinin kullanıma girmesi ile OPU günümüzde hemen hemen tüm merkezlerde lokal veya genel anestezi ile

kolaylıkla yapılabilir. TVUSG eşliğinde lateral fornikslerden iğne ile girilerek oositler follükül sıvı ile birlikte aspire edilir. En sık karşılaşılan komplikasyonu iğnenin geçiş yerinde olan kanamalardır. Nadiren mesane, damar, barsak yaralanmaları olabilir.

2.9. Gamet Hazırlanması ve Kültürü

OPU işlemi sırasında aspire edilen follükül içeriği hemen laboratuarda Laminair flow kabin içinde bir stereo mikroskop ile incelenir ve sıvının içinde bulunan oosit kültür sıvısının içine konarak inkübatöre kaldırılır. Oosit kültürü ve sperm hazırlığının ardından fertilizasyon işlemine geçilir. IVF planlanıyorsa oosit başına 20.000 sperm ile inseminasyon yapılır. Sperm parametrelerinde bozukluk olduğu durumlarda bu sayı artırılabilir. Erkek faktörü varlığında veya nedeni açıklanamamış infertilite olgularında ICSI tercih edilir. 16-18 saat sonra iki pronükleus yani fertilizasyon olup olmadığı araştırılır.

2.10. Embriyo Transferi

Elde edilen embriyolar pronükleer fazdan blastosist aşamasına kadar herhangi bir dönemde transfer edilebilir. Günümüzde 5.gün blastosist transferi tercih edilmektedir. Transfer edilecek embriyo sayısı ile klinik gebelik oranları arasında direk bir ilişki mevcuttur. En iyi sonuçlar 2-4 embriyonun transfer edilmesi ile alınmaktadır. Ancak ikiden fazla embriyo verildiğinde çoğul gebelik oranlarının yükselmesi nedeniyle pek çok ülkede transfer edilen embriyo sayısı kısıtlanmaktadır. Mart 2010 tarihinden itibaren ülkemizde 35 yaş altındaki hastalara 1 embriyo,35 yaş üstündeki hastalara ise 2 embriyo transferi yapılmaktadır.

2.11. Serbest Radikaller

Atomun yapısını oluşturan elektronlar; orbita adı verilen yörüngede çiftler halinde bulunurlar. Az sayıda molekülde ise elektronlar çiftler halinde olmayıp tek olarak bulunurlar. Eksik elektronlu bu moleküller karşılaştıkları herhangi bir molekül ile aşırı şekilde reaksiyona girmeye eğilimli olup diğer moleküllerle elektron alışverişinde bulunurlar. İşte diğer moleküllerle kolayca elektron alışverişi yaparak onların yapısını bozan bu moleküllere radikal, serbest radikal veya oksidan

moleküller denilir. Tek olan bu elektron yapıları genellikle üst kısma yazılan bir nokta ($O\cdot$) veya çizgi (O^-) ile gösterilir (34,35).

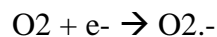
Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlardır. Moleküler oksijenin (O_2), iki tane eşlenmemiş elektronu bulunduğundan dolayı kendisi aynı zamanda bir radikaldır. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Serbest radikal olmayan maddelerle daha yavaş reaksiyona girer. Organizmada oksijenin kısmi redüksiyonuyla, çok sayıda ve yüksek derecede reaktif ürünler (ROS) oluşur. Oksijen, hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan sonra en son H_2O 'ya indirgenir (Çizelge 2.3.1.) (34,36,37).

Tablo 1. Reaktif oksijen ürünleri (37)

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Hidroksil	($HO\cdot$)	Hidrojen peroksit	(H_2O_2)
Alkoksil	($RO\cdot$)	Singlet oksijen	(1O_2)
Peroksil	($ROO\cdot$)	Ozon	(O_3)
Süperoksit	(O_2^-)	Hipoklorid asit	($HOCl$)
Nitrik oksit	($NO\cdot$)	Lipid hidroperoksit	($LOOH$)
Azot dioksit	($NO_2\cdot$)	Peroksinitrit	($ONOO\cdot$)

2.11.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

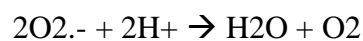
Süperoksit radikali; tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir (34, 38, 39).



Süperoksit, serbest radikal olmakla beraber kendisi çok zararlı değildir. Asıl önemi H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (40).

2.11.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, O_2 'nin enzimatik olarak iki elektron alması ya da O_2^- 'lerin enzimatik/nonenzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur (34, 41).



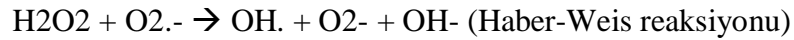
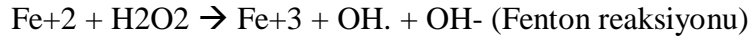
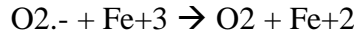
Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir (34).

2.11.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH⁻) hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen serbest radikaller içinde en kuvvetli oksidan olan radikaldır. Suyun iyonize radyasyona maruz kalması ile oluşur (34, 41, 42).



Hidroksil radikalleri, fenton reaksiyonu ile H₂O₂'nin Fe⁺² ve diğer geçiş elementleri varlığında (Cu, Mn, Zn, Cr, Co, Ni, Mo) indirgenmesiyle, H₂O₂'nin O₂⁻ radikali ile reaksiyona girmesiyle de (Haber-Weis reaksiyonu) oluşmaktadır. Haber-Weis reaksiyonu katalizör varlığında ya da katalizörsüz gerçekleşebilir. Katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerlemektedir (42-44).



2.11.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen (¹O₂), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Doymuş yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini (ROO⁻) meydana getirir ve lipid peroksidasyonu (LPO)'nu başlatabilir (42).

2.12. Organizmada Serbest Radikal Reaksiyonlarını Artıran Faktörler

Serbest radikal artırıcı faktörler eksojen ve endojen olmak üzere iki grupta toplanabilir (45). Bunlar aşağıdaki şekildeki gibi sıralanabilir;

Eksojen faktörler

Diyetsel faktörler: Doymamış yağ asitlerince beslenme, alkol, fazla kalorili beslenme (obezite), hayvansal proteinlerden zengin beslenme, az sebze ve meyve yenmesi, yiyeceklerin uygun olmayan ortam ve koşullarda hazırlanması

Çevresel faktörler: Sigara dumanı, hava kirliliği, radyasyon

İlaçlar: Kemoterapotik ilaçlar (adriamisin), glutatyon tüketen ilaçlar

Endojen faktörler

Yoğun egzersiz, sedanter yaşam

Stres

Doku hasarı ve kronik hastalıklar

Diyetsel antioksidan alımını etkileyen koşullar (malabsorbsiyon, kolestaz) olarak belirlenebilir.

2.13. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerini etkilerler (46).

2.13.1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesinin aşacak oranlarda oluştuğu zaman organizmanın çeşitli yapılarında bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerden en hassas olanı lipidlerdir (47). Lipid peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'nin oksidan maddeler etkisiyle alkol, aldehit, hidroksi asit, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisidir. Peroksidasyon ROS'in PUFA'nin yan zincirdeki metilenik karbonlardan hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atak ile başlar. Hidrojen atomunun zincirden çıkarılması, karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron bırakarak karbon merkezli radikal oluşumuna yol açar. Bu radikal moleküler düzenleme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijenle reaksiyona girerek ROO⁻ radikali oluşur. Bu ROO⁻, radikali diğer ROO⁻ radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. En önemlisi ROO⁻ radikalinin membrandaki diğer yağ asitlerinden hidrojen atomlarını çıkarması ve peroksidatif zincir reaksiyonunu

yaymalarıdır. Böylece her defasında lipid hidroperoksitler (LOOH) ve yeni bir ROO⁻ radikali oluşacaktır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra yayılabilmekte, yüzlerce yağ asiti zincirleri LOOH'lere çevrilebilmektedir. Bu şekilde yağ asitlerinin kaybı membran hasarına yol açmaktadır (47).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanır. Malondialdehit LPO'nun derecesinin saptanmasında kullanılan bir belirteçtir. Lipid LOOH ve lipid ROO⁻ radikalleri hücrenin birçok komponenti ile reaksiyona girerek toksik etkilerini gösterirler (48, 49).

Malondialdehit membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olarak iç membranın bazı özelliklerini değiştirir. Ayrıca diffüze olabildiğinden deoksiribonükleik asit (DNA)'nın nitrojen bağları ile reaksiyona girebilir. Malondialdehit bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (50). Membrandaki PUFA ve protein içeriğinin fazla olması peroksidasyonun yayılmasını artıran faktörlerdir. Bunun yanında kolesterolün varlığı peroksidasyonu baskılamaktadır. Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit şelatlar (Fe⁺²-ADP) hem, Hb ve miyoglobini de içeren bazı demir proteinleri lipid LOOH'ın yapısını bozarak peroksidasyonu sonlandırılmaktadır. Ayrıca C ve E vitamini gibi zincir reaksiyonlarını durduran, kıran antioksidanların varlığı da peroksidasyonun sonlandırılmasında önemlidirler (51).

2.13.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine PUFA'nden daha az hassastırlar ve başlayan zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin ROS ile reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Serbest radikallerin neden olduğu hasar sonucu proteinlerde parçalanma, çapraz bağlanma ve agregasyon oluşur (41,52).

2.13.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glikoz ve mannoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H₂O₂, peroksitler ve okzalaldehitler oluşabilir. Okzalaldehitler DNA, ribonükleik asit (13) ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (41,45).

2.13.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin nükleik asitler ve DNA üzerine etkisiyle, DNA zincirinde kopmalar, bazlarda ve deoksiribozlarda kırılmalar ve hasar oluşur. Sonuçta sitotoksiste, mutasyon ve malign değişim potansiyeli oluşabilir.

2.14. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Sağlıklı bireylerde oluşan ROS ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin bozulması oksidatif stresle sonuçlanmaktadır.

Antioksidanlar genel olarak endojen ve eksojen olmak üzere iki grupta incelenir.

2.14.1. Endojen Antioksidanlar

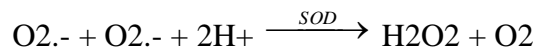
A- Enzimatik antioksidanlar (mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S transferaz, glutatyon redüktaz).

B- Enzimatik olmayan antioksidanlar (vitamin E, β karoten, vitamin C, melatonin, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyoglobulin, albumin, bilirubin ve glutatyon).

2.14.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.14.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

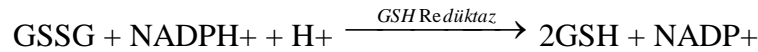
Süperoksit genel olarak, zincirleme radikalik tepkimeleri başlatır ve tepkimeler boyunca hidroksil radikali, $1O_2$ ve organik radikallerin oluşumuna neden olur. Radikalik zincir tepkimelerinin başlaması ve tepkimeler boyunca $O_2\cdot$ -den çok daha reaktif ve toksik etkili radikallerin yapımı SOD tarafından engellenir. Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, CAT ve GSH-Px'den farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır.



Süperoksit dismutaz ile katalizlenen tepkimenin ürünü olan H_2O_2 ise CAT ile H_2O 'ya indirgenmektedir.

2.14.1.1.2. Glutasyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)

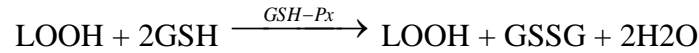
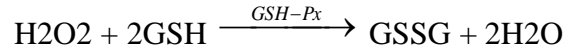
Redükte glutasyon (GSH)'un yüksek konsantrasyonları ve okside glutasyonun (GSSG) düşük düzeyleri organizmanın yaşamı için gereklidir. Redükte glutasyon, protein sülfhidrillerinin oksidasyonunu geriye çevirir. Yüksek GSSG düzeyleri protein sülfhidrilleriyle reaksiyona girer ve proteinleri inaktive eden karışık GSH-protein sülfhidrilleri oluşturur. Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş GSH'ın tekrar indirgenmiş şekle dönüşmesi gerekir. Glutasyon redüktaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında indirgenme reaksiyonunu katalizler.



NADPH/NADP⁺ ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler akut prooksidan stres ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirtisidir.

2.14.1.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

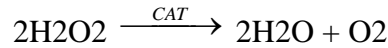
Hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan esas olarak GSH-Px enzimi sorumludur. Glutasyon peroksidaz, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir (52).



Glutatyon peroksidazın fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Eritrositlerde de oksidan sisteme karşı en etkili antioksidandır.

2.14.1.1.4. Katalaz

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan hem enzimdir. Hidrojen peroksidin O₂ ve H₂O indirgenmesini katalizler (42).



2.14.1.2. Enzimatik Olmayan Endojen Antioksidanlar

1. C vitamini (Askorbik Asit): Güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidan olup, O₂-, peroksit ve OH- radikalleri ile reaksiyona girerek bir ara ürün semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidro askorbik asiti oluşturur. Membran içindeki ve ekstraselüler dokulardaki LPO'nu önler.

2. E vitamini (α -tokoferol): Lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu serbest radikal temizleyicisidir. Aynı zamanda 1O₂'nin kuvvetli bir tutucusudur. Ayrıca OH- radikali, peroksi radikali ve O₂- ile direk olarak reaksiyona girebilir (46).

3. β karoten: A vitamini ön maddesi olan β karoten etkili bir 1O₂ ve radikal tutucu antioksidandır.

4. Melatonin: Pineal bezden salgılanan vücutta birçok etkisine ek olarak direk radikal temizleyici, indirek olarak da antioksidan enzim düzeylerini artıran ve nitrik oksit (NO) sentetaz gibi prooksidatif enzimleri baskılayarak antioksidan etki gösteren bir hormondur (53).

5. Glutatyon (GSH): Antioksidan olarak önemli bir yer tutan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasardan korur. Glutatyon, proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutarak bu grupların oksidasyona karşı korunmasını sağlar. Glutatyon eritrositleri, lökositleri ve göz lenslerini oksidatif hasara karşı korumada hayati önem taşır.

2.14.1.3. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar

Bazı durumlarda ürik asit, sistin, albumin, bilirubin, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, kreatinin ve östrojenler de serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar (42).

2.14.2. Eksojen Antioksidanlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol)

NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler)

Kalsiyum kanal blokerleri (verapamil, nifedipin)

Non-steroid antiinflamatuar ilaçlar (ibuprofen)

Demir tutucuları (desferroksamin, EDTA)

Rekombinant SOD (r-SOD)

Besinlerdeki doğal antioksidanlar. A, C, E vitamini ve β karoten

Nötrofil adezyon inhibitörleri

Asetil sistein, mannitol, melatonin

Oksidatif stresin hastalıkların patogenezinde rolü anlaşıldıkça bu alandaki çalışmalar da yoğunlaşmıştır. Oksidatif stres çalışmalarında serbest radikallerin artışı veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği araştırılmaktadır. Bunun için plazma, serum, eritrosit, doku örnekleri gibi çeşitli materyallerde analiz yapmaya uygun yöntemler geliştirilmiştir. Serbest radikaller son derece reaktif ve kısa ömürlüdürler. Bu yüzden direkt olarak ölçülmeleri zordur. Serbest radikalleri direkt olarak ölçen tek analitik teknik spin rezonans spektrometrisidir. Spin rezonans spektrometrisi ileri teknik donanım gerektirir, ayrıca çok duyarlı olmaması ve mikromolar düzeyde sabit konsantrasyonlarda serbest radikaller gerektirmesi nedeniyle kullanımı yaygın değildir. Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için bunların lipidlerle, proteinlerle ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli ürünlerin ölçümü gibi indirekt yöntemler kullanılır. Bu yöntemler arasında lipid peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçümü en çok kullanılan yöntemdir. Hidroksil serbest radikali (OH^{\bullet}) reaksiyon ürünlerinin ölçümü ile tayin edilebilir. Hidroksil serbest radikali (OH^{\bullet}) salisilik asitle reaksiyona girerek 2,3-dihidroksibenzoat (2,3-

DHB) ve fenilalanin ile reaksiyona girerek o- ve m-tirozinleri oluşturur. Organizma sıvılarında 2,3-dihidroksibenzoat (2,3-DHB) veya o- ve m-tirozinlerin tespiti hidroksil serbest radikalının (OH^{*}) artışını gösterir. Ancak bu teknik uygulanması zor ve sonuçları bakımından pek güvenilir değildir.

2.15. Antioksidan aktivitenin ölçülmesi

2.15.1. Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçülmesi

Oksitativ stres çalışmalarında, organizmada serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için çeşitli biyolojik materyalde lipid peroksidasyonunun çeşitli ürünlerinin konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir. Serbest oksijen radikallerin başlattığı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler oluşur. Lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler de daha sonra alkan aldehitler, alken aldehitler, hidroksialken aldehitler, malondialdehit (MDA) ve uçucu hidrokarbonlar oluşturmak üzere parçalanırlar. Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü, konjuge dienlerin ölçümü, MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü, uçucu hidrokarbonların ölçümü, lipid peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü ve malondialdehit (MDA) ölçümü yapılabilir. Her bir tekniğin kendine göre zorlukları vardır ve hiçbir metodun lipid peroksidasyonunu tam bir doğrulukta ölçtüğü söylenemez. Ayrıca, oluşan ürünlerin miktarı çeşitli faktörlerden etkilenebildiğinden bir tek ürün yerine birden fazla ürünü ölçmek idealdir.

Malondialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır.

Serbest MDA'nın direkt tayini en güvenilir şekilde yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapılır. HPLC çok hassas ve hızlı bir metottur ve az numune gerektirir. Fakat teknik çok dikkatli numune hazırlığı gerektirir.

Oksitativ stres çalışmalarında, organizmada antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliğini araştırmak için çeşitli biyolojik materyalde çeşitli antioksidanların aktiviteleri veya konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir. Enzim olan ve enzim olmayan birçok antioksidan çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir.

2.16. Folliküler Sıvı İçeriği

FF(Folliküler sıvı) oositlerin gelişimi için çok önemli bir mikroçevre oluşturur. FF, hem kan folliküler bariyerini geçen kan plazma bileşenleri akımının hem de granüloza ve tekal hücrelerin sekretuar aktivitesinin bir ürünüdür (54). Oositi çevreleyen FF'in bazı biyokimyasal özelliklerinin oosit kalitesinin belirlenmesinde ve akabinde embriyo gelişimi ve fertilizasyonun başarıyla sağlanmasında önemli bir rol oynayabileceğini düşünmek makuldür. FF kompozisyonu dolaşımdaki biyokimyasal çevreye yansıtacağından, FF komponentlerinin incelenmesi ayrıca kan serumundaki metabolik değişimler hakkında da bilgi sağlayabilir (55).

OPU anında oositlerle birlikte aspire edildiğinden FF'in temini oldukça kolaydır. Son yıllarda FF içeriğinin incelenmesi, çeşitli folliküllerden alınan sıvıda bir yada daha fazla substansın analizi veya bunların o spesifik follikülden gelen oositin akibetiyle ilişkilendirilmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir.

FF kompozisyonuyla ilişkili oosit kalitesini tahmin eden çalışmalarla ilgili başka bir problem de, oosit nükleer matüritesinin yalnızca ICSI vakalarında oosit aspire edilmesinden hemen sonra değerlendirilmesidir. IVF'te oosit matüritesi genelde yalnızca ertesı gün değerlendirilir ve matür bir oosit kültür edildiğinde nükleer matürasyonunu tamamlamış olabilir. Bu, sonuçları yanıltabilir. Son olarak, belirli bir substansın FF konsantrasyonunun, follikül kalitesiyle ilişkili bir değişken mi yoksa hastanın yaş, sigara kullanımı veya ovaryan stimülasyon tipi gibi klinik özellikleriyle ilişkili bir değişken mi olup olmadığı tam olarak belli değildir.

FF'in kimyasal bileşenleri şu kategoriler altında gruplandırılmıştır:

- a) Hormonlar,
- b) Büyüme faktörü-beta (TGF-beta),
- c) Diğer büyüme faktörleri ve interlökinler,
- d) Reaktif oksijen türleri (ROS),
- e) Anti-apoptotik faktörler,
- f) Proteinler, peptidler ve amino asitler,
- g) Şekerler,
- h) Prostanoidler.

2.17. Folliküler Sıvı Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Folliküler vaskülarite, intrafolliküler oksijen içeriği ve mitokondriyal aktivite optimal oosit gelişimini sağlayan faktörlerdir. Folliküler vaskülarizasyon ve oksijenizasyon üzerindeki çalışmalar her bir oositin gelişimsel uyumluluğu hakkında bilgi sağlayabilir.

Oksidatif stres DNA hasarına neden olup apoptozisi tetikleyebilir. Aslında ciddi düzeyde hipoksik olan folliküller, yüksek frekansta miyotik spindle (iğ, lif) anormallikleri olan oositleri içerir ve akabinde embriyodaki anöploidi ihtimali artar. Sitoplazmik defektleri olan oosit içeren folliküller sıklıkla multinükleotid blastomerli embriyolara yol açar (56).

Gerçek rolünün henüz tam olarak anlaşılammış olmasına ve aslında hala çelişkili sonuçlar bulunmasına rağmen, oksidatif stresin oosit matürasyonu üzerindeki etkisinin yıkıcı olduğu görülmektedir. Şaşırtıcı bir şekilde bazı çalışmalar FF ve ROS seviyeleri ile matürasyon parametreleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. ROS'ların in vitro matürasyon sırasında bovin oosit gelişim gücünü arttırdıkları bildirilmiştir (57). Bir çalışmada IVF'le gebe kalan kadınların gebe olmayan hastalara kıyasla daha yüksek FF ROS seviyelerine sahip oldukları bildirilmiştir (58).

Diğer bir yandan oksidatif strese yol açan supra-fizyolojik seviyelerdeki ROS miktarları, defektif embriyo gelişiminin etyolojisinde yer almaktadır ve düşük FF ROS seviyelerinin IVF'te başarıyı göstermede olası bir marker olabileceği bildirilmiştir (59).

Oosit için bulunan oksijen ile antioksidanlar arasındaki optimal bir dengenin normal miyotik lif formasyonu ve doğru kromozom dizilimine olanak tanımak için önemli olduğu görünmektedir; fare modelinde doğru kromozomal dizilimin yüksek oksijen ve antioksidan seviyeleriyle birlikte olduğu bulunmuştur (60).

Genelde yüksek ROS seviyeleri, fertilitate ihtimalini etkileyen geniş bir dizi patolojik durumu yansıtır. ROS'un yıkıcı etkisi superoksit dismutaz (SOD) ve selenyum-bağımlı glutatyon peroksidaz (SeGSH-Px) enzimleri gibi endojen antioksidanlarla ya da eksojen antioksidanlarla etkisiz hale getirilebilir. İnsan FF'inde SOD'un bulunduğu ve yüksek FF SOD konsantrasyonlarının fertilize olamamış oositlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (61).

Aksine yüksek seviyedeki SeGSH-Px ise fertilize oositler içeren folliküllerde görülmüş ve düşük seviyeleri ile fertilizasyon başarısızlığı arasında bir ilişki bulunmuştur. Genelde FF total antioksidan kapasitesi (TAC)'nin fertilize olmaya elverişsiz oositleri taşıyan folliküllere nazaran fertilizasyon için yeterli oositleri barındıran folliküllerde anlamlı oranda daha yüksek olduğu bulunmuştur (62).

Antioksidan aktivitesinin ölçülebilir bir markeri olan TAC, IVF'te gebelik oranları ve embriyo kalitesi ile pozitif bir korelasyon göstermiştir. FF'de serumdakinden daha yüksek seviyelerde TAC miktarları bulunması granüloza hücrelerinin antioksidan aktivitesini yansıtır (62). Artmış TAC seviyeleri, yüksek-kalitedeki oositlerin büyümesini sağlayan matür folliküllerin bir markeri olacaktır.

2.18. Kalsiyum ve Hücre Düzeyinde Etkileri

ROS dengesizliği, Ca²⁺ iyonlarının endoplazmik retikulumdan ve diğer intrasellüler depolardan salınımına ve Ca²⁺-duyarlı süreçlerin aktive olmasına neden olarak, Ca²⁺ homeostazının bozulmasına yol açar.(63) Ca²⁺ iyonları sinyal iletim yollarının birçoğunda önemli roller oynayabilir, bunun yanında permeabilite geçiş porunun (MPT) açılması dahil, mitokondriyal fonksiyon üzerinde derin etkiler oluşturabilir. (64) MPT'nin açılması iç mitokondriyal membranda Ca²⁺ iyonlarının artışı ve proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonu ile sinerjistik olarak artmakta (65,66) fakat Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından engellenmektedir. Sonuç olarak, mitokondriyal membran potansiyeli ve ATP sentezi bozulur. Eğer hücrenin tamamındaki mitokondriler etkilenirse, ATP konsantrasyonları hızla düşer, iyonik homeostaz kaybolur ve hücre primer nekroza uğrar.(67,68). Daha sınırlı sayıda organel etkilenmişse ya da por geçici bir süre açılmışsa, bu durum nekroz yerine apoptozun meydana gelmesi için yeterli miktarlarda ATP'nin korunmasına izin verebilir. MPT porunun açılması sitozolik ve nükleer proteinlerin karakteristik olarak bölünmesine yol açacak olan kaspas yollarını aktive eden, sitokrom c ve Apaf-1 gibi diğer apoptogenik moleküllerin salınması ile ilişkilidir. Son dönemlerde insan oositlerinde ve embriyolarında apoptotik genlerin geçici ekspresyonu tek-hücreli revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği kullanılarak incelenmektedir. İmmatür ya da döllenmemiş oositlerde ekspresyon saptanmamıştır; fakat canlı ve cansız embriyoların her ikisinde de transkriptlere rastlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Kliniği'nde İVF ünitesinde Eylül 2009-Mart 2010 tarihleri arasında ICSI yapılan 45 infertil hasta grubu olgu materyalimizi oluşturdu.

Çalışmaya en az 3 yıldır korunmasız cinsel ilişki sonucunda gebelik elde edememiş ve YÜT endikasyonu olarak infertilite nedenlerinden herhangi birine sahip olan, daha önce YÜT siklusu denenmiş veya denenmemiş hastalar dahil edildi.

Tüm hastaların yaşı, infertilite süresi, infertilite etyolojisi, infertilite türü (primer / sekonder) ve daha önceki YÜT siklus sayıları sorgulandı. Hastaların infertilite etyolojisi olarak erkek faktörü, tuboperitoneal faktör, ovaryan faktör, endometriyozis, açıklanamayan infertilite nedenlerinden hangisine dahil olduğu kayıt edildi. Siklusun üçüncü gününde ölçülmüş olan FSH, LH, Prolaktin ve E₂ seviyeleri kaydedildi. Erken folliküler fazda (1.-3. Gün); bazal USG yapıldı ve uterus boyutları, endometrium kalınlığı, over boyutları, follikül sayısı ve çapları ölçüldü. Bunun için General Electric Logic 200 Pro marka USG cihazı ve 6,5 MHz'lik vaginal prob kullanıldı.

Hastaların açlık kan şekeri, üre SGOT, SGPT, Hemogram (12 saatlik açlık süresini takiben, 10 ml venöz kan örnekleme yapılarak) ölçümleri yapıldı ve anestezi doktoru tarafından konsülte edildi.

3.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimulasyon Protokolü

Hastaların yaşı, klinik profili, over rezervi ve daha önceki stimülasyon rejimlerine verdiği cevap gözönünde bulundurularak, GnRH analogları (agonist protokol) veya GnRH antagonistleri (antagonist protokol) uygulandı.

3.1.1. Agonist Protokolü

22 hastaya pituitar desensitizasyonu için önceki siklusun luteal fazında - 21.gün- subkutan 0,5 mg/gün leuprolide asetat (Lucrin; Abbott, Fransa) veya triptorelin asetat içeren Decapeptyl 0.1 mg başlandı. Over baskılanması için serum

E2 konsantrasyonu <50 pg/ml ve overde >10 mm folikül olmaması kriterleri kullanıldı. Menstrual kanamanın 3. günü gonadotropin ile stimulyasyon başlandı ve aynı gün agonist dozu yarıya indirilerek hCG gününe kadar devam edildi.

Siklusun 3. günü ovaryan foliküler aktivite transvaginal ultrasonografi ile değerlendirildi ve 10 mm'den büyük folikül kisti saptanmayan olgulara gonadotropin stimulyasyonu başlandı. Stimulyasyonda r-FSH [(Puregon; Organon, Hollanda) ya da (Gonal-F; Serono, italya)] ve/veya u-FSH (Menogon, Er-Kim, Türkiye)(6 hasta) kullanıldı. Hastanın yaşına, over rezervine ve daha önceki stimulyasyon rejimine olan cevabına göre başlangıç dozu belirlendi ve transvaginal ultrasonografi ile takip edilen ovaryan folikül cevabına göre dozu değiştirildi. Kullanılan toplam gonadotropin dozu kaydedildi.

3.1.2. Antagonist Protokolü

23 hastaya siklusun 3. Günü başlanan r-FSH [(Puregon; Organon, Hollanda) ya da (Gonal-F; Serono, italya)] ve/veya u-FSH (Menogon, Er-Kim, Türkiye)(3 hasta) ile over stimulyasyonu devam ederken, dominant folikül boyutu ≥ 14 mm olarak saptandığında yada E2 >800 pg/ml olduğunda GnRH antagonisti Cetrotrelax flakon (Cetrotide flakon 0.25 mg, Serono, Almanya) 1x1 veya ganirelix içeren Orgalutron enjektör 0.25 mg. s.c başlandı. GnRH antagonisti hCG enjeksiyon gününe dek devam edildi.

Ovaryan folikül gelişimi 1-3 günlük aralıklarla transvaginal ultrasonografi ile takip edildi ve 3 adet 17 mm veya daha büyük çaplı folikül elde edildiğinde foliküler olgunlaşmayı sağlamak amacıyla 5000-10000 IU hCG içeren ovitrelle ampül subcutan veya Pregnyl ampül intramuskuler olarak uygulandı.

Oosit toplama işlemi hCG uygulamasından 35-36 saat sonra gerçekleştirildi. Oosit toplama işlemi sırasında follüküller büyüklüklerine göre 2 grup halinde ayrıldı (14-16 mm ve ≥ 17 mm). Follüküllerden medyum sıvısı kullanılmadan ayrı ayrı follükül sıvısı aspire edildi. Sonrasında 14 mm ve üzerinde olan tüm follüküller aspire edildi. Alınan follükül sıvı örneklerinden oosit embriyolog tarafından ayrıştırıldıktan sonra kalan sıvılar 10 dk 4000 devirde santrifüj edilerek sıvı kan ve diğer elemanlardan temizlendi. Sarı berrak renkte olan sıvılar eppendorf tüplere konularak

– 80 santigrad derecede enzim ölçümlerinin yapılacağı zamana kadar saklandı.

Fertilizasyon ve embriyo kalitesi kliniğimizde çalışan uzman embriyolog tarafından 20.saat, 28,saat, 44.saat ve 68.saatte mikroskopla değerlendirildi.Embriyo kalitesini değerlendirmek için hücre sayısı ve embriyo morfolojisini belirleyen 5 parametre; fragmantasyon derecesi, fragmanların lokasyonu, blastomerlerin birbirine benzerliği, multinukleasyon ve sitoplazmik görünüm, kullanılmaktadır..En yüksek kaliteli embriyo (Grade I) 2. Günde 4-5 hücreli veya 3. Günde 7 ve daha fazla hücreli olmasının yanında eşit büyüklükteki blastomerlerde oluşan fragmantasyonun %20’den az olduğu ,multinukleasyonun olmadığı embriyolar olarak tanımlanmıştır. Toplanan oosit ve transfer edilen embriyo sayısı kaydedildi.

Oosit inseminasyonuna hazırlık amacıyla spermier iki farklı tabakalı yoğunluk (%40-%80) gradient santrifüj sisteminden geçirildikten sonra modifiye insan tubal sıvı medyumunu (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) ile yıkanarak hazırlandı. Oositler petri kabında %7 sentetik serum ilave edilmiş modifiye insan tubal sıvı medyumuyla (Irvine Scientific) 37 °C’de ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Embriyo transferi ICSI standart prosedürü uygulanarak oositlerin toplanmasından 72 saat sonra 8 hücre aşamasında Wallace kateteri (H.G. Wallace Ltd., Colchester, Essex, İngiltere) ile tercihen kaliteli yani grade I olanlarından 1-4 adet uterin kaviteye transfer edilerek gerçekleştirildi.

3.2. Luteal Faz Desteği

Tüm hastalara luteal destek oosit toplanmasından sonraki sabah intravajinal mikronize progesteron 3x200 mg (Progestan yumuşak kapsül, Koçak ilaç, Türkiye) ile sağlandı. Gebelik oluştuğu taktirde vajinal progesteron desteği 8-12. gestasyonel haftaya dek devam edildi.

3.3. YÜT Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Embriyo transferinin 12. gününde kandaki beta-hCG seviyesi ölçüldü. Beta-hCG seviyesi 5 mIU/ml’nin üzerinde olan hastalar gebe olarak kabul edildi. Sonuçlar kaydedildi.

3.4. Ros ve Kalsiyum Ölçümü

Planlanan hasta sayısı tamamlandığında tüm sıvılar önce +4 santigrad derecede ve daha sonra oda ısısında çözdürüldü. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında 4 parametreye bakıldı.

1. Süperoksid dismutaz
2. Glutasyon peroksidaz
3. Malondialdehit
4. Kalsiyum

3.4.1. Deneylede Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi (Scaltec, Prestica), Manyetik karıştırıcı (Nüve), Santrifüj (Nüve, Eppendorf, Hereaus), Soğutmalı santrifüj (Eppendorf), Vorteks (Nüve), İkropipet (Eppendorf, Biohit, Gilson), Serin dondurucu (Uğur, Facis, Snijders scientific), Spektrofotometre (Shimadzu UV 1201,1600), PH -metre (Mettler Toledo), Homojenizatör (IKA Ultra Turrax T25).

3.4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.4.2.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar

- Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)
- CAPS, Sigma (Almanya)
- Iodonitrotetrazolyum violet, Sigma (Almanya)
- Ksantin, Merck (Almanya)
- Ksantin oksidaz, Sigma (Almanya)
- Titripleks III, Merck (Almanya)

3.4.2.2. GSH-Px Tayini İçin Kullanılanlar

- Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)
- Glutasyon redüktaz, Fluka (İsviçre)
- b-NADPH, Sigma (Almanya)
- Glutasyon-redükte, Sigma (Almanya)
- Kümen hidroperoksit, Sigma (Almanya)
- Titripleks III, Merck (Almanya)

3.4.3. SOD Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi Sun ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır.

3.4.3.1. Deneyin Prensibi

SOD çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O_2^-) radikalinin H_2O_2 'ye dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen O_2^- radikallerinin (reaksiyon 1), 2-(4-iyodofenil)-3-4-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolyum klorit (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının (reaksiyon 2), 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak, reaksiyonun% inhibisyonu belirlendi.

(1) Ksantin Ürik asit + O_2^-

(2) INT + O_2^- Formazon boyası

(3) O_2^- + O_2^- + $2H^+$ O_2 + H_2O_2

3.4.3.2. Deneyin Yapılışı

25 ml homojenattan alındı ve % inhibisyonun % 30-60 arasında olması için örnekler dilüe edilmedi. 0.025 ml homojenata, 0.850 ml 0.05 mM ksantin çözeltisi (0.025 mM INT içeren) ve 40 mM'lik CAPS (0.94 mM'lik EDTA içeren) ilave edildi. 0.125 ml ksantin oksidaz (80 U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37

°C’de 30 saniyelik gecikme fazının ardından, havaya karşı başlangıç absorbansı (A1) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A2) okundu. Aynı işlemler köre karşı denemeyle de tekrarlandı.

$$DA(\text{numune})/dk$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - '100$$

$$DA(\text{kör})/dk$$

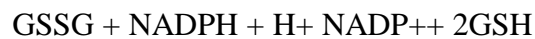
Standart (5.2 U/mL) çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak bulundu. Bu değerler homojenizasyon sırasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpılıp dokunun protein değerine bölünerek U/mgr protein birimi şeklinde sonuçlar verildi.

3.4.4. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi Paglia ve Valentine’nin metoduna dayanmaktadır.

3.4.4.1. Deneyin Prensibi

Deneyin Prensibi: Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksid ile glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP+’ye oksitlenir.



NADPH’nin azalmasına bağlı olarak 340 nm’de meydana gelen absorbans değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı.

3.4.4.2. Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpünde 1 ml; glutasyon (4 mM), glutasyon redüktaz (= 0.5 U/L) ve b-NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20 ml numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40 ml kümen hidroperoksid (0.18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm’deki absorbans değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/mgr protein birimi olarak ifade edildi.

3.4.5. Lipid Peroksidasyonunun (MDA) Tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, Draper ve Hadley'in tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanılarak ölçüldü.

3.4.5.1. Deneyin Prensibi

Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek, 532 nm'de maksimum absorbanı veren renkli bir kompleks oluşturur.

3.4.5.2. Deneyin Yapılışı

0.5 ml serum, üzerine 2.5 ml %10'luk TCA eklenerek karıştırıldı. 15 dakika kaynatılıp soğutuldu. 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml %0.67'lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dakika kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm'de absorbanları, numune yerine distile konularak hazırlanan köre karşı okundu. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış olan stok 1,1,3,3 –tetraetoksipropan (TEP) çözeltilerinin absorbanları kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Numunelerin konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak belirlendi.

Doku örnekleri ise hazırlanan homojenatlardan yukarıdaki prosedüre uygun olarak çalışılıp, nanomol/mg protein olarak ifade edildi.

3.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında student t test; normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Kliniği'ne infertilite nedeniyle başvuran ve İVF tedavisi uygulanan toplam 45 hasta üzerinde yapıldı.

Hastalardan %51,1'i 20-29 yaş arası (n:23), %46,7'si 30-39 yaş arası(n:21) ve %2,2'si 40yaş üzerinde (n:1) idi.

Hastalar infertilite nedenlerine göre sınıflandırıldığında; hastaların %8,9'unda (n:4) erkek faktörü, %15,6'ında (n:7) kadın faktörü ve %75,6'ında (n:34) açıklanamayan infertilite vardı.

Agonist grupta 20 hastaya (%86) leoprolid asetat ,3 hastaya (%14) Triptorelin asetat tedavisi verildi.

Antagonist grupta 18 hastaya (%81) cetrotorelix tedavisi ve 4 hastaya (%19) ganirelix tedavisi verildi.

Toplamda 23 hastaya (%51) follitropin A ve 22 hastaya (%49)follitropin B tedavisi verildi.9 Hastaya Menotropin tedaviye eklendi.36 hastaya menotropin verilmedi

.Agonist grupta 13 hastaya (%56) follitropin B ve 10 hastaya (%44) follitropin A tedavisi verildi.Agonist grupta 6 hastaya menotropin tedavisi de verildi.

Antagonist grupta 13 hastaya (%60)follitropin A ve 9 hastaya (%40) follitropin B tedavisi verildi .3 hastaya menotropin tedavisi de eklendi.

Hastaların %4,4'ünde (n:2) 1-3, %37,8'inde (n:17) 4-7, %37,8'inde (n:17) 8-9 ve %20,0'sinde (n:9) 10 ve üzeri kaliteli oosit elde edildi.

Hastaların %17,8'inde (n:8) 1-2, %20,0'sinde (n:9) 3-4, %37,8'inde (n:17) 5-6 ve %24,4'ünde (n:11) 7 ve üzerinde kaliteli embriyo (Grade I) elde edildi.

Hastaların 12'sine (%26,7) 1, 7'sine (%15,6) 2, 17'sine (%37,8) 3 ve 9'una (%20,0) 4 kaliteli (Grade I) embriyo transfer edildi.

Hastaların %73,3'ünde (n:33) gebelik sonucu negatif, %26,7'sinde (n:12) sonuç pozitif geldi.

Her hastadan 14-16 mm ve ≥ 17 mm olan iki ayrı follikülden sıvı toplandı ve toplam 90 follikül sıvısı değerlendirildi.

Agonist grupta toplam 23 adet (%51,1) 14-16 mm follikül, antagonist grupta toplam 22 adet (% 48,9) 14-16mm follikül aspire edildi.

Agonist grupta toplam %48,9 (n:22) ≥ 17 mm follikül, antagonist grupta toplam 23 adet (% 51,1) ≥ 17 mm follikül aspire edildi.

90 follikülün ortalama SOD değeri $0,60 \pm 5,73$ (en düşük 0,13, en yüksek 2,94)

90 follikülün ortalama GSH-Px değeri $0,39 \pm 0,30$ (en düşük 0,03, en yüksek 2,14)

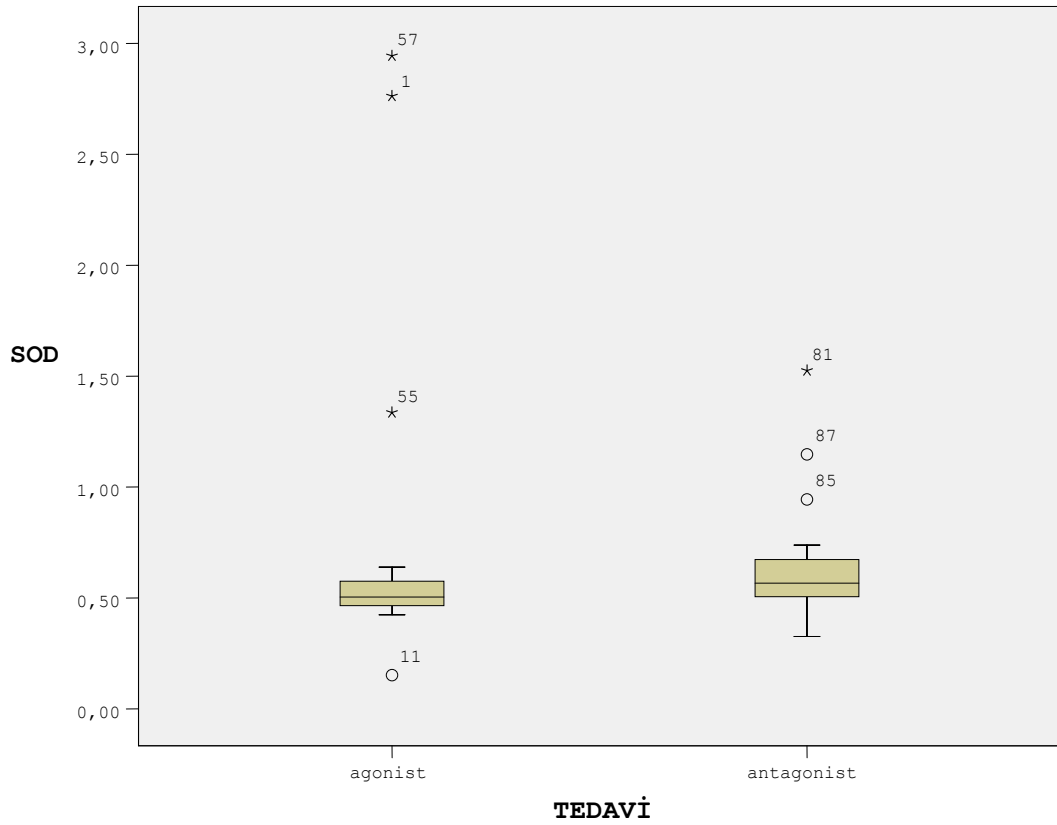
90 follikülün ortalama MDA değeri $0,05 \pm 0,04$ (en düşük 0,01, en yüksek 0,27)

90 follikülün ortalama kalsiyum değeri $9,16 \pm 1,81$ (en düşük 6,92, en yüksek 18,57) olarak ölçüldü.

Tedavi gruplarına göre değerlendirildiğinde;

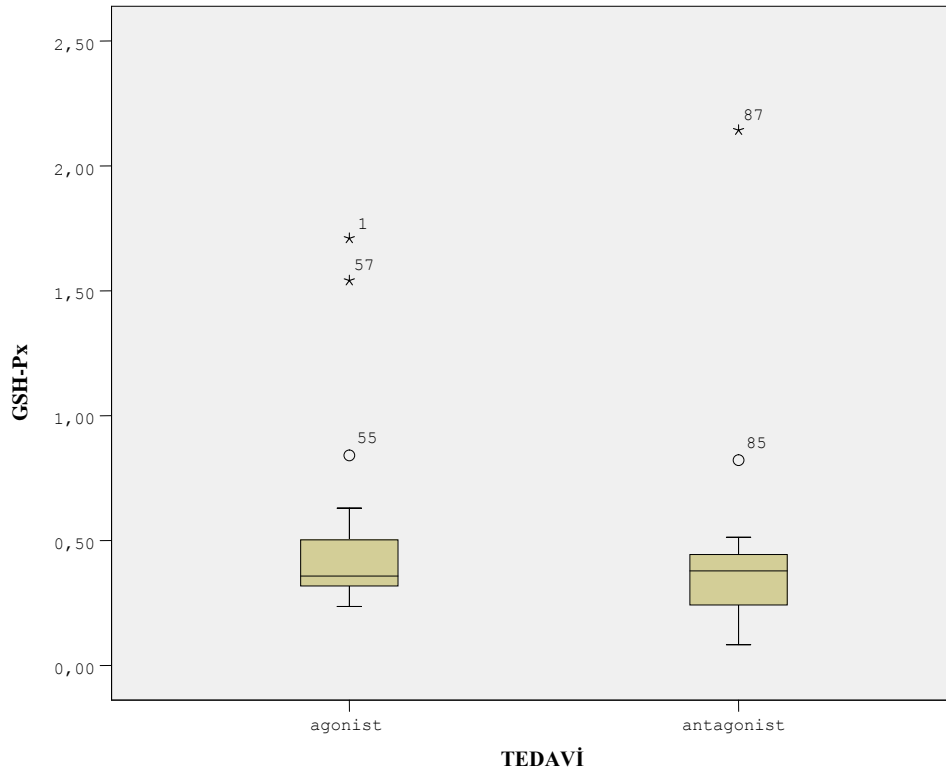
Agonist gruptaki hastaların yaş ortalaması ($30,65 \pm 4,48$), antagonist gruptaki hastaların yaş ortalaması ($29,09 \pm 4,63$) arasında anlamlı bir farklılık yoktu (p:0,258).

Agonist gruptaki hastaların ortalama SOD değeri $0,62 \pm 0,51$ ile antagonist gruptaki hastaların ortalama SOD değeri $0,58 \pm 0,20$ arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p:0,585$). (Grafik 1)



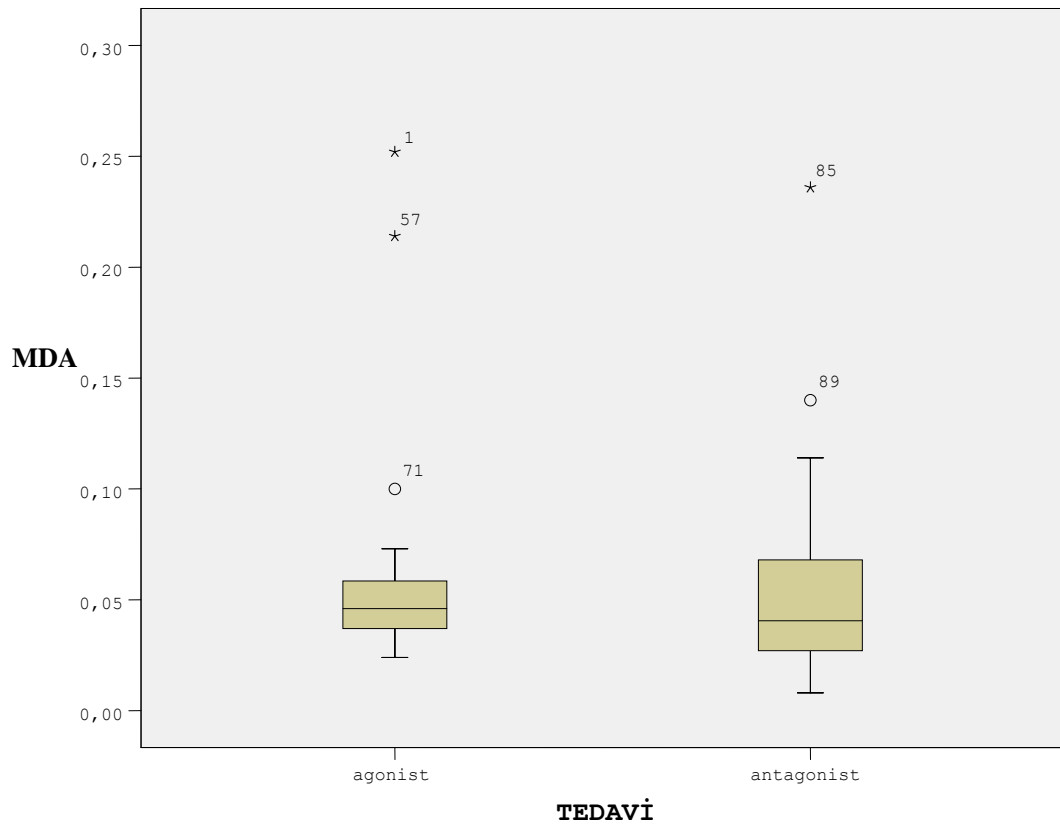
Grafik 1. Agonist ve antagonist grupların follikül sınırlarının SOD değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması

Agonist gruptaki hastaların ortalama GSH-Px değeri ($0,41 \pm 0,30$) ile antagonist gruptaki hastaların ortalama GSH-Px değeri ($0,36 \pm 0,29$) arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p:0,442$). (Grafik 2)



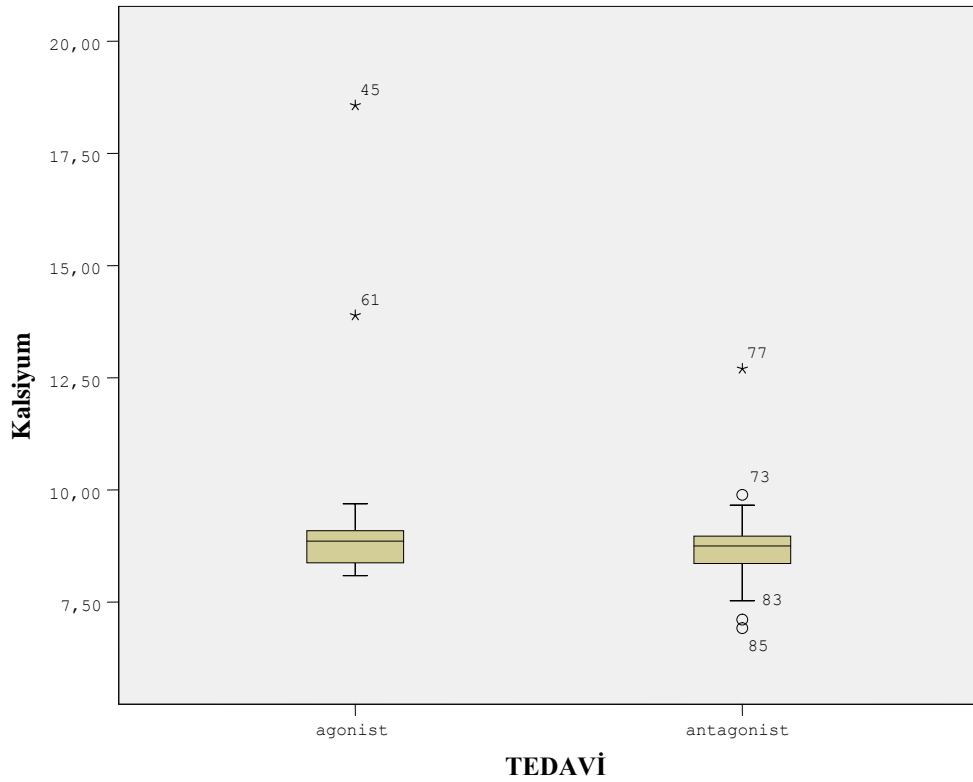
Grafik 2. Agonist ve antagonist grupların follikül sıvılarının GSH-Px değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması

Agonist gruptaki hastaların ortalama MDA değeri ($0,05 \pm 0,05$) ile antagonist gruptaki hastaların ortalama MDA değeri ($0,04 \pm 0,04$) arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p:0,295$). (Grafik 3)



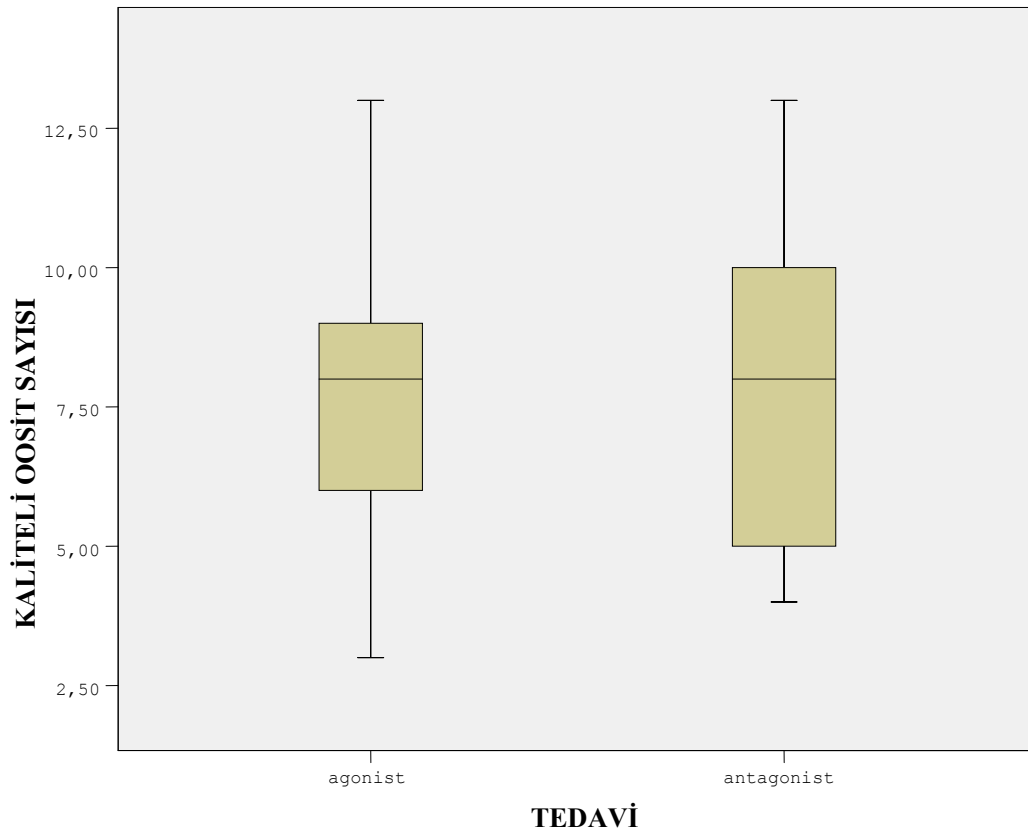
Grafik 3. Agonist ve antagonist grupların follikül sınırlarının MDA değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması

Agonist gruptaki hastaların ortalama kalsiyum değeri ($0,9,30 \pm 1,92$) ile antagonist gruptaki hastaların ortalama kalsiyum değeri ($9,02 \pm 1,69$) arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p:0,457$). (Grafik 4)



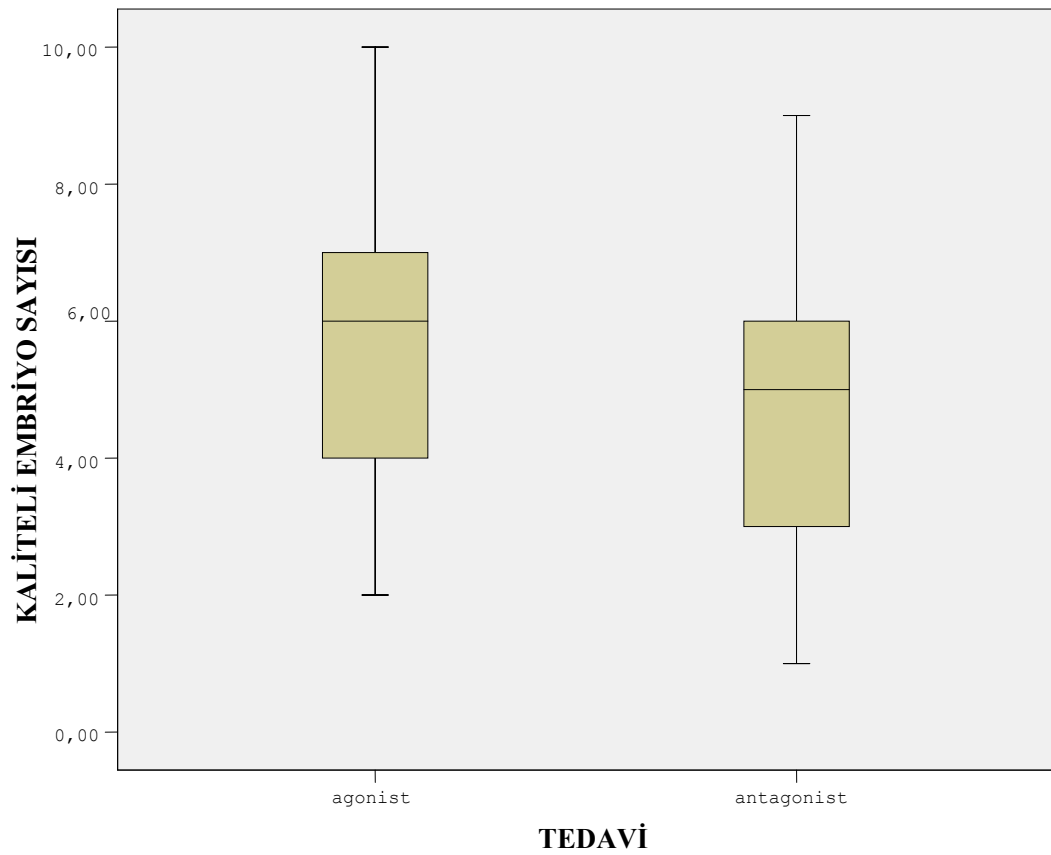
Grafik 4. Agonist ve antagonist grupların follikül sıvılarının kalsiyum değeri sonuçlarına göre karşılaştırılması

Agonist gruptaki hastalardan elde edilen kaliteli oosit sayısı ortalaması ($7,73 \pm 2,61$) ile antagonist gruptaki hastalardan elde edilen kaliteli oosit sayısı ortalaması ($8,04 \pm 2,86$) arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. ($p:0,710$). (Grafik 5)



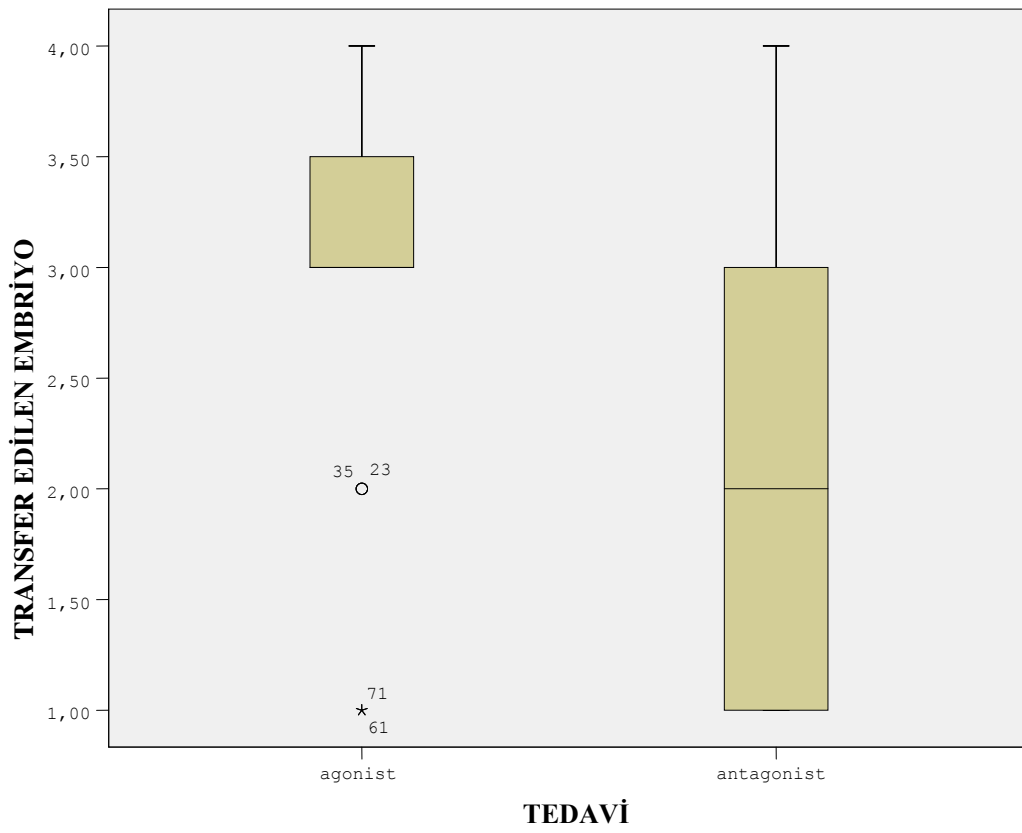
Grafik 5. Agonist ve antagonist grupların elde edilen kaliteli oosit sayısına göre karşılaştırılması

Agonist gruptaki hastalardan elde edilen kaliteli embriyo sayısı ortalaması ($5,56 \pm 2,27$) ile antagonist gruptaki hastalardan elde edilen kaliteli embriyo sayısı ortalaması ($4,90 \pm 2,58$) arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p:0,371$). (Grafik 6)



Grafik 6. Agonist ve antagonist grupların elde edilen kaliteli embriyo sayısına göre karşılaştırılması

Agonist gruptaki hastalara transfer edilen kaliteli embriyo sayısı ortalaması ($2,97 \pm 0,86$) ile antagonist gruptaki hastalara transfer edilen kaliteli embriyo sayısı ortalaması ($2,04 \pm 1,10$) arasındaki fark anlamlı bulundu ($p:0,000$) .(Grafik 7)



Grafik 7. Agonist ve antagonist grupların transfer edilen embriyo sayısına göre karşılaştırılması

Agonist grupta 15 (%43,9), antagonist grupta 18 (%56,1) hastada gebelik sonucu negatif ve agonist grupta 8 (%66,7), antagonist grupta 4 (%33,3) hastada gebelik sonucu pozitif olarak tespit edildi. Aradaki fark anlamlı bulunmadı.(p:0,094). (Tablo 3)

Tablo 2. Agonist ve antagonist tedavi grubunun yaş, follikül ROS, Kalsiyum değerleri ve sonuçlar açısından karşılaştırılması

	Tedavi protokolü		p
	Agonist Ort±SD	Antagonist Ort±SD	
Yaş	30,65±4,48	29,09±4,63	0,258
SOD (U/mgprotein)	0,62±0,51	0,58±1,89	0,585
GSH-Px (U/mgprotein)	0,41±0,030	0,36±0,29	0,442
MDA(nmol/mgprotein)	0,05±0,05	0,04±0,04	0,295
Kalsiyum (mg/dl)	9,30 ± 1,92	9,02 ± 1,69	0,457
Toplanan kaliteli oosit sayısı	7,73±2,61	8,04±2,86	0,710
Kaliteli Embriyo sayısı	5,56±2,27	4,90±2,58	0,371
Transfer edilen embriyo sayısı	2,97±0,86	2,04±1,10	0,000

Tablo 3. Agonist ve antagonist tedavi gruplarının infertilite sebepleri ve sonuçlar açısından karşılaştırılması

		GnRH protokolü		p
		Agonist Sayı± %	Antagonist Sayı±%	
İnfertilite sebebi	Male faktör	0 (%0,00)	4 (%100)	
	Kadın faktörü	2 (%28,6)	5(%71,4)	
	Açıklanamayan	21 (%61,8)	13(%38,2)	
HCG (+) gebelik	HCG (+)	8 (%66,7)	4 (%33,3)	0,094
	HCG (-)	15 (%43,9)	18 (%56,1)	

Tüm hastalarda 14-16 mm ve ≥ 17 mm follüküller ROS ve kalsiyum miktarlarına göre karşılaştırıldığında MDA, kalsiyum değerleri her iki grupta benzer bulundu. SOD ve GSH-Px miktarı ≥ 17 mm follüküllerde daha düşük bulundu ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p:0,012$). (Tablo 4).

Tablo 4. Tüm hastaların follükül büyüklüklerine göre ROS ve Kalsiyum değerleri

	Follüküller		<i>p</i>
	14-16 mm Ort \pm SD	≥ 17 mm Ort \pm SD	
SOD (U/mg protein)	0,68 \pm 0,52	0,52 \pm 0,33	0,043
GSH-Px(U/mg protein)	0,46 \pm 0,39	0,31 \pm 0,13	0,012
MDA (nmol/mgprotein)	0,61 \pm 0,53	0,46 \pm 0,06	0,167
Kalsiyum (mg/dl)	9,09 \pm 1,83	9,23 \pm 1,80	0,718

Agonist grupta 14-16 mm follüküller ile ≥ 17 follüküller ROS ve kalsiyum değerleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. (Tablo 5).

Tablo 5. Agonist tedavi grubunun follükül büyüklüklerine göre ROS ve Kalsiyum değerleri

	Follüküller		<i>p</i>
	14-16mm Ort \pm SD	≥ 17 mm Ort \pm SD	
SOD (U/mg protein)	0,73 \pm 0,69	0,52 \pm 0,16	0,180
GSH-Px (U/mg protein)	0,50 \pm 0,38	0,32 \pm 0,18	0,052
MDA (nmol/mg protein)	0,64 \pm 0,56	0,55 \pm 0,50	0,591
Kalsiyum (mg/dl)	9,39 \pm 2,30	9,21 \pm 1,48	0,758

Antagonist grupta 14-16 mm follüküller ile ≥ 17 follüküller ROS ve kalsiyum değerleri açısından karşılaştırıldığında büyük follüküllerde SOD değeri daha düşük bulundu. Fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.(Tablo 6).

Tablo 6. Antagonist tedavi grubunun follükül büyüklüklerine göre ROS ve Kalsiyum değerleri

	Follüküller		<i>p</i>
	14-16mm Ort±SD	≥ 17 mm Ort±SD	
SOD (U/mg protein)	0,64±0,26	0,52±0,10	0,043
GSH-Px (U/mg protein)	0,43±0,41	0,30±0,03	0,125
MDA (nmol/mg protein)	0,58±0,51	0,04±0,03	0,137
Kalsiyum (mg/dl)	8,78±1,22	9,25±2,10	0,358

Agonist ve antagonist tedavi grubunun 14-16 mm follükülleri ROS ve Kalsiyum değerleri karşılaştırıldı ve istatikselsel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. (Tablo 7).

Tablo 7. Agonist ve antagonist tedavi grubunun 14-16 mm follüküllerinin ROS ve Kalsiyum değerlerine göre karşılaştırılması

	14-16 mm Follüküller		<i>p</i>
	Agonist Ort±SD	Antagonist Ort±SD	
SOD (U/mg protein)	0,73±0,69	0,64±0,26	0,590
GSH-Px (U/mg protein)	0,50±0,38	0,43±0,41	0,570
MDA (nmol/mg protein)	0,06±0,05	0,05±0,05	0,740
Kalsiyum (mg/dl)	9,39±2,30	8,78±1,12	0,260

Agonist ve antagonist tedavi grubunun ≥ 17 follikülleri ROS ve kalsiyum değerleri açısından karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. (Tablo 8).

Tablo 8. Agonist ve antagonist tedavi grubunun ≥ 17 folliküllerinin ROS ve Kalsiyum değerlerine göre karşılaştırılması

	≥ 17 mm Folliküller		<i>p</i>
	Agonist Ort\pmSD	Antagonist Ort\pmSD	
SOD (U/mg protein)	0,52 \pm 0,15	0,52 \pm 0,10	0,980
GSH-Px (U/mg protein)	0,32 \pm 0,17	0,29 \pm 0,08	0,540
MDA (nmol/mg protein)	0,05 \pm 0,05	0,03 \pm 0,03	0,210
Kalsiyum (mg/dl)	9,21 \pm 1,48	9,25 \pm 2,10	0,940

5. TARTIŞMA

Birçok merkezde yapılan folliküler sıvı oksidatif stres araştırmalarında hastalara agonist tedavi protokolü uygulanmıştır. Antagonist tedavi verilen hastalarda bu konuda araştırma bulunmamaktadır. Yine agonist ve antagonist tedavilerini oosit,embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları açısından karşılaştıran birçok çalışma mevcuttur.Fakat her iki tedavi grubunu oksidatif stres ve sonuçlara olan etkisi açısından karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Bizim bu çalışmayı yapma amacımız agonist ve antagonist tedavi rejimi verilen iki hasta grubunda , oksidatif stres markırlarını ve kalsiyum miktarlarını ve bunun sonuçlara olan etkisini araştırmak, her iki tedavi grubunu oosit ,embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları açısından ile karşılaştırmaktır.

GnRH antagonistlerinin kullanımının avantajları, onları IVF için önemli konuma getirmiştir. Ancak GnRH antagonistlerin over stimulasyonunda geniş kabul görmesi için, gebelik oranının en azından GnRH agonistleri ile ulaşılan oranlara eşit olması gerekir. Bu sebeple yakın geçmişte birçok randomize kontrollü çalışmalar yapılmış ve birbiri ile çelişen sonuçlu 3 metaanaliz yayımlanmıştır.

Ludwig ve ekibi tarafından yapılan 1.metaanaliz sonucunda, klinik gebelik oranı ve süregelen gebelik oranında, tedavi etme amacı ile kullanıldığında iki analog arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır (69). Bu metaanaliz hakkında, altı randomize kontrollü çalışmaları inceleyen retrospektif bir çalışma olması eleştirisi getirilebilir.

Kronolojik olarak ikinci metaanaliz Cochrane Kütüphanesi tarafından yayımlanmıştır ve gerçek randomizasyon içeren beş randomize kontrollü çalışma içermektedir. Ana sonuç ölçümü klinik gebelik oranı olan bu çalışma sonucu, GnRH antagonist kullanıldığında, GnRH agoniste kıyasla belirgin ölçüde dah az klinik gebelik oranına rastlanmıştır (70).

Üçüncü meta analiz ise on dört randomize kontrollü çalışma ve konferanslarda sunulan randomize kontrollü çalışmaların abstractlarını içermektedir (71).Tedavi etme amacı ile kullanıldığında iki analog arasında klinik gebelik oranında bir fark bulunmamıştır. Bu metaanaliz ile Al-Inany ve Aboulgar (70)

metaanalizi arasındaki fark, Daya'nın daha geniş bir örnekleme yapması (71) olabilir.

En güncel metaanaliz 2006'da basılmıştır (72) ve yirmiiki randomize kontrollü çalışmayı içermektedir. Bu metaanaliz sonuç ölçümü olarak canlı doğum oranını seçmiştir ve iki GnRH analogu arasında istatistiki bir fark bulmamıştır. Agonist uzun protokolü ile antagonist multiple doz esnek rejiminin karşılaştırıldığı Lautradis ve arkadaşlarının 2004 yılındaki çalışmasında ise, gebelik oranları açısından antagonist lehine fark oluşmamıştır (%24,1 e karşı %18,5) (73). Toplanan total oosit sayısı ve kaliteli oosit sayısı, ortalama embriyo transfer sayısını ve gebelik oranlarını indirekt olarak etkilediği düşünülmektedir (73). Çalışmaların çoğunda gruplar arasında total oosit sayısı açısından fark izlenmezken (73,74), Ludwig'in metaanalizinde antagonist grubunda 2,6 oosit daha az oosit toplandığı belirtilmektedir ($p<0,05$) (69). Yine Albano ve arkadaşlarının çok merkezli çalışmasında da antagonist grubunda anlamlı düzeyde az sayıda oosit elde edildiği görülmüştür (6'ya karşı 4,1) (75).

Oral kontraseptif ön-tedavili esnek GnRH antagonist protokolleri ile uzun GnRH agonist protokollerini karşılaştıran çalışmaların çoğu, erişilen oosit sayısı ve gebelik oranları bakımından agonistlerin lehine sonuç vermiştir. Uzun GnRH agonist protokolü, hCG günündeki follikül sayısı ve erişilen oosit sayısı bakımından esnek başlangıçlı antagonist protokollerine göre avantajlıdır (76,77,78).

Daha fazla sayıda kaliteli oosit varlığı ile daha yüksek kalitede embriyoların oluşma şansının da artacağı beklenmektedir. Gebelik oranını etkileyebilecek parametreler olan total oosit sayısı ve folikül sayıları açısından antagonist grubu dezavantajlı görülmektedir. Bu durum oluşan embriyo sayısı ve embriyo transfer sayısını etkilemektedir.

Antagonist tedavi rejimi ile KOH uygulanan IVF hastalarında bazı çalışmalarda belirtildiği gibi elde edilen kaliteli oosit sayısının az olmasının, bu hastaların folliküler sıvısında bulunan oksidatif stresin daha fazla olması ile ilişkili olabileceği görüşü bizim çalışmamızın ana temasını oluşturdu.

Oksidatif stresin reproduktif sisteme olan etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmaların tümünde hastalara agonist tedavi protokolü

uygulanmıştır. Serbest radikaller ve oksidatif stres, infertilite, abort, mol hidatiform, fetal embriyopati, İUGR ve preeklampsi gibi gebelik komplikasyonlarında ve üreme fonksiyonlarında önemli düzenleyici etkiye sahiptir. İnvivo oksidatif stresi değerlendirmek zordur. Oksidatif stresin minimum tolere edilebilecek konsantrasyonları ve fizyolojik ROS seviyeleri üreme yollarında gereklidir.

Ashok Agarwall ve Shyam SR Allamaneni 2004 yılında yaptıkları bir makale derlemesinde şu sonuçları bulmuşlardır:

-Oksidatif stres ovaryan folliküllere zarar verir.

- Peritoneal sıvıdaki oksidatif stres oosit ve spermatozoa zarar verir.

-Fallop tüplerindeki oksidatif stres embriyoya zarar verir.

-ROS ve oksidatif stres dengesizliği embriyonun yerleşeceği endometriuma zarar verir.

- ROS ve oksidatif stres dengesizliği luteal faz yetmezliğine neden olur ve luteal hormon replasmanı gebeliğin devamı için gereklidir (79).

Bu yüzden kanıtların çoğu, in vitro şartlarda artmış O2 konsantrasyonlarının erken gelişimi bozabileceği gerçeğini işaret etmektedir. Bu verilerin in vivo gelişim ve patolojik düzensizlikler için önemi daha belirsizdir. Bu in vitro embriyoların, daha düşük viabiliteye sahip olmalarına neden olan, kültür ortamının antioksidan savunmalarını daha hızlı tüketmeleri morfolojik olarak gösterilmiştir ve bu da artmış ROS konsantrasyonlarına yol açtıklarını düşündürmektedir (80).

Overlerdeki gametlerde enerji gereksinimi için aerobik metabolizma ile oksijen kullanılır ve serbest radikaller bu olayda önemli fizyolojik rol oynarlar. ROS'nin folikül sıvısı, folikülogenezis ve steroidogenezisdeki etkisini gösteren birçok çalışma mevcuttur (81,82,83).

Foliküler sıvı mikroçevresi ve oksidatif stres durumu, oosit kalitesini fertilitte sonuçlarının ve ICSI başarısını etkiler (84).

Özellikle ICSI sikluslarında birinci günde ROS seviyesinin azaltılması

embriyo kalitesinin etkiler. ROS'un minimal seviyesi folikülde metabolik aktivite için esansiyeldir. ICSI'de kültür mediyadaki yüksek oosit ROS seviyesi düşük blastokist gelişimi, zayıf fertilizasyon ve bölünme oranı, yüksek embriyonik fragmentasyon ile koreledir (85).

Oksidatif stres, hücre membran hasarı, DNA hasarı ve apoptozisi indükleyerek embriyo gelişimde ve büyümesinde defekte ve retardasyona neden olur (86,59).Apoptozis fragmanite embriyoya neden olur ve potansiyel implantasyonu sınırlar. Bu durum kötü fertilizasyon sonuçlarına neden olur (87,88).Fertilize olmayan ICSI hastalarında DNA fragmentasyon oranı daha yüksektir. Düşük ROS seviyesinin ART başarısını artırabileceği, fazla olmasının ART'de kötü sonuçlara yol açabileceği literatürlerde bilimsel kanıtlarla sunulmuştur.

Ek olarak ART'de invitro blastokist oluşumu sırasında antioksidanlar blastokist gelişimini artırabilir. Oksidatif stresin artması kötü fertilizasyon, defektif embriyo gelişimi ve gebelik kayıplarının oranında artışa neden olabilir (89,90). İnvivo olarak dölleme ve embriyo gelişimi düşük oksijen gerilimi ortamında olur. Kültür sırasında düşük oksijen gerilimi implantasyon ve gebelik oranını artırır (91). Benzer olarak implantasyon ve klinik gebelik oranları antioksidan destek verilen ART sikluslarında standart antioksidansız ortamlardan daha iyidir.

Bizim çalışmamızda İVF programına alınan hastalar agonist ve antagonist tedavi verilen iki grup olarak sınıflandırıldı. Her iki tedavi grubundaki hastalar yaş ve infertilite nedeni açısından benzerdi.

Önce tedavi protokolüne göre ayrılmadan tüm folliküler sıvılar (Toplam 90 follikül), ROS ve kalsiyum açısından değerlendirildi. Tüm folliküllerin ROS ve kalsiyum değerleri benzer bulundu. Paszkowski ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, İVF hastalarından açıklanamayan infertilite nedeni hastaların follikül sıvısında selenyum bağımlı GSH-Px oranlarını tubal ve erkek faktörlü infertil hastalara göre daha düşük bulmuşlar ve yine bu çalışmada fertilize olan oositin bulunduğu follikül sıvısında GSH-Px miktarını gebelik oluşmayanlara göre yüksek bulmuşlardır (62). Yine Bedaiwy ve arkadaşları Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S transferaz seviyesini fertilize olamayan İVF hastalarının oosit follikül sıvısında önemli oranda az bulmuşlardır (85).

Çalışmamızda daha sonra tüm folliküler sıvılar tedavi protokolüne bakılmaksızın çaplarına göre iki gruba ayrılarak değerlendirildi. ROS ve kalsiyum açısından karşılaştırıldı. MDA ve Kalsiyum değerleri 14-16 mm ve ≥ 17 folliküllerde benzer bulundu. Fakat SOD ve GSH-Px değerleri büyük folliküllerde daha düşük bulundu ve bu istatikselsel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$).

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında her iki tedavi grubu follikül büyüklüklerine göre ROS ve Kalsiyum değerleri açısından karşılaştırıldı. Agonist protokol tedavi verilen grupta SOD, GSH-Px, MDA, Ca değerleri küçük ve büyük folliküllerde benzer bulundu. Follikül çaplarına göre yapılan az sayıda araştırma mevcuttur. Bunlardan Sugino ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada agonist protokol verilen hastaların follikülleri büyük (18 mm), orta (12-15), küçük (10mm ve altı) olarak kategorize edilmiş ve follikül sıvıları hücre apoptozisi ve sıvı nitrit-nitrat düzeyi açısından karşılaştırılmış. Nükleer fragmantasyonlu apoptotik hücreler küçük folliküllerde daha yüksek bulunmuş. Nitrit-nitrat konsantrasyonu açısından folliküller arasında farklılık saptanmamış (92).

Çalışmamızda antagonist tedavi grubunda GSH-Px, MDA, Ca değerleri küçük ve büyük folliküllerde benzer bulunurken ,SOD değeri ≥ 17 folliküllerde daha düşük bulundu. Sabatini ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada SOD aktivitesi düşük oositlerde fertilizasyon oranları daha düşük bulunmuş (61). Fakat yine Sabatini ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada fertilize oosit follikül sıvılarındaki SOD değeri fertilize olmayanlara göre daha düşük seviyede bulunmuş. Bu farklılık metod farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Birinci çalışmada TAC, 2. Çalışmada sadece SOD çalışılmış. Büyük folliküllerdeki SOD aktivitesinin düşük olması istenen bir sonuçtur ve bu folliküllerden elde edilen oositlerin fertilizasyon oranlarının yüksek oluşu ile ilişkilendirilebilir. Fakat bu konuda antagonist tedavi ile yapılan daha fazla çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda agonist ve antagonist tedavi grubunun 14-16 mm folliküllerinin ROS ve kalsiyum değerleri karşılaştırıldığında her iki grubun sonuçları benzer bulundu. Yine iki tedavi grubunun ≥ 17 folliküllerinde de ROS ve kalsiyum değerleri arasında istatikselsel olarak bir farklılık saptanmadı. Sonuç olarak her iki tedavi grubunda, küçük ve büyük folliküllerde ROS ve kalsiyum değerleri

benzer bulundu.

Çalışmamızda her iki tedavi grubu oosit kalitesi açısından karşılaştırıldı. Oosit kalitesi açısından agonist ve antagonist tedavi grubu benzer bulundu.

Embriyo kalitesini iki grup arasında karşılaştırdığımızda yine agonist ve antagonist tedavi grubu benzer bulundu.

Bizim çalışmamızda agonist protokol uygulanan hastaların follikül sıvı ROS seviyesi ile oosit, embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları arasında pozitif bir korelasyon saptanmadı. Jozwik ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da, bizim çalışmamıza benzer olarak, agonist protokol uygulanan İVF hastalarının folliküler sıvı ROS seviyeleri ile oosit, embriyo kalitesi ve gebelik oranları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamış (93).

Oysa başka bir çalışmada agonist protokol verilen ICSI uygulanan hastaların follikül sıvı MDA oranları ve gebelik oranları arasında pozitif korelasyon bulunmuş. Fakat follikül MDA yüksek olan hastalarda oosit, embriyo kalitesi yönünden pozitif korelasyon saptanmamış (94). Oyawoye ve arkadaşlarının agonist tedavi verilen hastalarda yaptığı başka bir çalışmada folliküler sıvı düşük antioksidan kapasitenin fertilizasyon potansiyelini düşürdüğü ve transfer sırasında embriyo canlılığını azalttığı bulunmuş (95).

Yine Paszkowski ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada uzun agonist protokol uygulanan hastaların follikül sıvılarında TAC bakılmış ve bunun embriyo kalitesi ile ilişkisi araştırılmış. Düşük kaliteli embriyo oluşarlarda kaliteli olanlara göre TAC seviyesi daha düşük bulunmuş (80).

Çalışmamızda transfer edilen embriyo açısından iki grubu karşılaştırdık. Antagonist grupta transfer edilen embriyo sayısının agonist gruba göre daha düşük olduğu tespit ettik ve istatikselsel olarak anlamlı fark saptadık. Biz bu farkı Mart 2010 tarihinde uygulanmaya başlayan yasa gereği 35 yaş altı hastalara tek embriyo 35 yaş üstü hastalara 2 embriyo transfer edilme zorunluluğunun neden olduğunu düşünüyoruz. Çünkü çalışmamızın başlarında daha çok agonist tedavi rejimi uyguladığımızı ve genelde hastalara 1-3 embriyo transfer edildiğini, yasa çıktıktan sonra yapılan tedavilerde çoğunlukla antagonist rejimin uygulandığını ve çoğunlukla 1 embriyo transfer edildiğini tespit ettik. Aslında bu araştırmada hastalara

uygulanacak tedavi protokolünü seçerken hastaların daha önceki tedavi öyküsü ve tedaviye verdikleri yanıtları ve over rezervlerini göz önünde bulundurduk. Böyle bir yasa çıkması ve embriyo transfer sayılarının sınırlandırılması bizim beklemediğimiz bir durumdu ve antagonist tedavinin daha çok bu tarihten sonra uygulanması sonuçlarımızı etkiledi.

Çalışmamızda gebelik sonuçları açısından iki grup karşılaştırıldığında her iki tedavi grubunda da gebelik oranları benzer bulundu. Fakat Attaran ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada olduğu gibi yapılan birçok çalışmada ivf uygulanan hastaların follikül sıvılarındaki ROS seviyeleri ile gebelik oranları arasında pozitif korelasyon saptanmış ve daha yüksek bulunmuştur (96).

Bizim çalışmamızda iki grupta ROS miktarları benzer bulundu ve başlangıçta düşündüğümüz gibi antagonist grupta ROS miktarının agonist gruba göre daha fazla olmadığını gördük.

Sonuç olarak araştırmaya başlarken antagonist tedavi grubundaki hastalarda oksidatif stresin daha fazla miktarlarda olabileceğini ve bunun oosit, embriyo kalitesi ve gebelik sonuçlarını negatif yönde etkileyebileceğini düşünmüştük. Fakat beklediğimiz gibi tedavi grupları arasında follikül sıvı oksidatif stres parametreleri ve oosit kalitesi, embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Yine bu çalışmamızda her iki tedavi grubunun sonuçları follikül büyüklükleri ve oksidatif stres markırları açısından karşılaştırıldı. Bu amaçla her hastadan iki farklı büyüklükte follikül sıvısı örneklendi ve çalışıldı. Folliküllerdeki ROS ve kalsiyum sonuçları benzer bulundu. Fakat follikül çaplarına göre ROS miktarlarının oosit kalitesi, embriyo kalitesi ve gebelik sonuçlarına olan etkileri hakkında yorum yapamadık. Çünkü Folliküler sıvı substanslarıyla oosit kalitesinin korele edilebilmesi için her bir follikülün ayrı olarak aspire edilmesi çalışma amacı bakımından gereklidir. Ayrılmış tekli follikül aspirasyon işlemi hem hasta hem de hekim için zordur, çünkü artmış vajinal kanama riski ve hasta rahatsızlığıyla birlikte multipl vajinal ponksiyon gerekir. Dahası, oositin her bir spesifik follikülden alındığından emin olabilmek için her follikül ponksiyonundan sonra iğnenin kültür ortamıyla yıkanması gerekir; yıkamanın belirli bir folliküler sıvı substans dilüsyonu elde etmek için standart hacimlerde tamponlanmış solüsyon ile yapılması gerekir. Biz

teknik imkanlarımızın kısıtlı olması nedeniyle ve hastanın aldığı anestezi süresini uzatacağını düşündüğümüz için bu uygulamayı tam olarak yapamadık dolayısıyla hangi follikülden çıkan oositin fertilize olduğu yorumunu da yapamadık .

Sonuç olarak yapılan tüm çalışmalarda amaç, ART sırasındaki oksidatif stresi azaltarak oosit, embriyo kalitesini artırmak ve gebelik sonuçlarını pozitif yönde etkilemektir.

Hem erkek hem de kadın infertilitesinde antioksidan desteğin rolüyle ilgili tartışmalar mevcuttur.Lane ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kriyopreservasyon sırasında askorbat eklenmesinin hidrojen peroksit seviyesini azalttığı ve memeli embriyolarında oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (97). Birçok hastalıkta antioksidan tedavi ve sonuçları modifiye edilmemiştir. Kadın infertilitesindeki antioksidan tedavi ile ilgili raporlar da oldukça azdır.

6. SONUÇ

Düşük ROS seviyesi İVF’de önemli rol oynar. Foliküler sıvı mikroçevresi ve oksidatif stres durumu, oosit kalitesini fertilité sonuçlarının ve ICSI başarısını etkiler. Düşük ROS seviyesinin ART başarısını artırabileceği, fazla olmasının ART’de kötü sonuçlara yol açabileceği literatürlerde bilimsel kanıtlarla sunulmuştur.

Bizim çalışmamızda follikül sıvı ROS miktarı ile oosit, embriyo kalitesi ve gebelik sonucu açısından her iki tedavi grubu arasında önemli bir fark saptanmadı. Fakat şimdiye kadar yapılan oksidatif stres çalışmaları agonist rejimlerle tedavi verilen İVF hastalarını kapsamaktadır. Antagonist tedavi rejimi alan İVF hastalarında da hasta sayısının artırılarak daha geniş çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Yine antioksidan tedavinin ART sikluslarında kullanılarak geniş çaplı araştırmaların yapılmasına, İVF’deki başarı oranlarını artırmak için ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. İnfertilite tedavilerinin yüksek maliyeti nedeniyle özellikle antioksidanların önleyici tedavide kullanılmasına önem verilmelidir ve bu alanda çalışılmalıdır.

ÖZET

ART (Yardımcı Üreme Teknikleri) Sikluslarında Agonist-Antagonist Tedavi Modalitelerinin Folikül Sıvısı Serbest Oksijen Radikalleri ve Kalsiyum Üzerine Etkileri ile Bunun Oosit Kalitesi ve Sonuçlarına Etkisi

İn vitro fertilizasyon / İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF/ICSI) sikluslarında Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH) analoglarının kullanımı, elde edilen oosit- embriyo sayısı ve gebelik oranlarını artırmaktadır. GnRH-antagonistleri ise gonadotropin baskılanmasına yol açarak prematür LH dalgalanmalarını önlemekte ve benzer olumlu etkileri sağlamaktadır. Oositi çevreleyen foliküler sıvının birtakım biyokimyasal özelliklerinin oosit kalitesinin belirlenmesinde ve embriyo gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif strese yol açan aşırı serbest oksijen radikallerinin (ROS) ise, embriyo gelişimini olumsuz etkilediği bilinmektedir. IVF/ICSI sikluslarında GnRH-agonist ve antagonist tedavileri sonrasında foliküler sıvıdaki oksidatif stres ve kalsiyum değerlerine dair veriler kısıtlıdır. Dolayısıyla çalışmamızda, GnRH-agonist ve GnRH-antagonist tedavi protokolü verilen kadınlarda foliküler oksidatif stresin IVF/ICSI sonuçlarına olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza kliniğimiz IVF Ünitesi'nde, 10 aylık dönemde IVF/ICSI programına alınan 45 kadın dahil edildi. Bunların 22'sine agonist, 23'üne antagonist protokol uygulanmıştı. Oosit toplanması sırasında aspire edilen foliküler sıvılarda süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve kalsiyum düzeyleri çalışıldı. Siklus özellikleri ve sonuçları kaydedildi.

Gruplarda oosit kalitesi, embriyo kalitesi ve gebelik oranları benzerdi. Ayrıca, ROS parametreleri ve kalsiyum değerleri de farklılık göstermemekteydi. Ancak, foliküller küçük (14-16 mm) ve büyük (17 mm ve üzeri) olarak sınıflandırıldığında, tedavi protokolünden bağımsız olarak büyük folikül sıvılarında SOD ve GSH-Px değerleri küçük foliküllerdekinden daha düşüktü. Antagonist tedavi alanlarda ise büyük foliküllerdeki SOD ölçümleri daha düşük saptandı.

Sonuç olarak, IVF/ICSI için GnRH-agonist ve antagonist protokolü uygulanan kadınların folikül sıvılarındaki oksidatif stres ile oosit-embriyo kalitesi ve gebelik oranları bağlantılı gözükmemektedir. Antagonist protokol verilenlerde düşük folikül SOD düzeyleri ve bunlarda antioksidan tedavilerin yararına dair daha geniş çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler : Agonisti, Antagonisti, Yardımcı üreme teknikleri, Follikül sıvısı, Oksidatif stres, Kalsiyum

ABSTRACT

The Effects of Agonist-Antagonist Treatment Modalities in Assisted Reproductive Techniques on Follicular Fluid Free Oxygen Radicals and Calcium and Associated Oocyte Quality and Outcomes

Gonadotropin releasing hormone (GnRH)-analogue use in *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) cycles increases yielded oocyte-embryo numbers and pregnancy rates. GnRH-antagonists bear similar positive effects by suppressing gonadotropins and premature luteinizing hormone (LH) peaks. Certain biochemical properties of the follicular fluid around the oocyte are believed to have a role in the determination of oocyte quality and embryo maturation.

Excess reactive oxygen species (ROS) leading to oxidative stress are known to have negative consequences on embryo maturation. Data on oxidative stress and calcium levels in the follicular fluid following GnRH-agonist and antagonist treatments in IVF/ICSI cycles are limited. Therefore, we aimed to compare the effects of follicular oxidative stress on IVF/ICSI outcomes across women undergoing GnRH-agonist and GnRH-antagonist protocols.

Our study included 45 women undergoing IVF/ICSI program in our IVF unit during a 10-month period. Twenty-two and 23 women had received agonist and antagonist protocols, respectively. Superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), and calcium levels in aspirated follicular fluid during oocyte pick-up were determined. Cycle characteristics and outcomes were recorded.

Oocyte and embryo qualities and pregnancy rates were similar in treatment groups. Moreover, ROS parameters and calcium measurements did not significantly differ. However, when follicles were classified as small (14-16 mm) and large (≥ 17 mm), follicular fluid SOD and GSH-Px values were lower in large follicles compared to small ones irrespective of treatment protocol. Large follicle SOD levels in antagonist-treated women were lower.

In conclusion, oxidative stress in the follicular fluid of women undergoing GnRH-agonist or antagonist protocols for IVF/ICSI seem unrelated to oocyte-embryo quality and pregnancy rates. Detailed investigations are warranted concerning low SOD levels in antagonist-treated women and the efficacy of antioxidant therapies in that particular group.

Key Words: Agonist, Antagonist, Assisted reproductive technology, Follicular fluid, Oxidative stress, Calcium

KAYNAKLAR

1. R.N. Clayton and K.J. Catt, Receptor-binding affinity of gonadotropin-releasing hormone analogs: analysis by radioligand-receptor assay, *Endocrinology* 106 (1980), sayfa: 1154–1159.
2. Leon Speroff, Marc A. Fritz, Lippincott Williams. (2005) *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Seventh Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, sayfa: 1215-74.
3. Barbieri RL. Female infertility. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), *Reproductive endocrinology*. Pennsylvania:Elsevier Inc., 5th ed, 2004, sayfa: 633-668.
4. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vdal C, et al. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix). *Human Reproduction* 2001;16(12), sayfa: 2533-2539.
5. Shapiro DB. An overview of GnRH antagonists in infertility treatments. Introduction. *Fertility and Sterility* 2003; 80 Suppl 1, sayfa: 1-7.
6. Leon Speroff, Marc A. Fritz, Lippincott Williams. (2005) *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Seventh Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, sayfa: 1215-74.
7. ASRM/SART Registry. Assisted reproductive technology in the United States: Results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 2000; 72, sayfa: 641.
8. Agarwal A. Nallella KP. Allatianeni SS et al. 2004h Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Human Reproduction* 8. 616-627.
9. M.J. Karten and J.E. Rivier, Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective, *Endocr Rev* 7 (1986), sayfa: 44–66.
10. Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83 (129), sayfa: 4177-4188.
11. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). The European IVF-monitoring programme (EIM), for ESHRE. Assisted reproductive technology in Europe, 1998. Results generated from European Registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2001;16, sayfa: 2459.
12. Li R, Philips DM, Mather JP, Activin promotes ovarian follicle development invitro. *Endocrinology* 1995; 136: 849-856.
13. Granot I, Dekel N. Developmental expression and regulation of the gap junction protein and transcript in rat ovaries. *Mol Reprod Dev* 1997;47:231-239.
14. Granot I, Dekel N. The ovarian gap junction protein connexin 43:regulation by gonadotropins. *TrendsEndocrinol Metab* 2002;13:310-313.
15. Veeck L Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Aca Sci*, 1998, 541:259-274.
16. Kahraman S, Yakın K. Ovülasyon induksiyonu. İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri ve Reprodüktif Endokrinoloji Merkezi, 2000.

17. Pellestor F, Adreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003; sayfa: 195.
18. Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. *Human Reproduction* 2002; 17(9): 2287-2299.
19. Phelps JY, Levine AS, Hickmany TN, et al. Day 4 estradiol levels predict pregnancy success in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Fertility and Sterility* 1998; 69(6): 1015-1019.
20. Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;CD001299 (The Cochrane Collaboration issue 2, Oxford.)
21. Hugues EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 1992; 58, sayfa: 888.
22. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, et al. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 1999;72 (2):240-244.
23. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2002; 8, sayfa: 279.
24. Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmuller-Winzen H, Engel J, Diedrich K, Devroey P. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelein. *European Cetrorelix Study Group. Hum Reprod* 2000; 15, sayfa: 526.
25. Cerdin-Durnerin I, Grange-Dujardin D, Laffy A, et al. Recombinant human LH supplementation during GnRH antagonist administration in IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Human reproduction* 2004;19(9).1979-1984.
26. Felberbaum RF, Albano C, Ludwig M, Riethmuller-Winzen H, Grigat M, Devroey P, Diedrich K. Ovarian stimulation for assisted reproduction with HMG and concomitant midcycle administration of the GnRH antagoist cetrorelix according to the multiple dose protocol: a prospective uncontrolled phase III study. *Hum Reprod* 2000; 15, sayfa:1015.
27. Ludwig M, Felberbaum RF, Albano C, , Riethmuller-Winzen H, Schuler A, Devroey P, Engel W, Diedrich K. Significant reduction of the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) by using LHRH antagonist Cetrorelix (Cetrotide) in controlled ovarian stimulation for assisted reproduction. *Arch Gynecol Obstet* 2000; 264, sayfa: 299
28. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. *Meta-analysis. Arch Gynecol Obstet* 2001;265, sayfa:175.
29. C. Albano, J. Smitz and M. Camus et al., Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation, *Fertil Steril* 67 (1997), sayfa: 917–922.

30. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). The ganirelix dose-finding study group, *Hum Reprod* 13 (1998), sayfa: 3023–3031.
31. Fleicher AC, Gordon AN, Entman SS, Keple D. Transvaginal scanning of endometrium. *J Clin Ultrasound* 1990; 18, sayfa: 337.
32. F. Fischl and J.C. Huber, Obruca a Zeitliche optimierung der kontrollierten hyperstimulation (koh) in kombination mit gnrh-antagonisten und ovulationshemmer in einem ivf-programm, *Journal Für Fertilität Und Reproduktion* 11 (2001), sayfa: 50–51.
33. Forrest TS, Elyoderani MK, Muilenburg MC, Bewtra C, Kalbe WT, Sullivan P. Cyclic endometrial changes: US assesment with histologic correlation. *Radiology* 1988; 167, sayfa: 233.
34. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993 Jul;49(3):481-93.
35. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 1993 Oct;26(5):351-7.
36. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):14S-22S.
37. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim.* 1998;11:336-41.
38. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1987 Jun;79(6):990-7.
39. Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Semin Liver Dis.* 1990 Nov;10(4):279-84.
40. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm.* 1994 Sep;NS34(9):26-35.
41. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları; 1995. p. 3-95.
42. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 1997;60(25):2255-71.
43. Kılınç K. Oksijen toksitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2002;33:110-8.
44. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol.* 1994;233:601-10.
45. Chopineau J, Sommier MF, Sautou V. Evaluation of free radical production in an ischaemia-reperfusion model in the rabbit using a tourniquet. *J Pharm Pharmacol.* 1994 Jun;46(6):519-20.
46. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984 Aug 15;222(1):1-15.
47. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.* 1991;48(4):301-9.

48. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982 Nov;47(5):412-26.
49. Baydas G, Yilmaz O, Celik S, Yasar A, Gursu MF. Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation, and homocysteine levels in rats. *Arch Med Res.* 2002 Nov-Dec;33(6):515-9.
50. Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes.* 1997 Sep;46 Suppl 2:S14-8.
51. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim Dergisi.* 1998;11:342-4671.
52. Kılınç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. *Biyokimya* 1986;11:59-76.
53. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem.* 2002 Feb;2(2):153-65.
54. Fortune JE: Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994, 50:225-232.
55. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A: Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early postpartum. *Theriogenology* 2004, 62:1131-1143.
56. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R: The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997, 12:1047-1055.
57. Blondin P, Coenen K, Sirard MA: The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997, 18:454-460.
58. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK: The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2000, 45(5):314-320.
59. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003, 79:829-843.
60. Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smits J, Eichenlaub-Ritter U: Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod* 2001, 16:737-748.
61. Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG: Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999, 72:1027-1034.
62. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D: Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995, 236:173-180.
63. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD 2000 The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1. 11-21.
64. Duchon MR 2000 Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *Journal of Physiology* 529.1,57-68.
65. Crpompston M 2000 Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *Journal of Physiology* 529.1,11-21.

66. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE 2001 Mitochondrial permeability transition and oxidative stress, *FEBS Letters* 495,12-15.
67. Ferri Kf, Kroemer G 2001 Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* 3,E255-E263.
68. Majino G, Joris I 1995 Apoptosis, oncogenesis and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146,3-15.
69. M. Ludwig, A. Katalinic and K. Diedrich, Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis, *Arch Gynecol Obstet* 265 (2001), sayfa: 175–182.
70. H. Al-Inany and M. Aboulghar, GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review, *Hum Reprod* 17 (2002), sayfa: 874–885.
71. S. Daya, A comparison of clinical pregnancy rates in the efficacy evaluation of GnRH agonist versus antagonist use for assisted reproduction – a meta-analysis using an intention to treat approach, *Gynaecol Endocrinol* 17 (2003) (supplement 1), sayfa: 44.
72. Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC et al. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* .
73. Lautradis et al. A modified gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) antagonist protocol failed to increase clinical pregnancy rates in comparison with the long GnRH protocol. *Fertility and Sterility* 2004; 82(5), sayfa: 1446-1448.
74. Medeiros Garcia Torres M, Donadio N, Donadio NF, et al. Comparison of embryo implantation in Wistar rats that underwent ovarian stimulation using exogenous gonadotropins associated with cetrorelix acetate or leuprolide acetate. *Fertility and Sterility* 2005; 84,suppl 2, October, sayfa: 1235-1240.
75. Albano C, Felferbaum RE, Smits J, et al. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomised phase III European study comparing the luteinising hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. *Human Reproduction* 2000; 15(3), sayfa: 526-531.
76. Hohmann FP, Macklon NS, Fauser BC. A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:166–173.
77. Weghofer A, Margreiter M, Bassim S, Sevelde U, Beilhack E, Feichtinger W. Minimal stimulation using recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonist in women of advanced age. *Fertil Steril* 2004;81:1002–1006.
78. Ragni G, Vegetti W, Riccaboni A, Engl B, Brigante C, Crosignani PG. Comparison of GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction cycles of patients at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2005;20:2421–2425.
79. Ashok Agarwal, Shyam SR Allamaneni Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction *Reproductive BioMedicine Online* Vol 9. No 3. 2004, 338-347.

80. Paszkowski T, Clarke, RN 1996 Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Human Reproduction* 11,2493-2495.
81. Shiotani M, Noda Y, Narimoto K, et al. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum Reprod* 1991; 6:1349–1353.
82. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, et al. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8:S40–S42.
83. Sugino N, Karube-Harada A, Taketani T, et al. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F₂α production through nuclear factor-κB activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *J Reprod Dev* 2004; 50:215–225.
84. Bedaiwy MA, Agarwal A, Falcone T, et al. Relationship of follicular fluid oxidative stress parameters and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril ASRM (abstracts)* 2005; 84:S250.
85. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2004; 82:593–600.
86. Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7:175–189.
87. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:93–98.
88. Bosco L, Ruvolo G, Morici G, et al. Apoptosis in human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2005; 84:1417–1423.
89. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:67.
90. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6:84–96.
91. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod* 2000; 15 (Suppl 2):199–206.
92. N.Sugino, S.Takiguchi, M.Ono, H-Tamura, Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles *Human Reproduction* 1996. 11 ,2484—2487.
93. Jozwik M, Wotc/ynski S. Szamatowicz M 1999 Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular Human Reproduction* 5. 409-413.
94. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures fertility and sterility 2004. 81,
95. Oyawoye O. Abdel Gadir A, Gamer A et al. 2003 Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human Reproduction* 18, 2270-2274.
96. Atlaran M, Pasqualotto E. Falcone T et al. 2000 The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine* 45. 314-320.

97. Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17:2686–2693.