

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL OLARAK SİGARA DUMANINA MARUZ
BIRAKILAN FARELERDE SİGARA DUMANININ VE
E VİTAMİNİNİN İVF PARAMETRELERİ (FERTİLİZASYON
ORANI, KLİVAJ ORANI, EMBRİYO GELİŞİM ORANI)
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Mehmet KAYA

**Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2006**

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL OLARAK SİGARA DUMANINA MARUZ
BIRAKILAN FARELERDE SİGARA DUMANININ VE
E VİTAMİNİNİN IVF PARAMETRELERİ (FERTİLİZASYON
ORANI, KLİVAJ ORANI, EMBRİYO GELİŞİM ORANI)
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Mehmet KAYA

**Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Hikmet HASSA**

**ESKİŞEHİR
2006**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Mehmet KAYA'ya ait "Deneysel olarak sigara dumanına maruz bırakılan farelerde sigara dumanının ve E vitamininin IVF parametreleri (fertilizasyon oranı, klivaj oranı, embriyo gelişim oranı) üzerine etkileri" adlı çalışma jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: Jüri Başkanı	Prof.Dr. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof.Dr. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof.Dr. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun
.....Tarih ve.....Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Erol GÖKTÜRK
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr.Hikmet HASSA'ya, Prof.Dr.S.Sinan ÖZALP'e, Prof.Dr.Atilla YILDIRIM'a, Prof.Dr.K.Turgay ŞENER'e, Prof.Dr.Başar TEKİN'e, Prof.Dr.Ömer T.Yalçın'a, Doç.Dr.H.Mete TANIR'a; uzmanlık tezim konusunda desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr.Firdevs GÜRER'e; kliniğimizde beraber çalıştığım asistan ve hemşire arkadaşlarıma, özellikle makalelerin çevirisinde bana çok yardımı olan Dr.M. KAYA' ya, yetişmemde büyük katkıları bulunan kıdemlilerim Uzm.Dr.A.AKÇAY'a, Uzm.Dr.E.SİVRİ'ye, Uzm.Dr.T.ŞENSES'e, Uzm.Dr.N.ARDİÇ'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim. Eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak varlığını her zaman yanımda hissettiğim anneme, en büyük destekçim ve hayat arkadaşım sevgili eşim Yasemin Meral'e, canım kızlarım Ervanur ve Hazal'a sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Kaya, M. Deneysel olarak sigara dumanına maruz bırakılan farelerde sigara dumanının ve E vitamininin IVF parametreleri (fertilizasyon oranı, klivaj oranı, embriyo gelişim oranı) üzerine etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2006. Bu çalışmada, 12-14 haftalık ortalama ağırlıkları 25,19,± 4,34 olan 28 dişi, 12 erkek Balb-c fare kullanıldı. Erkek ve dişi fareler kontrol, sigara dumanına maruz bırakılan, E vitamini verilen ve sigara dumanı ile beraber E vitamini verilen olmak üzere dört gruba bölündüler. 10 hafta süresince Kontrol gruplarına i.p. serum fizyolojik, sigara dumanı gruplarına 20 adet sigara/gün, E vitamini gruplarına i.p. E vitamini 50 mg/kg, sigara dumanı ile beraber E vitamini alan gruplara aynı miktarlarda sigara dumanı ve E vitamini verildi. Deney süresi bitiminde dişi farelere 200 IU FSH (Puregon, Organon®), 48 saat sonra 200 IU hCG (Pregnyl, Organon®) i.p. enjeksiyonu yapıldı. hCG enjeksiyonundan 15-17 saat sonra laparotomi yapılarak tuba-uterina-over kesilerek çıkarıldı. İşleme stereo mikroskop altında devam edilerek tuba uterinanın ampulla bölgesinden fare oositleri toplandı. Erkek farelere de laparotomi uygulanarak testisleri çıkarıldı. Stereo mikroskop altında epididimisten spermier toplandı. İn vitro olarak 3 saat süre ile olgunlaştırılmış oositlere, her bir oosite 7 µl olacak şekilde sperm solüsyonu eklendi. Böylece farklı deney gruplarının birbirleriyle çarpırazlanması sonucu çalışma grupları elde edildi. Oluşan embriyolar 3. güne kadar izlendi. Fertilizasyon oranları, klivaj oranları, embriyo gelişim oranları bunun yanın sıra arrest, dejenerasyon oranları ve canlılığı süren embriyoların gradeleri saptandı. Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılan dişi farelerde fertilizasyon oranı (P=0.002, P<0.01**), embriyo gelişim oranı (Z=3,20, P<0.01**) azalırken, klivaj oranında fark saptamadık. (P>0.05^{NS}). Sigara dumanına maruz kalan erkek farelerde fertilizasyon parametrelerinde değişiklik saptamadık. Bu etkinin özellikle, bozulmuş oosit kalitesi ile ilişkili olabileceğini düşündük. Sigara dumanına maruz bırakılan erkek ve dişi farelere verilen E Vitamininin sigara dumanının olası etkilerini değiştirmedeğini tesbit ettik. Ayrıca hem erkek hem de dişi farelere E vitamini verilmesiyle fertilizasyon (P=0.014, P<0.05*) ve embriyo gelişim oranlarında (P=0.017, P<0.05*) azalma bulduk Olumsuz etkilerini saptadığımız antioksidan kullanımıyla ilgili, antioksidanlar normal dozlarda antioksidan etki gösterirken yüksek dozlarda oksidan etki göstermesine bağlı olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak hem kadınlar hem de erkeklerde sigaranın bırakılmasını cesaretlendirmek ve sigara dumanına maruz kalınmasını önlemek infertiliteye yönelik koruyucu bir yaklaşım olarak önemlidir. Ayrıca antioksidan tedavisi iki ucu keskin bir kılıca benzemektedir. Bir yanda istenilen etkiler, diğer yanda antioksidan olarak kullanılan tedavinin doz aşımında oluşan istenmeyen etkiler vardır. Antioksidan kullanımı ile ilgili en uygun supplement tipini ve etkisini belirlemek amacıyla geniş skalalı prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Sigara dumanı, antioksidan, in vitro fertilizasyon.

ABSTRACT

Kaya, M. Effect of cigarette smoke and vitamin E on fertility parameters in inbred Balb-c type male and female mice: in vitro fertilization mice model study. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Obstetric and Gynecology Eskişehir, 2006. In this experiment, 12-14 weeks old and mean weight $25,19 \pm 4,34$ gr. 28 Balb-c female mice and 12 Balb-c mice were used. Female mice and male mice were divided into four groups as cigarette smoke exposed, control, mice given vit. E, cigarette smoke exposed mice given vit E. For ten weeks, control group mice were injected intraperitoneal SF, cigarette smoke exposed group mice were exposed 20 cigarette/day. The groups given vit E were injected 50 mg/kg Vit. E intraperitoneally. At the end of this experiment, female mice were treated with 200 IU FSH (Puregon, Organon®). Forty eight hours following FSH dose, 200 IU hCG (Pregnyl, Organon®) was intraperitoneally injected. After 15-17 hours, all female mice were put in a special cage where ether concentration high subsequently having confirmed their death, laparotomy was performed and tuba-uterina-ovaries of mice were excised. Under stereomicroscope mice oocytes were collected from ampullary region of tuba-uterina. Testis of male mice removed with laparotomy. Under stereomicroscope sperms were collected from epididymis. Oocyte were incubated with 7 μ l sperm solution per oocyte for 3 hours. Study groups constituted by crossmatching of different experiment groups. Developed embryos were followed for 3 days. Fertilization rate, cleavage rate, embryo development rate, arrest, degeneration rate and embryo grade were determined. In this experiment, we found fertilization rate and embryo development rate were lower in cigarette smoke exposed female mice ($P=0,002$, $P<0,01^{**}$ and $Z=3,20$, $P<0,01^{**}$ respectively). However there was no statistical difference related with fertilization parameters in the cigarette smoke exposed male mice. We thought that this is due to destroyed oocyte quality. Also we found that vit E does not change affect of cigarette smoke and it has lowering affect on fertilization rate and embryo development rate ($P=0,014$, $p<0,05^*$; $P=0,017$, $P<0,05^*$ respectively). Antioxidants behave as an antioxidant when used in normal dose however they behave as oxidant when used in high dose. As a result encouraging of discontinuation of cigarette or cigarette smoke exposure is important for prevention of infertility. Antioxidant treatment is looks like two edges sword. At the one hand they have desired affects in normal dose, at the other hand side affects when used in high dose. Wide range prospective studies should be done for determining appropriate supplement type and affect related with antioxidant treatment.

Key Words: Cigarette, antioxidant, in vitro fertilization.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
I.GİRİŞ	1
II.GENEL BİLGİLER	4
II.1.SİGARAYI OLUŞTURAN MADDELER ve FARKLI SİSTEMLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	4
II.1.1.Sigara Dumanı	4
II.1.2. Sigara Dumanının Katran Fazı ve Gaz Fazı	4
II.1.3. Sigara Dumanı -Gaz Fazı Bileşikleri	6
II.1.4. Sigara Dumanı -Katran Fazı Bileşikleri	7
II.1.5. Sigaranın Biyolojik Sistemlere Etkisi	8
II.1.6. Sigara ve Gebelik	11
II.1.7. Sigaranın İnfertilite Üzerine Etkileri	12
II.2. SİGARA, OKSİDATİF STRES, ANTİOKSİDAN SİSTEM VE REPRODÜKTİF SİSTEM İLİŞKİSİ	19
II.2.1. Serbest Radikaller	19
II.2.2. Reaktif Oksijen Partikülleri (Reactive Oxygen Species-ROS)	19
II.2.3. Hücrelerde Serbest Radikal Üretimi	20
II.2.4. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Defans	21
II.2.5. ROS ve Reprodüktif Sistem	26
II.3. E VİTAMİNİ	32
II.3.1. Vitamin E'nin Emilimi ve Taşınması	33
II.3.2. Vitamin E Eksikliği	34
II.3.3. Vitamin E Toksisitesi	34
II.3.4. Vitamin E Kaynakları	34
II.3.5. E Vitamini Antioksidan Özelliği	34
III. GEREÇ VE YÖNTEM	36
IV. BULGULAR	50
V.TARTIŞMA (ÖN ÇALIŞMA)	61
VI. TARTIŞMA	63
VII. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
VIII. KAYNAKLAR	81

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
C AMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CO ₂	Karbon dioksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FSH	Folikül Stimülasyon Hormonu
GIFT	Gamet İntrafallopian Transfer
GSH	Glutasyon
HCG	İnsan Koryonikgonadotropini
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HbCO	Karbonmonoksi Hemoglobin
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
İ	İzopren
LH	Luteinizan Hormon
Met-Hb	Methemoglobin
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NO	Azot Monoksit
NO ₂	Azot Dioksit
O ₂ ⁻	Süperoksit Anyonu
OH	Hidroksil Radikali
OPU	Oosit pick-up
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PGI ₂	Prostasiklin
Q	Kinon
QH	Semikinon
QH ₂	Hidrokinon
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
ROO [•]	Peroksil radikali
RO [•]	Alkoksil radikali
ROOH	Lipit hidroperoksit
SOD	Süperoksit Dismutaz
TXA ₂	Tromboxan
ZIFT	Zigot İntrafallopian Transfer

ŞEKİLLER

	Sayfa
II.1. Sigara dumanı katran fazı, serbest radikal oluşumu ve toksisite mekanizması.	5
II.2. Moleküler oksijenin indirgenmesi.	20
II.3. Reaktif oksijen partikülleri kaynakları.	21
III.1. Fareleri sigara dumanına maruz bıraktığımız kafesin görünümü (Resim A,B,C,D).	36
III.2. Sigara makinesi. (Resim E,F).	37
III.3. Fare kafeslerinin deney ortamına yerleştirilmesi (Resim G,H).	37
III.4. Farelere intraperitonel enjeksiyon uygulaması (Resim I).	38
III.5. Testo 350 cihazı (Resim J).	39
III.6. Dişi farelerde laparotomi ile tuba uterina-over kesilerek çıkarılması (Resim K).	42
III.7. Erkek farelerde laparotomi ile testislerin çıkarılması (Resim L).	43
III.8. Ovaryumdan primer follikül (M) ve hCG öncesi profaz evresinde (Germinal Vezikül, Gv) fare oositi (N).	44
III.9. hCG sonrası 17.saatte metafaz evresinde tubal oosit (P) ve epididimal fare spermleri (R).	44
III.10. IVF sonrası fertilize olmamış fare oositi.	44
III.11. IVF sonrası fertilize olmuş fare oositi.	45
III.12. 3. günde genellikle morula evresinde grade I fare embriyoları.	45
III.13. 2. günde klivaj göstermeyen arrest (T) veya klivaj gösterede skoru düşük (V) ya da dejenere fare embriyosu.	46
III.14. 3. güne kadar gelişimini sürdürmüş ancak skoru düşük yada dejenere fare embriyoları.	46
III.15. 2. günde skoru yüksek embriyolar.	47

TABLOLAR

	Sayfa
II.1. Sigara dumanında bulunan önemli toksik bileşikler.	6
II.2. Sigarada bulunan kanserojen maddeler.	9
II.3. Antioksidanlar.	21
II.4. Major antioksidanların yapısı ve etkisi.	23
II.5. Q/QH ₂ polimerlerinin, serbest oksijen radikal türlerini oluşturması.	25
II.6. Gaz fazında NO ve NO ₂ 'nin peroksil ve alkoksil radikallerini oluşturması.	26
III.1. Ön çalışmanın bulguları.	41
III.2. Çalışma grupları.	47
III.3. Sigara dumanına maruz bırakılan kafesdeki ortamdaki gazların başlangıç, 3.saat ve 6. saat dağılımları.	49
IV.1. Çalışma gruplarına göre genel sonuçlar.	51
IV.2. Sigara dumanına maruz Balb-c farelerde sigara dumanının fertilite parametreleri üzerindeki etkileri.	52
IV.3. Sigara dumanının fertilizasyon oranı üzerine etkisi.	53
IV.4. Sigara dumanının klivaj oranı üzerine etkisi.	53
IV.5. Sigara dumanının embriyo gelişim oranı üzerine etkisi.	54
IV.6. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının fertilite parametreleri üzerindeki etkileri.	55
IV.7. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının fertilizasyon oranı üzerine etkileri.	56
IV.8. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının klivaj oranı üzerine etkileri.	56
IV.9. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının embriyo gelişim oranı üzerine etkileri.	57
IV.10. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının fertilite parametreleri üzerindeki etkileri.	58
IV.11. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının fertilizasyon oranı üzerine etkileri.	59
IV.12. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının klivaj oranı üzerine etkileri.	59
IV.13. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının embriyo gelişim oranı üzerine etkileri.	60

I.GİRİŞ

Dünyanın en hızlı yayılan ve en uzun süren salgını olarak nitelendirilen tütün ilk kez XVI. yüzyılda Amerika'da üretilmiş ve kısa sürede dünyanın iklimi uygun tüm bölgelerine yayılmıştır. Sigara olarak ince kağıda sarılarak tüketilmesi ise XIX. yüzyılda başlamıştır. Özellikle I. ve II. Dünya savaşlarındaki cephedeki askerlere sigara gönderme kampanyalarının sigara tiryakiliğinin yayılmasında büyük etkileri olmuştur.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sigara kullanımı, biyo-sosyo-psikolojik zehirlenme hali olarak tarif edilmektedir. Sigara alışkanlığı, bireylerin birbirlerini etkilemesiyle bir sosyal zehirlenme ve ortaya çıkardığı tolerans hali, fizik ve psikolojik bağımlılık yapma özelliğiyle de bir psikolojik zehirlenme durumudur (1).

Dünya çapında sigara kullanıma karşı bir çok kampanya yürütülüyor olmasına rağmen, sigara tüm dünyada halen çok yaygın olarak tüketilmektedir. ABD'deki reproduktif yaştaki erkeklerin yaklaşık %35'i, kadınların %30'u sigara içmektedir. Avrupa'da sigara çok yaygın olarak kullanılmaktadır, halkın %35'i sigara içmektedir. Türkiye, Yunanistan ve Bulgaristan gibi Avrupa'nın doğusunda bulunan ülkelerde bu oran %44'lere ulaşmaktadır (2,3).

Sigara içilmesi sırasında tütün yapraklarının yanması ile pek çok yanma ürünü meydana gelir. Sigara dumanı içerisinde bilinen en az 4700 bileşik vardır. Bu bileşenlerden çoğunun farmakolojik olarak aktif, toksik, mutajenik, karsinojenik olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında oksidanlar, prooksidanlar, serbest radikaller, redükleyici ajanlar, formaldehid, asetaldehid, akrolein gibi aldehit ve ketonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, karboksilik asitler, steroidler, nitrozamin sayılabilir (4,5).

Sigaranın genel sağlık üzerindeki negatif etkileri iyi bilinmektedir. Sigara akciğer kanseri, kronik bronşit ve koroner kalp hastalıkları olmak üzere başlıca üç tip ölümcül hastalığa yol açar. Araştırmalara göre sigara kullanımının yaygın olduğu ülkelerde akciğer kanserinin %80-90'ından, kronik bronşit ve amfizem ölümlerinin %75-90'ından koroner kalp hastalığı ölümlerinin %25-30'undan sigaranın sorumlu olduğu düşünölmektedir (6).

Gebelikte içilen sigara anne yanında fetusu da olumsuz yönde etkilemekte, annenin içtiği sigaranın miktarına bağlı olarak fetusta etkiler oluşmaktadır. Gebelikte sigara içimi düşük doğum ağırlığı, prematüre doğum, asfiktik doğum, erken membran rüptürü, ablasyo plasenta ve plasenta previa gibi gebelik komplikasyonlarına, spontan abortus ve konjenital malformasyonlara, perinatal mortalite ve morbiditenin artmasına, mental retardasyon ve işitme bozukluklarına neden olmaktadır (7,8,9).

Sigara infertilite nedeni olabileceği uzun zamandır tartışılmaktadır .Fertilite, hipotalamus-hipofiz-over aksı, gametler ve endometriuma kadar birçok sistemin normal çalışması sonucunda oluşur. Üreme kompleks bir sistemdir ve bu sistemin içindeki yapılar birçok faktörden çok kolay etkilenmektedir. Sigaranın bu sistemi etkilediğine dair pek çok kanıt vardır (10,11,12).

Sigara içmenin sperm kalitesini etkileyip etkilemediği konusunda endişeler mevcut olmakla birlikte henüz bir sonuca varılamamıştır. Bazı araştırmacılara göre sigara sperm dansite ve motilitesini bozmakta fakat morfolojiyi etkilememektedir (18). Bazılarına göre sigara dansite motilite ve morfolojiyi bozmaktadır (19). Yine bazılarına göre sigaranın hiçbir sperm parametresi üzerine etkisi yoktur (13,14,15).

Sigara ve infertilite ilişkisini gösteren önemli sonuçlar, yardımcı üreme yöntemlerinin sigara ile ilişkisini araştıran çalışmalardan elde edilmektedir. Sigaranın invitro fertilizasyonda, fertilizasyon oranını azalttığı, oosit sayısını azalttığı, gebelik oranlarını düşürdüğü, düşük oranlarını artırdığı bildiren çalışmalar vardır (16,17).

Sigara dumanının katran fazı, kinon, semikinon, hidrokinon, gaz fazı, karbon ve oksijen merkezli serbest radikalleri yüksek konsantrasyonlarda içerir (20).

Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girerek onların yapısını bozan moleküllere “serbest radikaller” denmektedir. Çeşitli patolojik durumlarda

yapımı artan bu ürünler, hücresel makromoleküller ile reaksiyona girerek hücre hasarı oluştururlar (18,19).

E vitamini ya da alfa tokoferol insan dokusunda etkisini erken dönemde serbest radikalleri bağlayarak, hücre membranlarını serbest radikallerin zararından koruyarak yapmaktadır. Biyolojik membranlarda bulunan yağda çözünen ve zincir kırıcı özelliği olan en önemli antioksidandır (21).

Oral antioksidanlar sigara tiryakilerindeki ve erkek faktörlü infertilite hastalarındaki sperm kalitesini arttırmışlardır. Aynı zamanda semeninde yüksek düzeyde reaktif oksijen radikalleri bulunan sağlıklı erkekler ile geçmişte yapılan invitro fertilizasyon sikluslarından düşük fertilizasyon oranı gösteren fertil normospermik erkeklerdeki fertilizasyon potansiyelini arttırmışlardır (22,23,24,25).

Kadınlarda uygulanan oral antioksidan tedavisiyle ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Erkeklerde olduğu gibi oral antioksidanların over, follikül sıvısı, tuba uterina gibi hedef sahalara ulaşp ulaşmadığı belirsizlikler mevcuttur. Bununla birlikte, nikotin metabolitlerini kapsayan toksik maddeler bu bölgelere ulaşmaktadırlar. Antioksidan tedavisiyle ilgili optimal ilaçlar ve dozlar konusunda belirsizlikler vardır (26).

Sonuç olarak erkek ve kadınlarda sigara kullanımının infertiliteye neden olduğunu gösteren veriler yanısıra fertilizasyon ve gebelik oranlarına hiç etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da vardır. Aynı zamanda vitamin ve minerallerin üreme fonksiyonu üzerindeki etkileri tartışma konusudur. Günümüzde bu farklı verilerin doğrulanmasına, sigara dumanının ve antioksidanların olası etkilerinin ortaya konmasına gereksinim vardır. Bu amaçla çalışmamızda, sigara dumanının ve antioksidan özelliği olan vitamin E'nin invitro fertilizasyon parametreleri üzerine olan olası etkilerini deneysel olarak hayvan modelinde göstermeyi amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. SİGARAYI OLUŞTURAN MADDELER ve FARKLI SİSTEMLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

II.1.1. Sigara Dumanı

Sigara “*Nicotina Tabacum*” denilen tütün bitkisinin özel bir şekilde kurutulmuş yapraklarından elde edilir. Sigara içilmesi sırasında tütün yapraklarının yanması ile pek çok yanma ürünü meydana gelir. Sigara dumanı içerisinde bilinen en az 4700 bileşik vardır. Bu bileşenlerden çoğunun farmakolojik olarak aktif, toksik, mutajenik, karsinojenik olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında oksidanlar, prooksidanlar, serbest radikaller, redükleyici ajanlar, formaldehid, asetaldehid, akrolein gibi aldehit ve ketonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, karboksilik asitler, steroidler, nitrozamin sayılabilir (4,5,27).

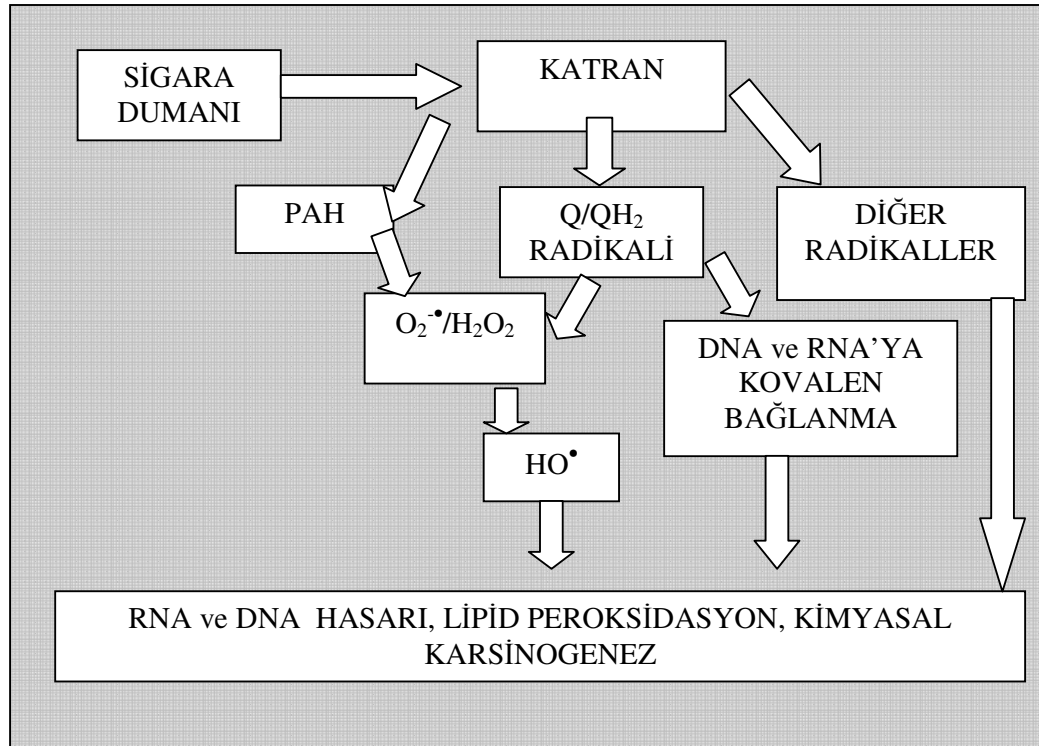
Sigaradan çekilerek inhale edilen dumana ana duman, bekleme esnasında havaya karışan dumana, yan duman denir. Ana duman ve yan duman çevresel tütün dumanını oluşturur. Çevresel tütün dumanının %85’i yan dumandan, %15’i ise ana dumandan oluşur. Yan duman içerisindeki bileşenler ana dumana göre daha yüksek konsantrasyondadır; fakat havada daha büyük volüm içerisinde dilüe olurlar (28).

Sigara, aktif olarak içen kişinin sağlığını olumsuz etkilediği gibi, aynı ortamda bulunan diğer bireylere de bir çok olumsuz etki yapmaktadır. Pasif içicilerin aldığı yan duman, sigara içenler tarafından inhale edilen dumanda tanımlanan tüm karsinojenleri içermekte ve sigara filtresinden de geçmediğinden ana dumandaki karsinojen ağırlığının 100 katı kadarını içinde bulundurmaktadır. Sigara içimine pasif olarak maruz kalan insanlarda da aterojenik lipoproteinlerin arttığı, antiaterojenik lipoproteinlerin azaldığı ve koroner arter hastalığına bağlı ölüm oranının yüksek olduğu saptanmıştır (29,30,31).

II.1.2. Sigara Dumanının Katran Fazı ve Gaz Fazı.

II.1.2.a. Sigara Dumanının Katran Fazı: Sigara dumanı 0.1 µm’den büyük çaplı partiküllerin %99.9’unu tutan “standart glass-fiber” filtresinden geçtiğinde

filtrede tutulan kısmı katran fazı olarak tanımlanır. Katran fazı stabil ve kompleks bir karışımdır. Katran fazı, pek çok organik bileşiğin yanısıra kinon ve polisiklik aromatik hidrokarbon radikalleri gibi stabil radikalleri içerir. Sigaranın katran fazında bulunan kinon/hidrokinon radikalleri oksijeni indirgeyerek süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) oluşumuna yol açarak toksisiteye neden olur (Şekil II.1.),(5,32,33).



Şekil II.1. Sigara dumanı katran fazı, serbest radikal oluşumu ve toksisite mekanizması.

II.1.2.b. Sigara Dumanının Gaz Fazı: Filtrenin içinden geçebilen materyaldir. Sigara dumanı katran fazının içerdiği bileşikler ve radikaller stabil olmasına rağmen gaz fazı labildir. Yanma sonucu kendi kendine oluşan karbon ve oksijen merkezli serbest radikalleri yüksek konsantrasyonlarda içerir. Bu radikaller çok kısa ömürlüdür. Gaz fazının diğer önemli ve radikal oluşumuna sebep olan içeriği azot monoksit (NO)'tir ve 300-500 ppm gibi yüksek oranlarda bulunur. Azot

monoksit reaktivitesi çok daha fazla olan azot dioksite (NO_2) yavaşça okside olur (32,34).

Tablo II.1. Sigara dumanında bulunan önemli toksik bileşikler.

SİGARA DUMANINDA BULUNAN ÖNEMLİ TOKSİK BİLEŞİKLER	
KATRAN FAZI	GAZ FAZI
Partikül madde	Karbonmonoksit
Nikotin	Karbondioksit
Fenol	Formaldehid
Katekol	Akrolein
Anilin	Aseton
2-Toluidin	Piridin
2-Naftilamin	3-Vinilpiridin
Benzantrasen	Hidrojen siyanid
Benzopiren	Azot monooksit
Kinolin	Azot dioksit
N-Nitrozonornikotin	Amonyak
N-nitrozodietanolamin	N-Nitrozodimetilamin
Nikel	N-Nitrozopirrolin
Polonyum-210	

II.1.3. Sigara Dumanı -Gaz Fazı Bileşikleri

II.1.3.a. Karbon Monoksit: Karbon monoksit (CO), tütünde yer alan organik bileşiklerin kısmi oksidasyonu sonucu oluşur. Renksiz, kokusuz bir gazdır. Sigara

dumanında yaklaşık %2.9-5.1 oranında bulunur. CO kanda, kanda kanda hemoglobin demirine bağlanarak, karbon monoksi hemoglobin (HbCO) bileşimini oluşturur ve hemoglobinin diğer hem bölgelerinin oksijeni yüksek ilgiyle bağlamasına neden olur. Bu durum saturasyon eğrisini sola çevirerek, hemoglobinin dokulara oksijen bırakma kapasitesini kısıtlar (35).

II.1.3.b. Karbon Dioksit: Tütündeki organik bileşiklerin yanması ile oluşan ve sigaranın gaz fazında yer alan bir bileşiktir. Karbon dioksitin (CO₂) bir bölümü hemoglobinin yüksüz α-amino gruplarına bağlı karbamat olarak taşınır. CO₂ bağlanması hemoglobinin T (Taut) veya deoksi şeklini stabilize ederek oksijene ilgisini azaltır (36).



II.1.3.c. Azot Oksitleri: Sigara dumanı 500 ppm kadar nitrik oksit (NO) içerir. Sigara dumanındaki azot oksitleri kanda methemoglobin (Met-Hb) oluştururlar ve bu da azot oksitlerin toksik etkilerinin nedenidir. Nitrik oksit kısa ömürlüdür; 6-10 saniye etki gösterir ve oksidasyona uğrayıp azotdioksite (NO₂) dönüşür (36).

II.1.3.d. Uçucu Nitroz Aminler: Tütün ürünleri önemli miktarlarda N-nitrozo bileşiklerini içerirler. Tütüne özgü nitroz aminler, tütünde 1.000-10.000 µg/kg oranında bulunurlar. Hayvan çalışmalarında kanserojen oldukları gösterilmiştir (37).

II.1.4. Sigara Dumanı -Katran Fazı Bileşikleri

II.1.4.a. Katran: Sigara dumanı katranında oldukça yüksek derişimlerde yer alan aktif metil floranthenlerin tümör başlatıcı aktivitenin nedeni oldukları saptanmıştır.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlardan Benzo (a) Pyren'in sigara dumanında yer alan potent karsinojen maddelerden biri olduğu hayvan deneyleri ile gösterilmiştir.

Uçucu olamayan çeşitli aromatik nitrozaminler ve aromatik aminler ve mesane kanserinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir.

Sigara dumanının içeri çekilmesi ile sigarada bulunan kadmiyumun %10-20'si vücut tarafından absorbe edilmekte ve çeşitli dokularda birikerek toksik etki göstermektedir (Tablo II.1),(37).

II.1.4.b. Nikotin: Nikotin alkaloid yapısında renksiz uçucu bir sıvıdır. Kullanılan tütüne göre değişmekle beraber, bir sigaradaki nikotin miktarı 20 mg'a kadar çıkabilir. Vücuda alınan nikotin miktarı, sigaranın cinsine, inhalasyon derinliğine ve süresine göre 0.05-2 mg arasında değişebilir. Absorbsiyonu sonucu dolaşıma giren nikotinin %25'i yedi saniye gibi kısa bir sürede beyine ulaşır. Bütün vücut sıvılarına dağılım gösterebilen nikotin, gebelerde plasentadan fetal dolaşıma ve emziren annelerde süte kolaylıkla geçer. Nikotin karaciğerde major metaboliti olan kotinine dönüşür. Kotinin'in yarılanma ömrü yaklaşık 19 saattir ve böbreklerden atılır.

Nikotinin uzun süre sigara veya diğer şekillerle alınması yalnızca psişik değil, aynı zamanda fiziksel bağımlılığa da yol açar. Nikotin, santral sinir sistemi üzerine psikostimülan etki eder. Ayrıca hem nöromusküler kavşakta hem de otonomik gangliyonlarda stimulus iletimini önce uyarır, arkasından bloke eder. Nikotin vapressin, adrenokortikotrop hormon, katekolamin gibi hormonların düzeyinde artışa neden olarak damarlarda vazokonstrüksiyona neden olmaktadır (38,39).

II.1.5. Sigaranın Biyolojik Sistemlere Etkisi

II.1.5.a. Sigaranın Kardiyovasküler Yapılara Etkileri: Sigara kullanımı ve koroner kalp hastalıkları arasındaki ilişki ilk olarak 1940 yılında Mayo klinik araştırmacıları tarafından yayınlandı. Bu tarihten beri sigaranın kardiyovasküler hastalık riskini, inmeyi ani ölümü, kalp krizini, periferik damar hastlıklarını ve aort anevrizmasını artırdığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Pek çok çalışma günde içilen sigara sayısı ile doğru orantılı olarak total kolesterol seviyesini arttığını, yüksek dansiteli lipoprotein konsantrasyonunun azaldığını bildirmiştir (40,41,42).

Myokard infarktüsü geçirdikten sonra sigara kullanmaya devam edenlerde bırakanlara göre tekrarlayan myokard infarktüsünden ölüm iki misli bulunmuştur.

Sigara içenlerde içmeyenlere göre 1.5-3 misli daha fazla beyin damar hastalığı görülmektedir (43).

Sigara içmenin, özellikle nikotin ve karbonmonoksit aracılığıyla vasküler endotele zarar verdiği ve endotelial hasarın da aterosklerozun gelişiminde birinci sebep olduğu gösterilmiştir. Sigara artmış kalp atımı ve kan basıncı, azalmış myokard oksijen dağılımına neden olur. Karbonmonoksit damar endotelinin lipidlere geçirgenliğini artırır. Nikotin çok güçlü bir trombosit agregasyonu inhibitörü olan PGI₂ sentezini azaltır. Bu durum TXA₂ üretimini artırır. Böylece tromboz riski artar. Sigara koroner spazmın da major bir risk faktörüdür (44,45,46).

Sigaranın kronik kullanımına bağlı kemik iliğinde kan hücreleri ve diğer kan faktörlerinin artışı hiperkoagülobilite ile seyredebilir. Özellikle ekstremitelerde venöz yapılarında varis, venöz yetmezlik gibi problem olan hastalar venöz trombozlar ve komplikasyonları ile karşılaşabilirler (44,45,46).

2.1.5.b. Sigaranın Kansere Oluşumuna Etkisi: Sigaranın kansere yol açabilen çok güçlü maddeler içerdiği konusunda kuşku yoktur. Sigara en önlenbilir kanser nedenidir. Sigara ile ilişkilendirilebilen kanserler arasında ilk akla gelenler akciğer, trakea, bronş, larenks, farenks, oral kavite ve özafagus kanserleridir. Ayrıca pankreas, böbrek, mesane, serviks, ve kolorektal kanserler ile sigara arasında ilişkiler koyan ortaya koyan çalışmalar da vardır (Tablo II.2.),(47,48,49).

Tablo II.2. Sigarada bulunan kanserojen maddeler.

KANSEROJEN MADDENİN TİPİ	BU TİP MADDELERİN SAYISI
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	10
Aza-arenes	3
N-nitrosaminler	7
Aromatik aminler	3
Heterosiklik aromatik aminler	8
Aldehidler	2
Çeşitli organik maddeler	15
İnorganik bileşikler	5
TOPLAM	55

II.1.5.c. Sigaranın Solunum Sistemine Etkisi: Diğer sistemlerden farklı olarak solunum sistemi doğrudan dış çevre ile ilişkilidir. Her nefes ile beraber mikroplar, dumanlar, gazlar v.b. pekçok madde ile karşı karşıya kalmaktadır. Solunum sisteminin bu zararlı maddelere ve mikroplara karşı savunma mekanizmaları vardır. Sigara içimi ile ortaya çıkan siliaların sayısında ve frekansında azalma, viskoelastisitesi ve volümü artmış mukus tabakası ile mukosilier klirensin bozulması sonucu irritan inhaler partiküllerden, mikroorganizmalardan bronşial lümenin temizlenmesi bozulmakta ve enfeksiyon riski artmaktadır (50,51,52).

Sigara içimine devam edilmesi ile hava yollarını kaplayan pseudostratifıye silli epitelde önce skuamoz metaplazi daha sonra karsinoma in situ hatta invaziv bronkojenik karsinomaya kadar varan yapısal değışiklikler meydana gelmektedir. Bu değışikliğin sıklığı ve yoğunluğu günlük içilen sigara sayısına bağlıdır (53).

II.1.5.d. Sigaranın İmmün Sisteme Etkileri: Sigara T hücrelerinin çoğalımını baskılamakta; doğal öldürücü hücreler (natural killer) ve alveolar makrofaj fonksiyonlarını etkilemekte; IgG ve IgA'nın serum düzeylerinde düşüklüğe neden olmaktadır (54).

II.1.5.e. Sigaranın Endokrin Sisteme Etkileri: Sigara içimi büyük oranda endokrin değışikliklerle ilişkilidir. Bu durum ciddi periferel etkiler kadar santral sinir sisteminde hipotalamik etkileri de içermektedir. Hipotlamik gonadotropin salınımının değışmesi söz konusudur. LH piki azalmaktadır. Serum prolaktin ve tiroksinin oluşumunu etkilemektedir. Ayrıca adrenal fonksiyonlar üzerine de etkisi vardır (55).

Sigaranın, hormonal parametreler üzerine etkileri olması nedeniyle IVF tedavisine etkileri vardır. Çalışmalarda menstruel siklünün ikinci veya üçüncü gününde tanımlanan E₂ seviyeleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu fenomene dair bir açıklama Bodis ve ark.(56) tarafından ileri sürülerek nikotinin in vitro insan follikül hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu yazarlar nikotinin E₂ sekresyonunda doza bağlı bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Erken dönemdeki yüksek E₂ seviyeleri ise ovaryan cevaptaki bozukluğa neden olarak

tedavinin sonlandırılması oranını artırırken, daha düşük oosit elde edilmesine neden olmaktadır (57).

Diğer bir ilginç gözlem prolaktin seviyelerinin genellikle sigara içen kadınlarda belirgin şekilde düşük olmasıdır. Bu bulgu nikotinin merkezi dopamin salınımını etkilediğini ve böylece prolaktin sekresyonunu inhibe ettiğini varsayan Berta ve ark.(58) tarafından teyit edilmiştir. Fizyolojik olarak doğum sonrasındaki prolaktin seviyesi artışı müteakip erken gebeliği önleyen FSH / LH mekanizmasını düzenleyen bir etkiye sahiptir. Bu yüzden, kuramsal olarak daha düşük prolaktin seviyesi fertilitite oranları üzerinde pozitif etkiye sahiptir. Bununla birlikte, literatürde fertilitenin düşük prolaktin seviyelerinden negatif olarak etkilendiği de bildirilmiştir (59).

Bazı çalışmalar, sigara dumanı ekstraktlarının granüloza hücresi aromataz aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Granüloza hücresi aromataz aktivitesinin ise gebelik potansiyeli ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Granüloza-luteal hücre fonksiyonunun inhibisyonu korpus luteum yetmezliğine yol açabildiğini gösteren bulguya göre, sigara dumanına maruz kalan kadınlardaki yüksek oranlı erken dönem gebelik kaybının altında yatan mekanizmalardan biri olabileceği düşünülmektedir (60,61).

II.1.6. Sigara ve Gebelik

Üreme çağındaki kadınlarda sigara kullanım sıklığı yaklaşık %30'dur. Güvenilir istatistiksel bilgilerin bulunduğu ülkelerde gebelikte sigara kullanım oranı %15-30 arasında bildirilmektedir. Gebelik öncesi sigara içenlerin çoğu gebeliğin 4. haftasına kadar gebeliğin farkına varamadıklarından sigara içmeye devam etmektedirler (7,8).

Gebelikte içilen sigara anne yanında fetusu da olumsuz yönde etkilemekte, annenin içtiği sigaranın miktarına bağlı olarak fetusta etkiler oluşmaktadır. Gebelikte sigara içimi düşük doğum ağırlığı, prematüre doğum, asfiktik doğum, erken membran rüptürü, ablasyo plasenta ve plasenta previa gibi gebelik komplikasyonlarına, spontan abortus ve konjenital malformasyonlara, perinatal mortalite ve morbiditenin artmasına, mental retardasyon ve işitme bozukluklarına neden olmaktadır (7,8,9).

Sigara kullanımı spontan düşük olasılığını 2 katına çıkarır .Yardımcı üreme yöntemlerindeki düşük sıklığında sigaranın rolü tartışmalıdır. Çalışmaların çoğunda kullanılan sigaranın miktarı ile erken doğum riski arasında direk ilişki saptanmıştır. Sahah NR ve ark (62) tarafından sigara ile erken doğum ilişkisini araştıran bir metaanalizde, erken doğum için OR 1.27 (%95 CI 1.21-1.31) olarak bulunmuştur (7).

Norveçte, 34799 yenidoğanda yapılan bir çalışmanın sonucunda; sigara içen annelerin bebekleri 197 gr. düşük ağırlıklı doğmuştur. Anne ve baba birlikte sigara içiyorlarsa bu fark 201 gr olarak bulunmuştur (63).

Annanth ve ark. sigara kullanımı ve ablasyo plasenta arasındaki ilişkiyi 1.358.083 gebelikte ve 13 çalışmayı kapsayan bir metaanaliz ile değerlendirdiler. Bu vakalarda ablasyo plasenta oranı %0.64 ve sigara kullanımı için OR:1.9 (%95 CI 1.8-2.0) bulunmuştur (64).

Son yıllarda sigara içen gebelerde preeklampsinin daha az görüldüğü iddia edilmektedir. Conde-Agudelo ve ark (65) metaanalizlerinde sigara kullanımının preeklampsi sıklığını %32 (RR:0.68) azalttığını saptadılar. Bunun tersine sonuçlar bildiren çalışmalar da vardır (66).

Epidemiyolojik çalışmalar, gebelikte sigara kullanımının fetusta yarık damak-dudak riskini artırdığını ortaya koydu (67). Sigara içen gebelerde fetal eritropoetin düzeyinin yüksektir ve bu da subakut hipoksinin göstergesidir (68).

Sigara maternal mortalitenin en önemli nedenlerinden birisi olan ektopik gebelik riskini artırır. Sarajya ve ark. günde 1-5 sigara içenlerde 1.6, günde 20'den fazla sigara içenlerde 3.5 kat daha fazla tubal gebelik sıklığı bulmuştur (69).

II.1.7. Sigaranın İnfertilite Üzerine Etkileri

II.1.7.a. Sigaranın Kadın İnfertilitesi Üzerine Etkileri: Sigaranın infertilite nedeni olabileceği uzun zamandır tartışılmaktadır. Fertilite, hipotalamus-hipofiz-over aksı, gametler ve endometriuma kadar birçok sistemin normal çalışması sonucunda oluşur. Üreme kompleks bir sistemdir ve bu sistemin içindeki yapılar birçok faktörden çok kolay etkilenmektedir. Sigaranın bu sistemi etkilediğine dair pek çok kanıt vardır (10,11,12).

Sigara içen kadınlarda yapılan yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarıyla ilgili farklı raporlar yayınlanmıştır. Bazı çalışmalarda ovaryan fonksiyonu bozulmuş

olan genç kadınlarda (<38 yaş) fertilizasyon oranı, gebelik ve sigara içme alışkanlığı arasındaki ilişkiye ait hiçbir kanıt gösterilememiştir (Harrison ve ark. (191); Elenbogen ve ark. (16); Pattinson ve ark. (79); Rosevear ve ark. (194); Huckhes ve ark. (192); Sterzik ve ark. (193)). Klomifen sitrat testiyle değerlendirilen normal ovaryan rezerve sahip olan ve sigara içen kadınların, sigara içmeyen kadınlarla benzer gebelik oranlarına sahip oldukları da bildirilmiştir (Sharara ve ark. (17)). Fertil kadınlardaki spontan dizigotik ikiz görülme insidansındaki artış ile sigara içme alışkanlığı arasındaki ilişkiyi yüksek steroid hormon konsantrasyonuna bağlamışlardır (70).

Sigara kullanan kadınlarda, fertilizasyon oranının ve gebelik oranlarının düştüğünü bildiren yayınlar mevcuttur (Elenbogen ve ark. (16), Rosevear ve ark. (194), Maximovich ve ark. (197), Zenses (77)). İlave olarak sigara kullanımı erken menopoza ve ovaryan rezervin azalmasına neden olmaktadır (Sharara ve ark. (17)). Sigara içen kadınlarda fertilitenin düştüğünü gösteren çalışmalar yanısıra, pasif sigara içiciliğinin reproduktif neticelerinin de sigara içenlerde görülen değerler kadar yüksek olduğunu bildirilmiştir (60,70).

Sigara dumanında bulunan kadmiyum, kotinin ve benzopirenin insan gamet hücrelerine etkileri gösterilmiştir. Bir sigarada yaklaşık 1.0-2.0 mg olan kadmiyum sigara dozuna bağlı olarak over, testis, epididim ve vezikülo seminalisde birikir. Nikotin metaboliti olan kotinin nucleus ve sitoplazmadaki proteinlere bağlanarak follikül matürasyonunu ve oositin mayotik oluşumunu bozar (12,71).

Trapp ve ark. (72) tütünde bulunan bir madde olan rodanitin folliküler sıvıdada bulunduğunu kanıtladı. Bu kanıt tüketilen sigara sayısının göstergesiydi. Zenses ve ark. (73) sigara içenlerin follikül sıvısında belirgin, anlamlı kadmiyum artışı bildirdiler. Sigarada bulunan ağır metallerin, olgunlaşan oositlerin fonksiyonunu inhibe ederek normal mayotik hücre bölünmesini bozduklarından ve tam matürasyona ulaşan oosit sayısının düşük kalmasından ve kromozom anomolilerinin görülmesinden sorumlu olduğundan şüphelendiler. Zenses ve ark. (74) bir diğer çalışmalarında ise günlük olarak içilen sigara sayısı ile follikül sıvısı ve serum kotinin seviyelerindeki artış arasında bir korelasyon gözlemişlerdir.

Her sigarada 6-40 ng olan polisiklik aromatik hidrokarbon grubundan Benzopiren'in, over hücrelerinde DNA hasarına yol açarken in vitro granuloza hücrelerinde de aromataz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (12,75).

Kemirgen ve insan çalışmalarından elde olunan verilere göre; sigara dumanındaki zehirli maddelerden biri olan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'nın reproduktif sistem üzerine olumsuz etkiler yaptığı gösterilmiştir (76,77).

Sigara kullananlarda, kullanmayanlara göre konsepsiyona kadar olan sürenin uzadığı, fertilitenin düştüğü, ve infertilite prevalansının arttığı gösterilmiştir. 12 ayın üzerinde konsepsiyon gecikmesi yaşayan kadınların oranı, sigara içenlerde %16.4 iken, sigara içmeyenlerde %10.3 olarak bulunmuştur (10). Buna karşın üremeye hiçbir etkisi olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (78,79).

Sigara gelişen oosit sayısını etkilemektedir. Yaş ve sigara oosit tüketimi üzerine sinerjik etki yapmaktadır. Yapılan bir çalışmada, ağır sigara içicilerde (>20 sigara/gün) oosit sayısına etki açısından OR:0.828 ve oosit sayısında %17.2 azalma bulunmuştur (80). Sigara dumanındaki kimyasallar reproduktif fonksiyon kaybını ve follüküler yetmezliği hızlandırıyor gözükmektedir. Ortalama bazal FSH düzeyleri sigara içenlerde içmeyenlere göre belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (70). Bir çalışmada bazal FSH düzeyleri sigara içmeyenlere nazaran aktif sigara içicilerinde %66 daha yüksek bulunmuştur (81). Başka bir çalışmada ise sigara içenlerde lüteal faz süresince üriner östrojen atılımı sigara içmeyenlere göre azalmış olarak saptanmıştır. Bu etki sigaranın granuloza hücresi aromataz aktivitesini inhibe etmesine bağlanmıştır (75).

Sigaranın tubal mukozada silier aktiviteyi bozduğu gösterilmiştir. Hem sigara içenler hem de sigarayı bırakmış olanların infertilite nedeni olarak hasarlı fallop tüpüne sahip olmaya daha yatkın oldukları bildirilmiştir. Bu yüzden, bu kadınlarda GIFT ve ZIFT önerilmemekte, daha çok IVF prosedürü uygulanmaktadır. Sigara kullanımı pelvik inflamatuvar hastalık için risk faktörü olduğunu ve tubal faktörlü infertilite ile birliktelik gösterdiğini bildirilmiştir (80,82).

Bir çalışmada da, sigara içenlerde gelişen embriyolarda apoptozisin inhibe edildiği ileri sürülmüştür. Morfolojik olarak embriyolar grade 1-4 arasında değerlendirilerek follüküler sıvıdaki kotinin düzeyi ile karşılaştırılmış ve follüküler sıvıdaki kotinin düzeyi ile grade 1-2 embriyo oranı arasında pozitif korelasyon

bulunmuştur. Bu sonuçlara göre sigara içenlerde gelişen embriyolarda apoptozisin inhibe edildiği düşünülmüştür (83).

Sigara mayotik içciklenmeyi bozabilir. Oositlerdeki mayotik içciklenmenin ileri yaş, ileri oosit yaşı, ısı değişiklikleri gibi faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (12). Zenses ve ark. (84) içilen sigara sayısı ile orantılı olarak 23 yerine 46 kromozom içeren diploid kromozomlu oosit oranının arttığını göstermişlerdir. Diploid oositler mayotik içciklenmede sorun olduğunda ortaya çıkarlar. Sigara dumanındaki alkaloidlerin, mayotik içciklenme olayında yer alan protein yapısındaki tubuline bağlandıkları gösterilmiştir.

Augood ve ark. (10) tarafından yapılan bir metaanalizde, literatürdeki olgu-kontrollü ve kohort çalışmaları değerlendirilmiştir. Olgu kontrollü çalışmalarda, sigara içen 10928 kadında %26.6 infertilite saptanırken, sigara kullanmayan 19179 kadında %20 infertilite saptanmıştır. Sigara içenlerde infertilite için OR 1.60 (%95 CI 1.34-1.91) olarak bulunmuştur. Khort çalışmalarda ise sigara içen 6990 kadında %23 infertilite saptanırken, sigara içmeyen 13069 kadında %14.2 infertilite saptanmıştır. Sigara içenlerde infertilite için OR 1.42 (%95 CI 1.27-1.58) olarak bulunmuştur. Bu bulgular ışığında sigara içimi ve infertilite arasında çok yakın ilişki olduğu düşünülmüştür (12).

Sigara ve infertilite ilişkisini gösteren önemli sonuçlar, yardımcı üreme yöntemlerinin sigara ile ilişkisini araştıran çalışmalardan elde edilmektedir. Sigaranın IVF-ET'de fertilizasyon oranını düşürdüğü, oosit sayısını azalttığı, gebelik oranlarını negative yönde etkilediği, düşük oranlarını arttırdığını bildiren çalışmalar vardır (16,17). Bir çalışmada sigara içenlerin gebe kalmak için içmeyenlere göre yaklaşık 2 kat fazla IVF siklusuna ve daha yüksek dozlarda gonadotropine ihtiyaç duydukları ileri sürülmüştür (85). Bunun yanında sigaranın fertilizasyon ve gebelik oranlarına hiç etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (86).

Feichtinger ve ark.'nın 2314 IVF-ET siklusuna dayanan bir meta-analizinde sigara içmeyen kadınlarla karşılaştırıldığında sigara içen kadınların gebe kalmak için neredeyse iki kat IVF-ET siklusüne gerek duyduklarını gösterilmiştir (RR:1.79) (%95 CI 1.24-2.59). Sigara içmeyenlerde (%21) sigara kullananlarda ise anlamlı şekilde daha düşük (%14) gebelik oranlarının bulunduğu rapor edilmiştir (85).

El- Nemr ve ark.(70) 173 kadının (108 sigara kullanmayan ve 65 sigara kullanan kadın) IVF siklusunu, retrospektif olarak değerlendirmiştir. Özellikle genç kadınlar (<36 yaş) olmak üzere sigara içen kadınlarda daha yüksek ortalama bazal serum FSH konsantrasyonu ($p<0.0001$) ve sigara içmeyenlere nazaran ovaryan stimülasyon daha yüksek gonadotropin dozlarına gereksinim duyulduğu saptanmıştır ($p<0.0001$). Sigara içmeyenlere nazaran sigara içenlerde daha düşük ortalama oosit sayısı elde edilmiştir ($p<0.0001$). Kesintiye uğrayan siklus sayısı sigara içenlerde %18.5, sigara içmeyenlerde %8.5 bulunmuş ve total fertilizasyon başarısızlığı sigara içenlerde %18.5, sigara içmeyenlerde %8.5 olarak saptanmıştır. Sigara içenlerdeki siklus başına klinik gebelik oranı %16.9 iken sigara içmeyenlerde bu değer %21.3'tür. Sonuçta, kadınlardaki sigara içme alışkanlığının over rezervlerini önemli ölçüde düşürdüğünü ve erken yaşlardaki ovaryan stimülasyonuna karşı yetersiz cevap vermelerine yol açtığı düşünülmüştür (70).

II.1.7.b. Sigaranın Erkek İnfertilitesi Üzerine Etkileri: Sigara içmenin sperm kalitesini etkileyip etkilemediği konusunda endişeler mevcut olmakla birlikte henüz bir sonuca varılamamıştır. Bazı araştırmacılara göre sigara sperm dansite ve motilitesini bozmakta fakat morfolojiyi etkilememektedir (13). Bazılarına göre sigara dansite motilite ve morfolojiyi bozmaktadır (14). Yine bazılarına göre sigaranın hiçbir sperm parametresi üzerine etkisi yoktur (15).

Çeşitli çalışmalar erkeğin sigara içme alışkanlığının spermatogenez (Sofikitis ve ark. (101); Yamamutu ve ark. (91)), sperm fonksiyonu ve erken embriyo gelişimi (Kapawa ve ark. (87)) üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Sofikitis ve ark. (101) tiryakilerde görülene benzer kotinin konsantrasyonlarının (>400 ng/ml) in vitro testlerdeki sperm performansını düşürdüğünü gösterdiler (hiperosmotik şişme testleri, sperm penetrasyon deneyi, yüzde motilite ve hiperaktivasyon); ancak ICSI yöntemi kullanıldığında Hamster yumurtasının fertilizasyonunu etkilenmediğini de bildirdiler (30).

Diğer taraftan çeşitli çalışmalarda da sigara dumanına maruz kalmanın sperm sayısına (Sofikitis ve ark. (101)) veya sperm motilitesine (Dikshit ve ark. (212) ve Lewin ve ark. (213)) etkisi olmadığı gösterilmiştir (87).

Vine tarafından yapılan bir metaanalizde ise, sigara kullanımının semen kalitesi üzerine etkisi incelenmiş, uzun süreli sigara kullanımının semen kalitesini etkilediği gösterilmiştir. Fertil olgularda yapılan 9 çalışmadan 7'sinde, infertil vakalarda yapılan 19 çalışmadan 6'sında semen kalitesinde önemli azalma olduğu bildirilmiştir (88).

Osser ve ark. infertil 250 olguda, sigara içenlerde ejakulat volümünün ve total sperm sayısının anlamlı olarak düşük olduğunu bulmuşlar, motilite ve morfolojide ise anlamlı fark bulamamışlardır (89).

Chia ve ark. 674 infertil hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, ağır içicilerde (>20 sigara/gün) sperm dansitesinde düşme ve anormal morfolojide artma saptamışlar, diğer değerlerde ise anlamlı bir fark bulamamışlardır (90).

Yamamoto ve ark.'nın ratlarda yaptığı bir çalışmada, sigara dumanına maruz kalmanın, Leyding hücresi sekreteruar yetmezliği ve epididimal sperm matürasyonu ve spermin oositi penetre etme kapasitesinde defeklere neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca nikotine maruz kalınmasının, testis ağırlığını ve spermatosit ve spermatit sayısını düşürdüğü ve bunu muhtemelen testiste spermatogenez ve steroidogenezin başlaması için gerekli olan pituiter gonadotropinlerin eksikliği ile yaptığı belirtilmiştir. Nikotinin pituiter gonadotropinlerin salınımı için gerekli olan nöral stimulusu baskılayan bir SSS depresörü olmasının bu etkide rol oynadığı düşünülmüştür (91).

Erkeklerde spermatogenez puberteden ileri yaşlara kadar dinamik bir döngü halinde devam eder. Erkek germ hücreleri, dış faktörlere kadın germ hücrelerine göre daha fazla duyarlıdır. Mutasyon oranı erkeklerde daha fazladır. Sigara içimi, spermatozoolarda mayotik içciklenmedeki sorun nedeniyle normal kromozom sayısında farklılık yapabilir (92). Bir çalışmada 25 genç erkekde, idrar kotinin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak X,Y,X-Y,8. kromozomlarda dizomi saptanmıştır (93).

Günde 20 sigaradan fazla içen erkeklerde XX anöploidi sıklığı, içmeyenlere göre fazla bulunmuştur (94). Belcheva ve ark. erkekte sigara kullanımı ile DNA fragmantasyonuna sahip spermatozoa yüzdesinin arttığı, bununla birlikte bu DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığını buldular. Sigara içenlerin sperm

DNA fragmentasyonundaki bu ilave artış seminal ROS düzeyinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (95).

Sun va ark.'nın yaptığı çalışmaya göre semen örneklerinin en az dörtte biri %5 ile %40 arasında fragmente DNA'ya sahip spermatozoa içermektedir ve erkek sigara tiryakilerinde sigara içmeyenlere göre bu fragmente DNA'ya sahip spermatozoalar anlamlı derecede fazladır (96). DNA fragmentasyonu sperm motilite, morfoloji ve sayısı ile negatif korelasyon göstermekte olup azalmış fertilizasyon hızı ve embriyo klivajı ile ilişkilidir (97).

Sigara dumanının testis mikrosirkülasyonu ve oksijenizasyonu üzerine etkileri vardır ve sperm fonksiyonlarını bu mekanizmalarla bozabilir (98). Sigara içimi hormon seviyelerini etkileyebilir. Testosteron seviyesi yükselebilir, düşebilir veya değişmeyebilir. Östradiol seviyelerinin sigara içenlerde düştüğü gösterilmiştir (99).

Yapılan bir metaanalizde sigara kullanımının, sperm konsantrasyonunu %13 düşürdüğü bulunmuştur (100). Yardımcı üreme yöntemlerinin prognozunu değerlendirmede kullanılan sperm fonksiyon testlerinin (oosit penetrasyon testi, hiposmotik şişme testi) sigaranın miktarına bağlı olarak bozulduğu bulunmuştur (101).

Sigara dumanındaki metabolitlerden bazıları seminal reaktif oksijen radikallerinin (ROS) düzeyini artırabilir. ROS oksidasyon nedeniyle sperm DNA'sı ve membrane fosfolipidleri için zararlıdır. Sigara içilmesi semendeki lökosit infiltrasyonunu artırabilir. Lökositler ejakulattaki major ROS kaynağıdır (102,103).

Sigara dumanına maruz kalmak Leydig ve Sertoli hücrelerinde sekretuar yetmezlikle sonuçlanmakta ve epididimal sperm maturasyon süresinin bozulmasına ve spermatozoaların oositleri penetre etme kapasitesinin azalmasına yol açmaktadır. İlave olarak ebeveynin sigara dumanına maruz kalması embriyonik implantasyon yeteneğini de etkilemektedir (87).

Sigaranın metaboliti olan kadmiyumun, deney hayvanlarında testiküler hasara yol açtığı ve sperm fonksiyonlarını değiştirdiği gösterilmiştir. Hava yolu ile alınan kadmiyum testise ulaşarak birikir. Testiste vasküler endotelde hasara yol açar ve intratestiküler ödem ve hücreler arası sıvı basıncının artmasına neden olur (90).

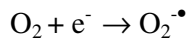
II.2. SİGARA, OKSİDATİF STRES, ANTİOKSİDAN SİSTEM VE REPRODÜKTİF SİSTEM İLİŞKİSİ

II.2.1. Serbest Radikaller

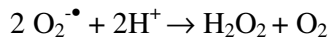
Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girerek onların yapısını bozan moleküllere “serbest radikaller” denmektedir. Çeşitli patolojik durumlarda yapımı artan bu ürünler, hücresel makromoleküller ile reaksiyona girerek hücre hasarını oluştururlar. Serbest radikaller, tek elektronlu iki molekül oluşması ile sonuçlanan normal moleküldeki kovalen bağın klivajı, normal molekülden tek elektron kaybının olması yada normal bir moleküle tek elektron eklenmesi ile oluşabilir (18,19,104).

II.2.2. Reaktif Oksijen Radikalleri (Reaktive Oxygen Species-ROS)

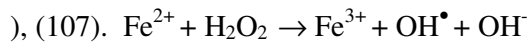
Reaktif oksijen radikalleri, moleküler oksijenden türemiş olup dış yörüngelerinde bir adet çiftlenmemiş elektron (e^-) içeren, atom ya da moleküllerdir (105,106). Moleküler oksijenin tek elektronla indirgenmesi sonucu $O_2^{\bullet-}$ ortaya çıkar.

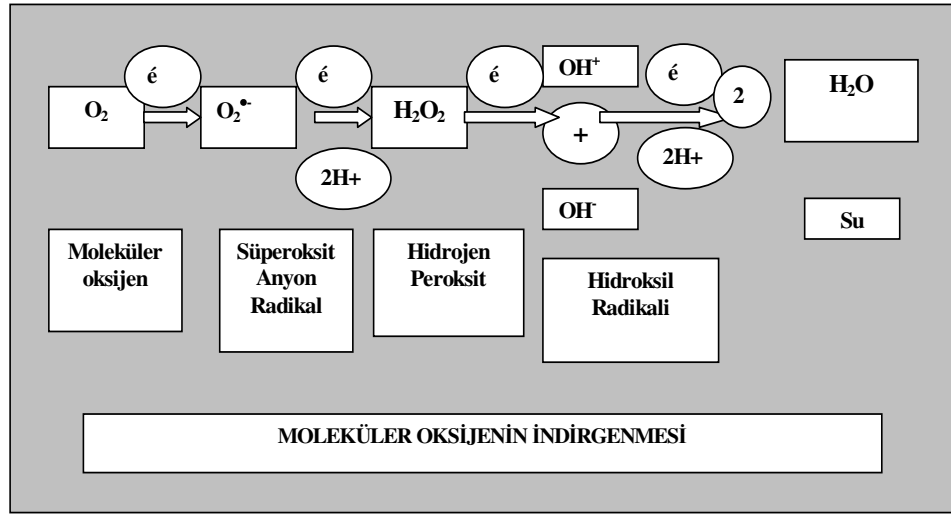


SOD enziminin katalize ettiği bir reaksiyon ile $O_2^{\bullet-}$ H_2O_2 'ye dönüşür.



H_2O_2 'den mitokondri içinde “Fenton reaksiyonu” ile “hidroksil radikali (OH^{\bullet})” oluşmaktadır. Hidroksil radikali ROS ürünleri arasında en toksik olanıdır (Şekil II.2.

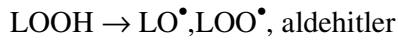
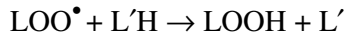
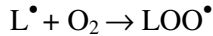
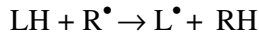




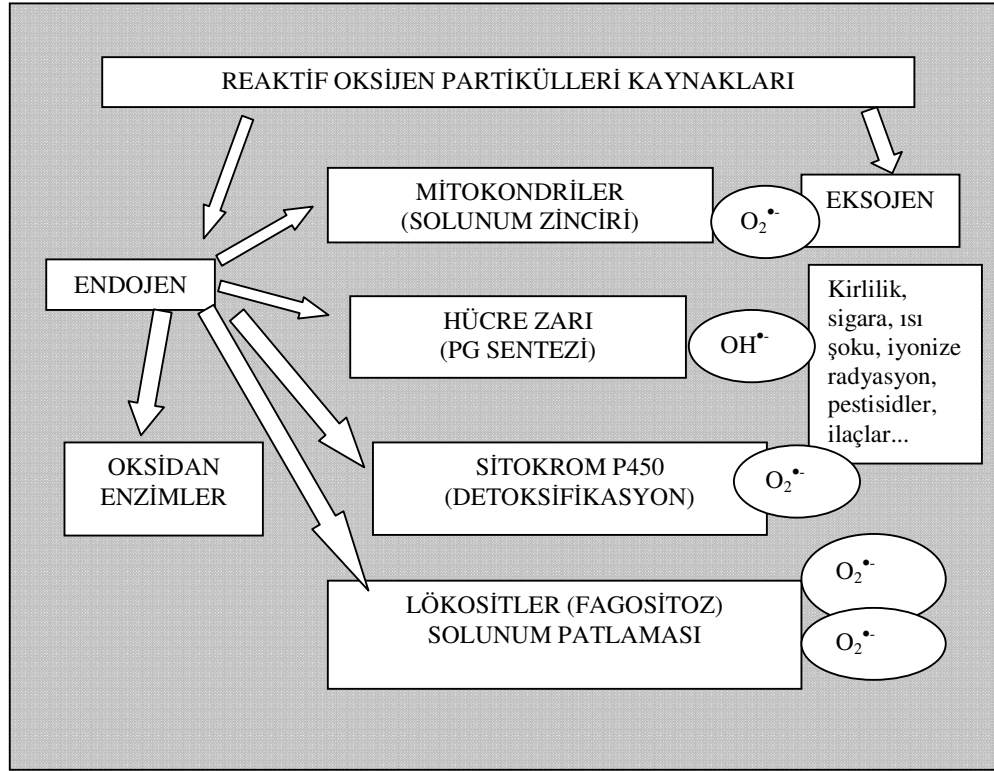
Şekil II.2. Moleküler oksijenin indirgenmesi.

3.3. Hücrelerde Serbest Radikal Üretimi

Normal şartlarda organizmadaki serbest radikallerin ana kaynağı mitokondri veya endoplazmik retikulumdaki elektron transpot zincirinden olan elektron kaçıdır. İskemi, inflamasyon ve radyasyon gibi etkenler bu üretimi arttırlar. Serbest radikallerin oluşturduğu hasara en duyarlı olan moleküller lipidlerdir. Hücre membranları poliansatüre yağ asitleri yönünden zengin oldukları için kolaylıkla ROS'den etkilenirler. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif destrüksiyonu sonucu bir zincir reaksiyonu başlar ve bu durum "lipid peroksidasyonu" olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonu membran lipidlerini etkilemesi nedeni ile membran işlevini bozar ve doku hasarına neden olur (Şekil II.3.),(108,109).



Proteinler ve nükleik asitler ROS saldırısına poliunsatüre yağ asitlerine oranla daha az duyarlıdır (108,109).



Şekil II.3. Reaktif oksijen partikülleri kaynakları.

II.2.4. Serbest Radikallere Karşı Hüresel Defans

Belirli düzeyi aşmış olan oksidanlara doğrudan etki ederek onları inaktif hale getiren bu maddelere “antioksidanlar” denmektedir (Tablo II.3.). Antioksidanlar hücre zarında veya intrasellüler sıvıda bulunabilecekleri gibi enzim veya non-enzim yapısında olabilirler ve genellikle serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya daha önce oluşan partikülleri etkisiz hale getirerek etki gösterirler (19).

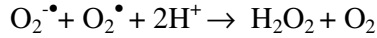
Tablo II.3. Antioksidanlar.

ANTIOKSİDANLAR	
DOĞAL ANTIOKSİDANLAR	ANTIOKSİDAN İLAÇLAR
<p>ENZİMLER: SOD, Katalaz, Glutatyon peroksidaz, Glutatyon Redüktaz, G6PDH, Sitokrom C oksidaz...</p> <p>MAKROMOLEKÜLLER: Serloplazmin, Transferin, Ferritin, Hemoglobin, Myoglobin</p> <p>MİKROMOLEKÜLLER: Vit. E, Vit. C, Vit. A, Glutatyon, N-asetil sistein, Ürat, Glikoz, Bilürübin.</p>	<p>Rekombinant h-SOD</p> <p>Ebselen</p> <p>Aminosteroidler</p> <p>Demir şelatörleri</p> <p>Sitokinler</p> <p>Ksantin oksidaz inhibitörleri</p> <p>Mannitol</p> <p>Barbitüratlar</p> <p>Flavanoidler...</p>

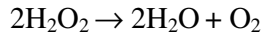
Antioksidanlar dört farklı mekanizma kullanarak etki ederler:

- (1) Çöpçü etki (Scavenging effect) : Oksidanları tutup zayıf bir molekül haline getirip etkisizleştirmektir (doğal antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller).
- (2) Söndürücü etki (Quencher effect) : Serbest radikallerle reaksiyona girilerek onlara bir hidrojen aktarılmak suretiyle aktivitelerinin söndürülmesi ve inaktif hale getirilmesidir (Vitaminler, flavonoidler).
- (3) Onarım etkisi (Repair effect) : Serbest radikallerin hasar verdiği biomoleküller birikerek hücre metabolizmasına ve viabilitesine hasar vermeden temizlenmektedir. Bu prosese onarım etkisi denilmektedir.
- (4) Zincir kırıcı etki (Chain breaking effect) : Hemoglobin, seruloplazmin, ağır mineraller, oksidanları bağlar ve zincirlerini kırar (19,106).

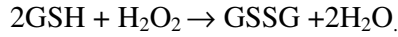
Oluşan ROS'e karşı organizma kendini korumak için süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerini kullanır. Süperoksit dimutaz enzimi, süperoksit radikalinin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler:



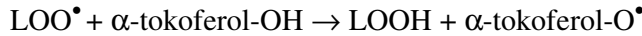
Katalaz hidrojen peroksidi parçalar:



Glutatyon peroksidaz enzimi ise redükte glutatyonu kullanarak hidrojen peroksiti parçalar:



Hücre membranında bulunan en önemli zincir antioksidan α -tokoferoldür. Lipid peroksil radikaliyle etkileşerek lipid zincir reaksiyonunu sonlandırır:



Antioksidan enzimler oluşan bütün oksijen kaynaklı radikallerin alınmasında tümüyle etkili değildir ve tamir sistemleri yanında diğer defans sistemleri gerekir. Bazı proteinler, lipid peroksidasyonundan korunmaya yardımcı olabilir. Transferin gibi proteinlere bağlı demir iyonları hidroksil radikali oluşumu veya lipid peroksidasyonunu uyarmayabilir (Tablo II.4.).

α -tokoferol yanında yine önemli bir antioksidan olan askorbik asit belirtilmelidir. Bunun yanında β -karoten, likopen ve retinol stearat antioksidan olarak sayılabilir (107,110).

Tablo II.4. Major antioksidanların yapısı ve etkisi.

ANTIOKSİDAN	YAPISI	YERİ	ETKİSİ
SOD	CuZn-SOD Mn-SOD Cu-SOD	Sitozol-nükleus Mitokondri Plazma	O ₂ 'in H ₂ O ₂ 'ye dismutasyonu
KATALAZ	Tetramerik Hemoprotein	Peroksizomlar	H ₂ O ₂ 'nin dismutasyonu
GSH PEROKSİDAZ	Selenoprotein	Sitozol-mitokondri	H ₂ O ₂ 've lipit peroksitlerin redüksiyonu
GSH REDÜKTAZ	Dimerik Protein	Sitozol-mitokondri	GSSG'ninGSH'ya dönüşümü
VİTAMİN E	Yağda eriyen vit.	Lipit membranlar Ekstrasellüler sıvılar	Lipit peroksitleri inaktivasyonu peroksidasyon zincirinin kırılması
VİTAMİN C	Suda eriyen vit.	Hücre içi-dışı sıvılar	O ₂ [•] ve OH [•] indirekt scavengeri, Vit E rejenerasyonu
GSH	Tripeptid	Hücre içi ve alveoller	O ₂ [•] ve OH [•] 'e direkt etkili enzimler için substrat

Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen radikalleri üretilir. Serbest radikaller hücrelerde membran lipidleri, proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerine çok sayıda farklı moleküller yoluyla oksidatif hasara neden olurlar (111).

Sigara içenlerde, sigara içmeyenlere göre periferik lökosit sayısının daha yüksek olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Sigara içenlerin lökositleri invitro olarak uyarıldığında daha fazla serbest radikal üretirler (112). Sigara içenlerin nötrofillerinde myeloperoksidaz aktivitesi daha fazladır (113).

Sigara dumanının gaz fazıyla lipid peroksidasyondaki artış arasında pozitif korelasyon vardır. Yapılan bir çalışmada lipid peroksidasyonun önlenmesinde, ürik asidin küçük de olsa bir etkisi olduğu bulunmuştur. Ürik asit demir gibi geçiş metalleriyle şelat teşkil ederek veya doğrudan radikalle etkileşerek antioksidan etkisini gösterebilir (114).

ROS 'un nötrofillerde glutasyon sentezini stimüle ettiği ve bunun yanında tüketiminin hızlandığı gösterilmiştir (115). Bir çalışmada, aktive olmuş lökositler tarafından üretilen süperoksit radikalının askorbik asit tarafından temizlendiği ve

askorbik asidin inflamasyonda oksijen radikal hasarına karşı fizyolojik koruyucu bir ajan olarak hizmet ettiği bildirilmiştir (116).

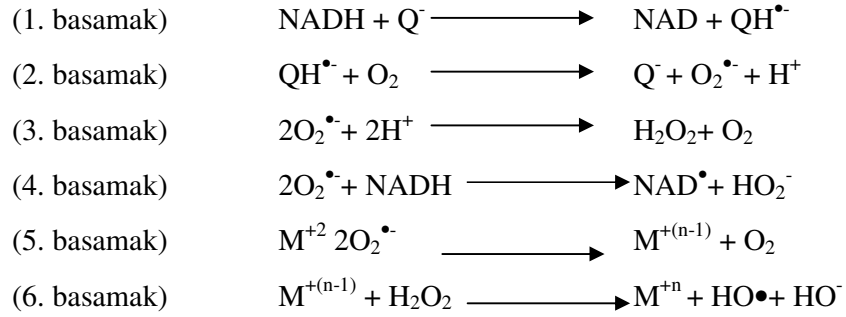
Başka bir çalışmada sigara dumanına maruz kalan deney hayvanlarında, alveolar makrofajlarda antioksidan enzimlerden SOD ve katalaz enzimlerinin artışı gösterilmiştir (117).

Sigara içenlerde, eritrosit membran stabilitesinin, oksidan strese karşı korunmasında önemi olan eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenazın ve antioksidan savunmada rol alan eritrosit glutatyon peroksidazın enzim aktivitelerinin azaldığı da saptanmıştır (118).

Sigara dumanının etkisiyle proteinlerde değişiklik olduğu ve bu değişikliklere sigara dumanının içerdiği radikaller yanında, radikal olmayan diğer bileşiklerin de etkisi olduğu bildirilmiştir (119).

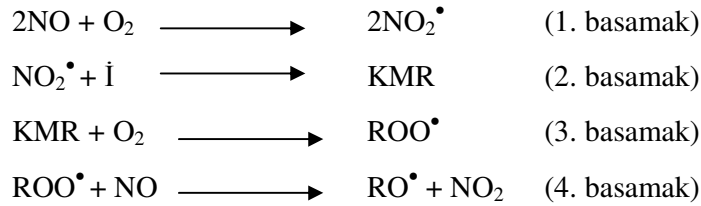
Sigara dumanının katran fazında organik bileşikler, kinonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve serbest radikaller bulunur. Katran radikalleri olarak kinon (Q), semikinon (QH), hidrokinon (OH₂) tanımlanmıştır. NADH kinon gruplarını, semikinona indirger (1. basamak). Semikinon oksijene elektron vererek süperoksit radikali oluşturabilir (2. basamak), hidrojenperoksit oluşur (3. basamak). Metal iyonları eklenmesi oksidasyonu hızlandırırken, SOD eklenmesi NADH'nın oksidasyonunu inhibe eder (4. basamak). Metal iyonları eklenmesi ile oluşan hızlanma Fenton tipi reaksiyonların sonucudur (5.-6. basamak),(Tablo II.5.).

Tablo II.5. Q/QH₂ polimerlerinin, serbest oksijen radikal türlerini oluşturması.



Sigara dumanının gaz fazı yanma sonucu oluşan karbon ve oksijen merkezli serbest radikalleri yüksek konsantrasyonda içerir. Azot monoksit(NO), çok daha reaktif olan azot dioksite (NO₂) okside olur (1. basamak). Azot dioksit isopren gibi radikallerle reaksiyona girip karbon merkezli radikaller oluşturur (2. basamak). Bu karbon merkezli radikaller dumandaki oksijenle hızla peroksil radikallerine dönüşür (3. basamak). Peroksil radikalleri de NO ile alkoksil radikallerini oluşturur (4. basamak),(Tablo II.6.),(120).

Tablo II.6. Gaz fazında NO ve NO₂'nin peroksil ve alkoksil radikallerini oluşturması.



NO : Azot monoksit

NO₂ : Azot dioksit

$\dot{\text{I}}$: İzopren

KMR : Karbon merkezli radikaller

ROO^\bullet : Peroksil radikali

RO^\bullet : Alkoksil radikali

II.2.5. ROS ve Reprodüktif Sistem

II.2.5.a. Kadın Reprodüktif Sistemi ve ROS:

Oksidatif stres memelilerdeki tüm hücrelerde hasara yol açarlar. Bu nedenle oositlerin üreme fonksiyonlarını etkilerler. Oksidatif stres, aşırı ROS üretimi veya antioksidan savunma mekanizmasının hasara uğraması sonucunda ortaya çıkar (121).

Oksidatif stresin dişi üreme sistemi üzerindeki etkisi çok az araştırılmış bir konudur. Agarwal ve ark. yaptıkları çalışmalarında, peritoneal sıvıdaki ROS seviyeleri ile farklı dişi infertilite problemleri arasındaki ilişkiyi tanımlamaya çalışmışlardır (122). Endometriyosis ve idiyatik infertilite olgularının peritoneal sıvılarında ROS saptadılar. Endometriyosis ve kontrol grubu olguların arasındaki ROS seviyesinin farklılığı anlamlı olmadığı halde, idiyatik infertilite olguları ile kontrol grubu arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur. Bu bulgular, ROS'un idiyatik infertilitede rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Başka bir çalışmada, folliküler sıvıdaki ROS seviyeleri ile oosit matürasyonu ve gebelik arasındaki ilişki araştırılmıştır (123). Araştırmacılar folliküler sıvı ROS

seviyelerinin yardımcı üreme tekniklerindeki başarıyı öngörmeye kullanılabilecek potansiyel bir belirteç olduğunu bildirmişlerdir.

Jozwick ve ark. serum ve pre-ovuluar folliküler sıvıdaki Oksidatif stres belirteçlerinin seviyelerini karşılaştırdılar ve folliküler sıvıda daha düşük düzeylerin bulunduğunu buldular. Çalışmalarında gebe ve gebe olmayan kadınların folliküler sıvılarındaki ROS seviyeleri arasında hiçbir anlamlı farklılık bulunamadı. Fertilizasyon oranı ile ROS seviyeleri arasında da ilişki bulunmadığını saptadılar (124).

Oyawoye ve ark. IVF vakalarında folliküler sıvı ROS seviyelerini araştırdılar ve başarılı şekilde fertilize ve transfer edilen oositlerdeki Oksidatif stres belirteci seviyelerinin belirgin şekilde düşük olduğunu bildirdiler ve ROS'un dişi üreme sisteminde önemli bir role sahip olduğunu ifade ettiler (125).

Uterustaki ROS üretimi, steroid hormonların varlığı ile ilişkilidir. Uterusta estradiol, peroksidaz aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Peroksidazların etkili bir bakterisidal çevre oluşturduğu ve estrogen düzeylerinin kontrolüne etki yaptığı düşünülmektedir. Peroksidazlar H_2O_2 'i substrat olarak kullanmakta ve H_2O_2 düzeyleri ise in vitro şartlarda estrogen varlığında artış göstermektedir. H_2O_2 hem enzimatik hem de non enzimatik yollarla prostaglandinlerin üretiminde, doğum eyleminde ve prematür eylemde rolü olabileceği düşünülmektedir (126,127,128).

Süperoksitdismutaz (SOD)'ın ovülasyonda rolü olduğu da düşünülmektedir. Ayrıca ROS'in fosfolipazları aktive ederek ovülasyon için gerekli olan prostaglandin sentezine katkıda bulunduğu ve bunun yanında H_2O_2 'in folliküler atrezi gelişiminde rolü olabileceği sanılmaktadır (129,130).

Foliküldeki peroksidasyon yoğunluğu serumdan çok daha düşük seviyede gözükmekte olup oosit çevresinde etkili bir antioksidan savunmasının bulunduğu işaret etmektedir (124). Follikül sıvısında biriken östrojenlerin de antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu düşünülmektedir (131) ayrıca follikül sıvısında glutatyon peroksidaz aktivitesi yüksekliği ile oosit fertilizasyon oranı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (132).

Yapılan bir çalışmanın sonucunda eksojen gonadotropin uygulanmasının follikül sıvısı demir içeriği üzerine uyarıcı etki yapmasının antioksidanlarla engellendiği düşünülmüştür (133).

Gametlerin tuba uterinadaki fertilizasyon sahasında maruz kaldıkları oksidatif stres derecesi veya insan embriyosunun tüpten uterin implantasyon sahasına ilerlerken karşılaştığı oksidatif stres derecesi henüz tanımlanmamıştır; çünkü henüz bu çevredeki gerçek antioksidan durumu bilinmemektedir (26).

Korpus luteum memelilerdeki progesteron üretiminden ve erken gebeliğin idamesinden sorumludur. Ovaryan dokudaki ROS üretiminin sonucu olarak luteal hücre plazma membranı içinde lipid peroksidasyonu olur. Bu durum gonadotropin reseptörlerinin gözle görülür kaybı, siklik AMP oluşumunda azalma ve regresyon fazında korpus luteumun steroidogenez yeteneğinin azalmasıyla da birliktelik gösterir (134,135).

Kadınlarda uygulanan oral antioksidan tedavisiyle ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Erkeklerde olduğu gibi oral antioksidanların over, follikül sıvısı, tuba uterine gibi hedef sahalara ulaşip ulaşmadığı belirsizdir. Bununla birlikte, nikotin metabolitlerini kapsayan toksik maddeler bu bölgelere ulaşmaktadırlar. Böylece folliküler savunmaların aşıldığı ve optimal ilaçlar ve dozlar bilinmemesine rağmen antioksidan tedavisine kompanze edilen belirli şartların bulunduğunu öne sürmek mantıklıdır (26).

Reproduktif anlamda oral antioksidanların güvenli doz eşiği bilinmemektedir. Yüksek dozlardaki retinoitler embriyotoksik olabilirler ve nöral oluk veya tüp, kas iskelet sistemi ve ürogenital anomalilere yol açan teratojenik etkiler gösterebilirler. Yüksek dozlardaki askorbik asit, ovaryan steroidogenezin inhibisyonuyla birliktelik gösterir (26).

ROS'un endometrioste rolü olabileceği ve ayrıca ileri evrelerinde azalmış fertilité ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir (136).

II.2.5.b. Erkek Reprodüktif Sistemi ve ROS

İnsan spermatozoası için motilite azalması, anormal morfoloji, sperm-yumurta penetrasyonundaki azalmayla sperm fonksiyon bozukluğunu ROS ile ilişkilendiren birçok rapor yayımlanmıştır (26).

Sperm membranı poliansatüre yağ asidinin yüksek olması nedeniyle ROS'un oluşturabileceği hasarlara karşı duyarlıdır. H_2O_2 , lipit peroksidleri ve yıkım ürünleri, sperm için ileri derecede toksiktir ve irreversible motilite kaybına neden olabilir. Ancak motilite dışındaki geleneksel semen özellikleri oksidatif durumdan etkilenmemelerine rağmen motilite konusuna yönelik hasar mekanizması çeşitli erkek infertilite sebeplerinin nedeni olabilir (137,138).

Normal olguların %15'inde, oligospermik olguların %40'ında ve spinal hasara sahip olguların %96'sında semende yüksek konsantrasyonda ROS bulunmuştur. İnfertil erkekler, fertil bireylere nazaran total antioksidan kapasitesinin baskılamasına ve daha düşük bireysel antioksidan seviyesi sergilenmesine daha yatkındırlar (139,140).

Spontan gebelik insidansı: yüksek ROS konsantrasyonu sergileyen oligospermik erkeklerin yaklaşık %50'sindeki ROS oluşum süreciyle negatif yönde korelidir (141). Astenozoospermi hastalarının seminal plazmalarındaki ROS konsantrasyonu artmış olup ROS kaynaklı sperm membran hasarı da artmıştır. Ancak oksidatif hasarın testis, epididim veya semenden hangisinde ortaya çıktığı hala belirsizdir. Defektif spermatogenez neticesinde aşırı miktarda rezidüel sitoplazma retansiyonu ile karakterize olan anormal sperm, semende ROS kaynağıdır (142). Saflaştırılmamış semen örneklerindeki primer ROS kaynağının kontamine lökositler olduğu yönünde genel bir kabul bulunmaktadır (143,144).

Süperoksit dismutaz (SOD)'ın, duktus deferens, prostat, seminal vezikül gibi erkek reprodüktif sisteminde geniş dağılımı, O_2^{\bullet} 'in olumsuz etkilerine karşı, lokal bir savunma mekanizması olabileceğini düşündürmektedir (145).

Sperm, çeşitli antioksidan yakalayıcı savunma mekanizmaları oluşturur. Bu konudaki temel savunma mekanizması, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon-peroksidaz-redüktaz sistemidir (146,147).

Hücre dışındaki SOD, SOD'a bağlanmayanlarla karşılaştırıldığında daha uzun motilite gösteren sperm alt grubunun boyun bölgesine bağlanır ve hem sperm bağlayan SOD oranı hem de total SOD aktivitesi örnekler arasında geniş oranda farklılıklar gösterir; bununla birlikte bu bulgunun herhangi bir reproduktif anlama sahip olup olmadığı hala bilinmemektedir. Görünürde işlevsel olan bu savunma mekanizmalarına rağmen matür sperm yeterince korunamadığı da ileri sürülmüştür. Bunun nedenleri sitoplazma eksikliğine bağlı olarak SOD benzeri enzimlerin göreceli eksikliği ile birlikte membrandaki yüksek konsantrasyonlu doymamış lipit içeriğidir (141).

Bu durum diğer biyolojik sınırların aksine belirgin konsantrasyonlarda SOD, ksantin oksidaz, nitrik oksit, katalaz, glutasyon peroksidaza ilaveten askorbit asit, tiol, ürik asit, alfa-tokoferol ve yüksek seviyede glutasyon içeren seminal plazmadaki güçlü antioksidan sistemi tarafından kompanze edilir (148,149,150).

Sperm hücresi kısıtlı sitoplazmasına rağmen fonksiyonel konsantrasyonda antioksidan enzim bulundurur. Sperm savunma mekanizmaları sadece fertilizasyon başarlana kadar sperm survisini teminat altına almaya gerek duyarlar; daha sonra kadın üreme traktından uzaklaştırılırlar. Bununla birlikte, yetersiz savunmanın prematür fonksiyon kaybına yol açtığı ve böylece fertilitiyi bozduğu bilinmektedir. Bu nedenle dengenin kesin şekilde korunması önemlidir (147,151).

Epididim, sperm depolaması ve matürasyonunun optimal bölgesi olup, aynı zamanda oksidatif saldırıya karşı korunma sağlama kapasitesine sahiptir. Bu yüzden epididim hem seminal plazmaya katkıda bulunur hem de epididimal deponun korunmasında rol oynar. Ayrıca sperm fonksiyonel kompetansının aktivasyonunda önemli olan, bölgeye spesifik antioksidan aktivitesini de sağlar (26). Golden hamsterleri kullanılarak yapılan güncel bir deneyde, çeşitli antioksidanları sekrete eden erkek aksesuar seks bezleri alınmış ve bunun sonucu olarak özellikle epididimdeki spermelerde oksidatif hasar artışına bağlı olarak DNA fragmentasyonun arttığı gösterilmiştir (152).

Yapılan bir çalışmada, ROS oluşumuna bağlı olarak sperm oosit füzyonun olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Antioksidan bir vitamin olan E vitamininin ise sperm peroksidatif hasara karşı koruduğu, motilite kaybını azalttığı, ve yüksek

konsantrasyonlarda hamster yumurta penetrasyon testinde sperm performansını artırdığı bildirilmiştir (136).

Vitamin A (retinoit ve karotenoid) vitamin E ve/veya vitamin C alımının laboratuvar ve çiftlik hayvanlarında reproduktif fonksiyonu arttırmada etkili bir strateji olduğu bildirilmiştir (153,154,155).

Farelerde diyetin vitamin C ve E ile zenginleştirilmesi eksojen ovaryan stimülasyon sonrasında görülen yaşa bağlı ovulasyon oranındaki düşüşü önlemeye yardımcı olmuştur. Bu diyet, anne yaşının hem MII işi hücre üzerindeki kromozom dağılımına hem de oositlerin ilk mayotik bölünmesinde gözlenen kromozom segregasyonuna etkileyerek bunları nötröle etmiştir (156).

İnsanlardaki oral suplementasyon vakası daha tartışmalıdır. Spermatozoanın ROS'ne karşı kendi antioksidan savunma mekanizması mevcuttur. Bu nedenle oral antioksidan verilmesine ihtiyaç duyulması için, erkek ve kadın üreme yollarındaki spermatozoanın kendi savunma mekanizmasının yetemeyeceği miktarda oksidatif stresle karşılaşması ve verilen bu antioksidanların üreme yollarındaki spermatazoldaki antioksidan seviyelerini artırıp arttırmadığına bağlıdır (157,158).

Bazı çalışmalarda, oral antioksidanlar sigara tiryakilerinde ve erkek faktörlü infertil hastalarda sperm kalitesini arttırmışlardır. Aynı zamanda semeninde yüksek düzeyde ROS bulunan sağlıklı erkekler ile geçmişte yapılan IVF sikluslarından düşük fertilizasyon oranı gösteren fertil normospermik erkeklerdeki fertilizasyon potansiyelini arttırmışlardır (22,23,24).

Erkek subfertilite tedavisi olarak oral antioksidan uygulamasının etkinliği şüphelidir. Rolf ve ark. prospektif çift kör bir çalışmada hastaları 8 hafta süreyle günlük vitamin C + E veya plasebo ile tedavi etmişler. Bununla birlikte semen parametrelerinde hiçbir değişiklik gözlenmediğini ve hiçbir gebelik gerçekleşmediğini bildirdiler (25). Bu çalışmada görülen etki eksikliğinin, örneklemin küçük olmasına, kullanılan vitaminlerin kombinasyonuna, dozuna veya hasta seçimine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Vitamin C ve E ayrı ayrı verildiğinde spermi oksidatif hasara karşı korur; ancak kombine halde oksidatif hasarı indükleyebilir; çünkü vitamin C belirli şartlarda Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen Fenton reaksiyonunu tetikleyerek prooksidan şekilde davranır. Sertoli hücrelerinde meydana gelen demir alışverişi spermatogenezde önemli bir rol oynadığından

vitamin C nin prooksidan etkisinin bu seviyede işlev görüyor olması akla yatkındır. Yine oral vitamin E uygulamasının seminal plazmadaki konsantrasyonu artırıp arttırmadığı yönünde bazı belirsizlikler bulunmaktadır. Motil sperm yüzdesi elbette spermın vitamin E konsantrasyonu ile ilişkilidir; böylece seminal plazmadaki total vitamin E konsantrasyonu ile her bir sperm içindeki konsantrasyon arasında herhangi bir ilişki gösterilememiş olmasına rağmen, hücre içinde vitamin E inkorporasyonu meydana gelebilir (25).

II.3. E VİTAMİNİ

E vitamini ilk kez 1972 yılında Evans ve Bishop tarafından bulunmuştur. Esansiyel ve yağda eriyen bir vitamindir. Vitamin E, alfa, beta, gamma ve delta tokoferoller ile tokotrienollerden oluşan 8 ayrı maddenin grup adıdır. Alfa tokoferol en yüksek biyolojik aktivitesi olan vit E bileşiğidir (159,160,161).

Reaktif oksijen partiküllerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücut tarafından antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Alfa tokoferol (E vitamini) antioksidanlardandır (162,163).

E vitamini, insan dokusunda etkisini erken dönemde serbest radikalleri bağlayarak, hücre membranlarını serbest radikallerin zararından koruyarak yapmaktadır. Biyolojik membranlarda bulunan yağda çözünen ve zincir kırıcı özelliği olan en önemli antioksidandır (21,164,165).

Vitamin E, hücre membranlarında düşük konsantrasyonlarda bulunmasına karşın doğada var olan en etkili lipide erir antioksidandır (166). Vitamin E şiddetli eksikliğinde bile diğer eksojen ve endojen antioksidanlardan karşılanamaz (167). Membran fonksiyonu ve yapısında önemli rol oynayan E vitamini hücre membranındaki doymamış yağ asitlerini koruma özelliğindedir. Vitamin E'nin alımı immün cevabı güçlendirmektedir. Trombositlerin siklooksijenaz aktivitesini azaltarak trombosit agregasyonunu düzenler. Ayrıca nükleik asid ve protein metabolizmasında, mitokondrial fonksiyonlar ve hormonal üretimde rolü olduğu gösterilmiştir. Vitamin E, Glutasyon peroksidaz enziminin bir parçası olan selenyumun kaybedilmemesinde ve vücutta A vitamininin parçalanmasının engellenmesinde de önemli rol oynar (168,169).

Hayvan çalışmalarında E vitamininin, anti kanserojen etkileri ile kanser hücrelerini seçici biçimde tahrip ederek, kanser oluşma sıklığını ve gelişimini azalttıkları bildirilmiştir (170).

E vitamininin trombosit kümelenmesini azalttığı ve trombosit kümelenmesini artıran prostaglandinlerin yapımını inhibe ettiği gözlenmiştir. Vitamin E aynı zamanda prostasiklin yapımını arttırmaktadır. Trombositler üzerine olan etkisi ile, ateroskleroz geliştirme eğilimini azaltmaya yardımcı olabilmektedir (171,172).

E vitamininin deney hayvanlarında beyin, omurilik, kalp, ve karaciğer gibi organlardaki iskemik doku hasarını önlediği gösterilmiştir (173).

E vitamini ve diğer antioksidanların koroner kalp hastalığında önemli düzeyde koruyucu ajanlar olduğu gösterilmiştir (174).

Serbest radikallerin yaşlanma üzerine etkilerini, yeterli bir antioksidan koruması için optimal antioksidan alınımı ile engelleyerek, uzun ve sağlıklı bir hayat sağlayabileceğini gösteren araştırmalar vardır. Kan akımı ölçümlerinde, antioksidan alan olguların beyinlerinde kan akımının arttığı gözlenmiştir. E vitamini alımının katarakt oluşumunu engellemediği ancak başlamasını ve gelişimini yavaşlattığını düşündüren bulgular vardır (175,176,177).

II.3.1. Vitamin E'nin Emilimi ve Taşınması

Vitamin E'nin absorpsiyonu intestinal yağ absorpsiyonu ile birlikte dir. Tokoferol barsaklardan emilerek lenfatik sisteme ulaşır ve şilomikronların bir komponenti olarak kana geçer ve düşük dansiteli lipoprotein şeklinde taşınır. E vitamini emilimi, yağ emiliminin düzeyi ile doğrudan ilişkilidir (159,178). α -tokoferol (%87) insan plazmasındaki en önemli tokoferoldür. Dokularda en yüksek düzeyde yağdan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Özellikle adipoz doku, adrenal, hipofiz, testis, trombositler, kalp dokusu, kas, karaciğer, over, uterusu yüksek miktarlarda bulunur. Normal populasyonda plazma düzeyi 0,5-1,6 mg/dl 'dir (179,180).

II.3.2. Vitamin E Eksikliği

Normal sindirim, emilim veya diyetle alınan yağın taşınması gibi fizyolojik olaylarla etkileşen durumlarda serum E vitamini düzeyleri düşmektedir (Çölyak, bilier atrezi, kistik fibrozis, abetalipoproteinemi,intestinal rezeksiyon v.b.). Kronik malabsorbsiyon sendromu vakalarında, prematüre bebeklerde ve total parenteral beslenme tedavisi görenlerde dışardan E vitamini ilave edilir. Eksikliğinde platelet agregasyonun artması, kanser, ateroskleroz, Alzheimer, Parkinson, kardiovasküler, nöromusküler disfonksiyon ortaya çıkabilir (21,179,180,181,182).

II.3.3. Vitamin E Toksisitesi

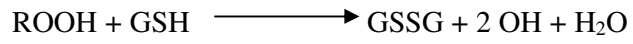
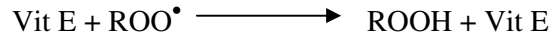
Kronik olarak yüksek dozlarda alındığında toksisite görülebilmektedir. Özellikle trombositlerin adezyon ve agregasyonunu azaltır, K vitaminine bağlı pıhtılaşma faktörlerini inhibe eder (183,184).

II.3.4. Vitamin E Kaynakları

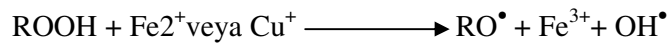
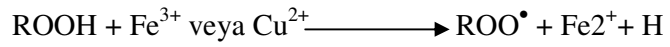
Bitkisel yağlar (özellikle soya, ayçiçeği, mısır, fındık yağları) ve tahıllar E vitamini açısından zengindir. Sentetik E vitamini ise rasemik alfa-tokoferol veya dl-alfa-tokoferol stereoisomerlerin bir karışımı olup trimetilhidrokinon'un (TMHQ) izofital ile kimyasal olarak birleşmesi ile elde edilir. Genel olarak plazma E vitamini düzeyleri 0,5 mg/dl'den düşük bireylerde E vitamini eksikliği söz konusudur. Diyetle alınan günlük 10-30 mg E vitamini, serum düzeylerinin normal sınırlarda tutulması için yeterlidir (179,180,185).

II.3.5. E Vitamini Antioksidan Özelliği

E vitamini predominant olarak yağ dokusunda bulunmakla birlikte plazma, eritrosit, trombosit gibi pek çok yerde birikebilir. E vitamini peroksidlenmiş poliansatüre yağ asidinin peroksil serbest radikale, hidrojen transfer ederek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu kırmaktadır. Eritrosit membranını H₂O₂'ye karşı korur. Lökositlerde araşidonik asitin lipooksijenasyonunu yönlendirir. Akut dönemde lipit peroksidasyonu ile açığa çıkan peroksilipit (ROO[•]), lipofilik özelliğinden dolayı membranda erimiş halde bulunan vitamin E ile reaksiyona girer. Glutatyon, lipit hidroperoksit (ROOH) ile reaksiyona girerek onu etkisiz hale getirir (178,183,186).



Düzeyi artan lipithidroperoksit (ROOH), serbestleşen Fe^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cu^+ , ile reaksiyona girerek daha güçlü radikallere dönmektedir. Doğal enzimler veya GSH yetersiz ise (O^\bullet) ve (H_2O_2) ortamda serbest olan Fe^{3+} veya Cu^{2+} katalizörlüğünde birleşerek en güçlü radikal olan (OH^\bullet) radikalini oluşturmaktadır (HABER-WEİS REAKSİYONU);



III.YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alınarak yapıldı (Proje Numarası: PR-05-11-01-2). Kullanılan BALB-c fareler 12-14 haftalık ortalama ağırlıkları $25,19 \pm 4,34$ (min: 17,10; max: 36) gr. olan farelerdi. Fareler, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, DETAM'dan temin edildi. Çalışmada 28 dişi, 12 erkek fare kullanıldı. Deney süresi 10 hafta idi. Erkek ve dişi fareler ayrı kafeslerde tutularak, temel olarak sekiz deney grubu oluşturuldu.

Deney Grupları:

A₁ grubu (KD): Kontrol dişi fareler (n=7)

B₁ grubu (SDD): Sigara dumanına maruz bırakılan dişi fareler (n=7)

C₁ grubu (AOD): Antoksidan (Vitamin E) verilen dişi fareler (n=7)

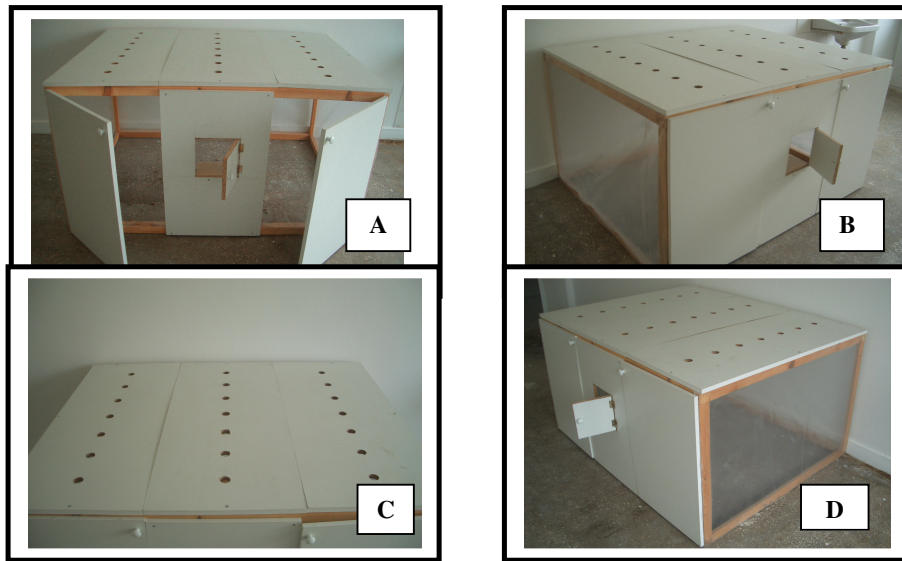
D₁ grubu (SDAOD): Sigara dumanı ile beraber antioksidan (Vitamin E) verilen dişi fareler (n=7)

A₂ grubu (KE) : Kontrol erkek fareler (n=3)

B₂ grubu (SDE): Sigara dumanına maruz bırakılan erkek fareler (n=3)

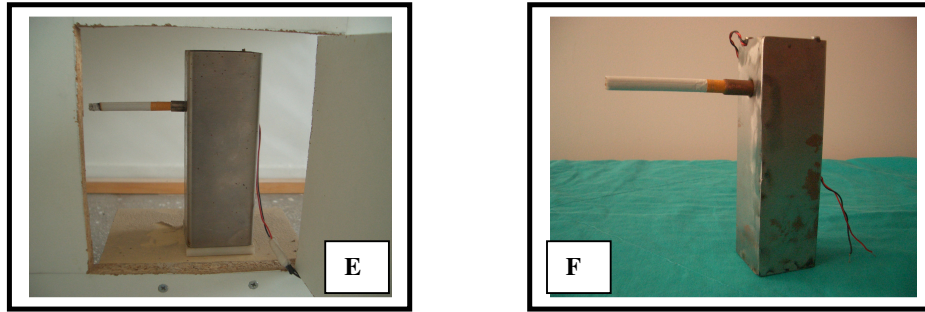
C₂ grubu (AOE): Antoksidan (Vitamin E) verilen erkek fareler (n=3)

D₂ grubu (SDAOE) : Sigara dumanı ile beraber antioksidan (Vitamin E) verilen erkek fareler (n=3)



Şekil. III.1. Fareleri sigara dumanına maruz bıraktığımız kafesin görünümü (Resim A,B,C,D).

Deney hayvanlarını kafesleri ile beraber içine yerleştirmek ve sigara dumanına maruz bırakmak amacıyla, 150X120X80 cm boyutlarında tahtadan, ön tarafında 2 adet kapağı ve 15X15 cm boyutlarında penceresi (açılıp kapanabilir) bulunan, pencerenin iç tarafında 20X10 cm boyutlarında bölmesi bulunan (kül tablası ve sigara makinasını yerleştirmek için), tavanına da 3 cm çaplı 15 adet deliği bulunan 2 adet kafes yapıldı (A ve B kafesleri). Kafeslerin yan kısımları hayvanları dışarıdan gözlemleyebilmek amacıyla naylonla kaplandı. Geri kalan kısımlarda sunta kullanıldı. Ayrıca kafeslerin tavanına açılan deliklerle fazla olan sigara dumanının dışarıya yönlendirilmesi sağlandı. Böylece ortamdaki sigara dumanı miktarının aşırı değişimi engellendi (Şekil. III.1.),(Tablo IX).



Şekil III.2. Sigara makinesi. (Resim E,F).

A kafesine B₁,D₁,B₂,D₂ deney grupları yerleştirildi. B kafesine A₁,C₁,A₂,C₂ grupları yerleştirildi (Şekil III.3).

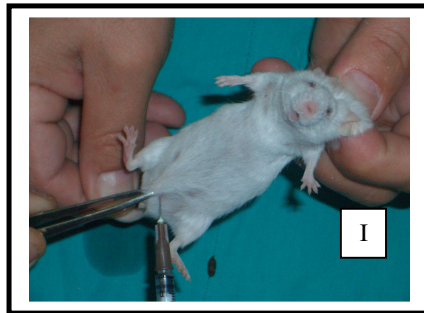


Şekil III.3. Fare kafeslerinin deney ortamına yerleştirilmesi (Resim G,H).

Deney süresince (10 hf.) hayvanlar normal çeşme suyu ve Oğuzlar® Yem Fabrikası'ndan elde edilen yemlerle beslendi (İçeriği: Kuru madde %88, Ham protein %14, Ham sellüloz %11, Ham kül %10, Hcl çözülmeyen kül %2, Kalsiyum%1,3-2, Fosfor %1, Sodyum %0,5-1, NaCl %1, A vitamini 10000 İÜ/Kg., D₃ Vitamini 1000İÜ/Kg., E Vitamini 30mg/Kg).

A kafesi (B₁,D₁,B₂,D₂ deney grupları), 10 hafta süreyle sigara dumanına maruz bırakıldı. A kafesinin pencere bölümünün arkasında bulunan bölmeye kül tablası ve sigara makinası yerleştirildi. Her gün saat 09.00' da başlayarak 20 dk aralarla sigara yakılarak sigara makinasına konuldu. Böylece A kafesinde bulunan fareler günlük olarak, 10 hafta süresince 20 sigara/gün sigara dumanına maruz bırakıldılar. Yine hergün saat 09.00, 12.00 ve 15.00'de Testo t350 XL cihazı ile kafesin içindeki sıcaklık ve O₂, CO, NO, NO₂, SO₂ konsantrasyonları ölçüldü (Tablo III.3.). Antioksidan (vitamin E) alması planlanan deney hayvanlarına (C₁,D₁, C₂,D₂) hergün aynı saatte (st:15.40) başlayarak 50 mg/kg'dan intraperitoneal (i.p.) E vitamini (Evigen, Aksu Farma®; 300 mg dl- Alfa Tokoferol Asetat) enjeksiyonu yapıldı. Diğer gruplara (A₁,B₁, A₂,B₂) aynı dozda %0.9 NaCl intraperitoneal (i.p) enjeksiyon yapıldı (Şekil III.4.).

Farelere intraperitoneal E vitamini ve serum fizyolojik enjeksiyonu için bu maddeler uygun dozlarda PPD enjektörlerine çekilerek hazırlandı. Yardımcı tarafından fare ense ve kuyruğundan karın kısmı yukarı gelecek şekilde tutuldu. Barsaklara zarar vermemek amacıyla penset yardımıyla cilt yukarı kaldırılarak 45⁰ açıyla enjeksiyon yapıldı (Şekil III.4.).



Şekil III.4. Farelere intraperitoneal enjeksiyon uygulaması (Resim I).

Sigara makinası EOGÜ Makine Mühendisliğinde Bölümünde yapıldı. Sigara makinesi 12x5x5cm boyutlarında demir levhanın dikdörtgen prizma şekline getirilmesi ile yapıldı. Dikdörtgen prizmanın bir ucu kapatılırken diğer ucuna 12 volt ile çalışan bir fan yerleştirildi. Gövde kısmına silindir şeklinde sigaranın yerleştirileceği bir aparat takıldı. Böylece yakılan sigara fan yardımıyla emiş yapılarak ortama verilmesi sağlanmış oldu (Şekil.III.2.).

Sigara olarak Uzun Samsun® sigarası (Zifir:15 mg; Nikotin: 1 mg; Karbon Monoksit:14 mg; Uzunluk:100 mm) kullanıldı.

Testo 350 cihazı yine EOGÜ Makine Mühendisliği Bölümü'nden temin edildi. Bu cihaz İtalya menşeli olup yanma gazlarının ölçülmesinde kullanılmaktadır. -40 ile 1200⁰C'da çalışabilmektedir. Gazların ölçüm aralıkları CO: 0-10,000 ppm, NO:0-3,000 ppm, NO₂: 0-500 ppm, SO₂: 0-5,000 ppm'dir (Şekil III.5.).



Şekil III.5. Testo 350 cihazı (Resim J).

DeneySEL olarak IVF planlanan farelere optimal FSH, hCG ve post hCG-OPU süresini belirlemek ve maksimum sayıda oosit elde edebilmek amacıyla ön çalışma yapıldı.

III.1.ÖN ÇALIŞMA

Balb-C Türü Deney Farelerinde Kullanılan Gonadotropin Dozu ve Post-hCG Süresinin Oosit Oluşturulması Üzerine Etkisi:

III.1.a.Giriş: Kemiriciler, insan IVF yeni uygulama protokolleri, embriyo toksisitelerinin belirlenmesi, deneysel tüm çalışmalar gibi insan oositleri ile gerçekleştirilemeyecek tüm araştırmalar için çok iyi bir kaynaktır. Ancak fare, sıçan, tavşan, kobay gibi her bir kemiricinin ovulasyon indüksiyonuna verdiği farklı yanıtlar söz konusudur. Ayrıca her bir türün ayrı soyları da farklı yanıtlar vererek bu farklılığı artırmaktadır.

Bu durum her bir kemirici soyunda uzun çalışmalar sonucunda en verimli ovulasyon indüksiyonu protokolünü bulmayı getirir. Bu nedenle deneysel çalışmalarımızda kullandığımız inbred Balb-C fareler için normal ve yüksek dozlar ile normal ve uzun süreleri karşılaştırarak, bu fareler için optimal doz ve sürenin saptanması amaçlanmıştır.

III.1.b.Yöntem ve Gereçler: 1.grupta, 6 adet 14-16 hafta, 18-25 gram Balb-C dişi fareye 30IU FSH (Puregon, Organon®) i.p. (intraperitoneal) enjeksiyonu uygulandı. FSH enjeksiyonundan 48 saat sonra 30 IU HCG (Pregnyl, Organon®) i.p. enjeksiyonu yapıldı. HCG enjeksiyonunu takip eden 12. saatte, stereo mikroskop altında tuba uterinanın ampula bölgesinden fare oositleri toplandı.

2. grupta ise grupta, 6 adet 14-16 hafta, 18-25 gram Balb-C dişi 100 IU FSH i.p.enjeksiyonu uygulandı. FSH enjeksiyonundan 48 saat sonra 100 IU HCG i.p. enjeksiyonu yapıldı. HCG enjeksiyonunu takip eden 12. saatte, stereo mikroskop altında tuba uterinanın ampula bölgesinden fare oositleri toplandı.

3. grupta 28 adet 14-16 hafta, 18-25 gram Balb-C dişi 200 IU FSH i.p.enjeksiyonu uygulandı. FSH enjeksiyonundan 48 saat sonra 200 İÜ HCG i.p. enjeksiyonu yapıldı. HCG enjeksiyonunu takip eden 15-17. saatte, arasında stereo mikroskop altında tuba uterinanın ampula bölgesinden fare oositleri toplandı.

Hesaplamalarda SPSS for Windows 13 kullanıldı. Gruplar arasındaki farkın saptanmasında Kruskal Wallis Oneway ANOVA on Ranks testi kullanıldı. Hangi grup ya da grupların farklı olduğunun saptanmasında POST HOC testlerden Dunn's testi kullanıldı. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

III.1.c.Bulgular: 1. grupta 6 adet oosit, 2. grupta 46 adet oosit, 3. grupta ise 434 adet oosit toplandı. Birim dişi fareye düşen oosit açısından 1. grupta hayvan başına 1 oosit, 2. grupta hayvan başına 7.6 oosit, 3. grupta hayvan başına 15.5 oosit toplandı(Tablo VII). Gruplar arasında önemli düzeyde fark bulunmuştur ($H=19,47$; $P<0,001^{***}$). Bu fark ise 1. ile 3. ve 2. ile 3. gruplar arasındadır ($P<0,05^*$). 1. ile 2. gruplar arasında fark bulunmamıştır ($P>0,05^{NS}$),(Tablo III.1).

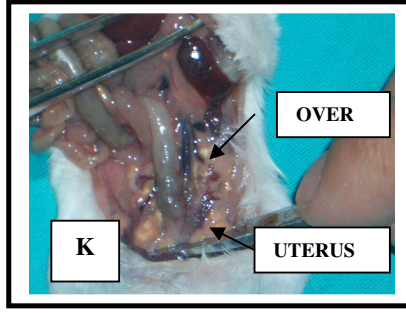
Tablo III.1. Ön çalışmanın bulguları.

	Hayvan Sayısı (n)	FSH (IU)	HCG (IU)	Post-HCG, OPU süresi (saat)	Toplanan oosit sayısı (n)	Hayvan başına düşen oosit (n)
1. Grup	6	30	30	12	6	1
2. Grup	6	100	100	12	46	7,6
3. Grup	28	200	200	15-17	434	15,5

Ön çalışmamızın sonuçlarına göre, deneysel çalışmamızda Balb-c fareler 14-16 haftalık olarak seçildi. Elde edilen oosit sayısının FSH ve hCG dozları ile orantılı olarak arttığı ve en yüksek oosit sayılarının 200 IU FSH, 200 IU hCG dozlarında elde edildiğini gördük. Bu nedenle deneysel çalışmamızda farelere estrus siklusları gözardı edilerek 200 IU FSH enjeksiyonunu takiben 48 saat sonra 200 IU hCG enjeksiyonu yapıldı. Ayrıca hCG enjeksiyonu sonrasında OPU için bekleme süresi de elde edilen oosit sayısı ile ilişkili görülmektedir. Deneysel çalışmamızda OPU, hCG enjeksiyonundan sonra 15-17 saatler arasında yapılmıştır.

III.2.DENEYSEL ÇALIŞMA

28 adet BALB-C dişi fareye 200 IU FSH (Puregon, Organon®) i.p. enjeksiyonu uygulandı. FSH enjeksiyonundan 48 saat sonra 200 IU HCG (Pregnyl, Organon®) i.p. enjeksiyonu yapıldı. HCG enjeksiyonunu takip eden 15-17 saatte, fareler yüksek konsantrasyonda eter bulunan kapalı bir kavanozda tutularak öldürüldü. İşlemi takiben hemen, laparotomi uygulanarak, tuba uterina-over kesilerek çıkarıldı (Şekil III.6.). İşleme stereo mikroskop altında devam edilerek tuba uterininin ampula bölgesinden fare oositleri toplandı.

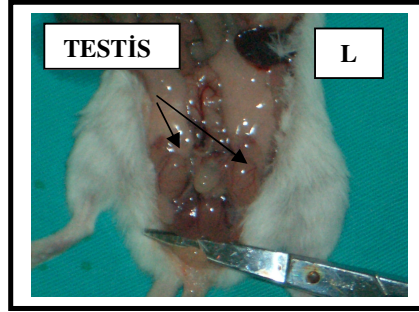


Şekil III.6. Dişi farelerde laparotomi ile tuba uterina-over kesilerek çıkarılması (Resim K).

Toplanacak oositlerin kültürleneceği 4 kuyulu petrilere (fertilizasyon medyumunu, %10 Albuminli G-Fert, GIII®, Vitrolife) medyumlar her bir göze 700 µl olarak paylaşılırp daha önceden hazırlanmış inkübatörde bir gece ekilibrasyona bırakıldı. Böylece medyum ortamı 37 C sıcaklık, %6 CO2 ve nemli (%95) hale getirildi. Ayrıca HEPES buffer sistemli oosit ve sperm yıkama medyumunu, steril flasklara konuldu. Ekilibrasyon için kapağı kapalı inkübatöre kaldırıldı.

Bunun için fare tuba uterinaları HEPES (MHTF-HEPES®, Irvine Scientife, %10 Sentetice Serum Supplement) içerikli yıkama solüsyonuna alınıp ampulla bölgeleri ince iğne uçlarıyla (PPD enjektör uçları) ile mikroskop altında kesildi. Petride sayılarak toplandı. Her deney grubu için işlem, ayrı ayrı bir petride yapılarak oositler toplandı.

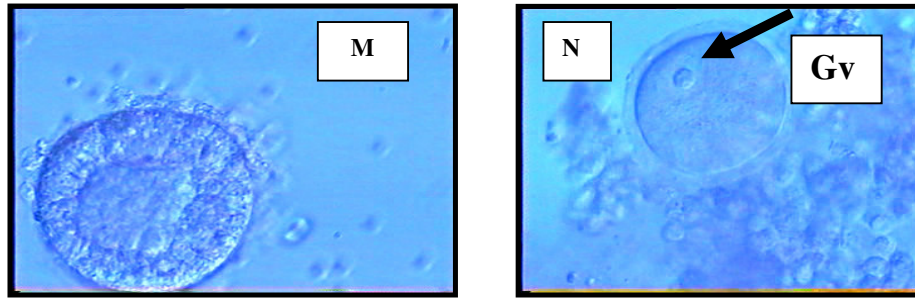
12 adet erkek BALB-C , fare aynı şekilde yüksek konsantrasyonda eter bulunan kapalı bir kavanozda tutularak öldürüldü. İşlemi takiben hemen, laparotomi uygulanarak, testisleri kesilerek çıkarıldı (Şekil III.7.). Her deney grubu için ayrı petri kullanılarak işleme stereo mikroskop altında devam edildi ve farelerin epididimleri, 90 derece açı verilmiş iğne uçları (PPD enjektör uçları) ile özellikle kauda epididimis ve vasa deferensten spermler sıvazlanarak toplandı. Üzerine kültür medyumunu eklenip santrifüj edildi. Dip tortu alınıp yine kültür medyumunu eklenip inkübatörde inseminasyon saatine kadar bekletildi. İn vitro olarak 3 saat süre ile olgunlaştırılmış (in vitro maturation) oositlere, her bir oosite 7 µl olacak şekilde hazırlanmış sperm solüsyonu eklendi ve fertilizasyon için inkübatöre kaldırıldı. Böylece daha önce belirtilen farklı deney gruplarının birbirleriyle çarpazlanması sonucu 16 adet çalışma grubu elde edildi (Tablo III.2.).



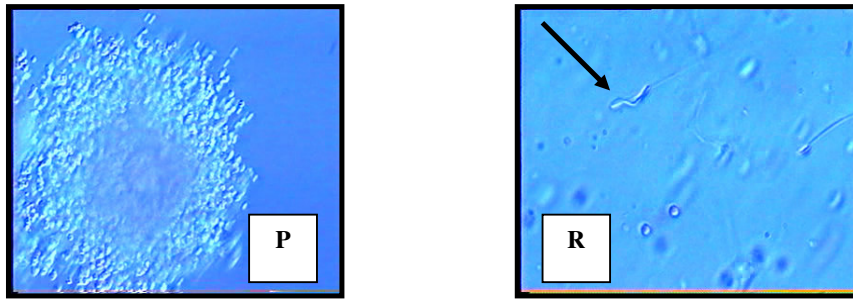
Şekil III.7. Erkek farelerde laparotomi ile testislerin çıkarılması (Resim L).

Ertesi günün ihtiyacı olacak medyumlar hazırlanarak daha önce anlatıldığı şekilde bir gecelik ekilibrasyona bırakıldı.

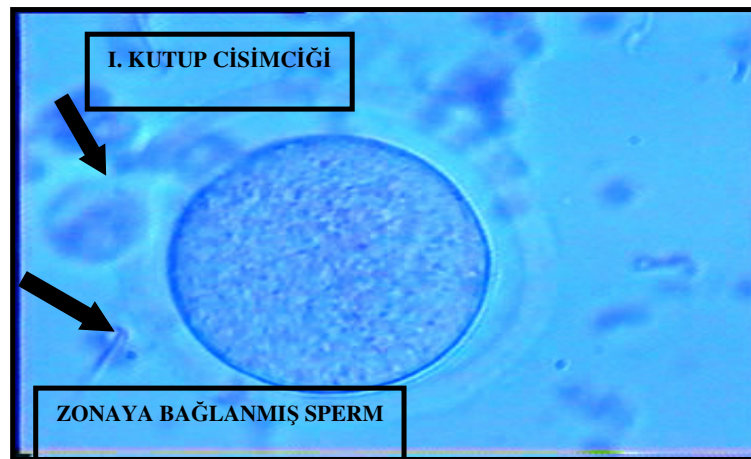
Oositlerinin dölleme kontrolü yapıldı. Her bir oosit dölleme kriteri olan iki pronükleus ve iki polar body açısından değerlendirildi. Döllenen ve döllemeyen oositler her bir gruba göre sayısal olarak belirlendi ve her bir grubun da fertilizasyon oranları çıkarıldı. Fertilize oositler 1-3. gün gelişim medyumunda (Vitrolife GI-III®) 44. saate kadar kültürlendi. İkinci gün için, Klivaj gösteren embriyoların fertilize oositlere oranı şeklinde klivaj oranları çıkarıldı ve klivaj gösteren embriyolar üçüncü güne kadar takip edildi. Embriyolarının üçüncü gün in vitro embriyo kültürü sonuçlarına göre embriyo gelişim oranları çıkartıldı. Bu oran yanısıra arrest, dejenerasyon oranları ve canlılığı süren embriyoların gradeleri saptandı (Şekil. III.8-15).



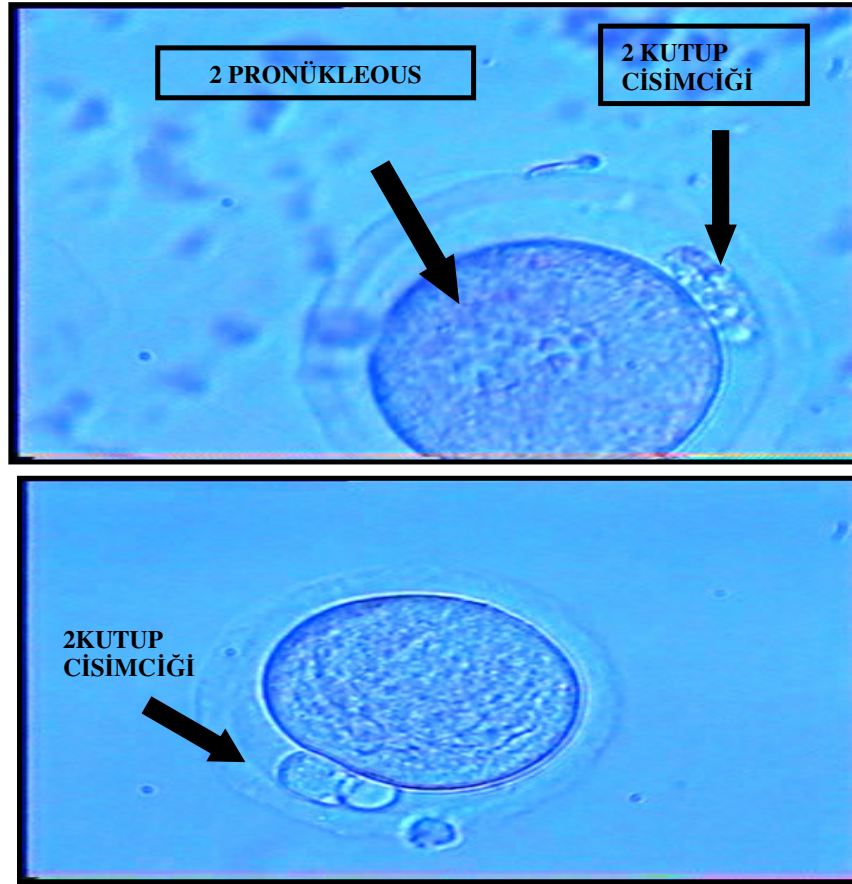
Şekil III.8. Ovaryumdan primer follükül (M) ve hCG öncesi profaz evresinde (Germinal Vezikül, Gv) fare oositi (N) (orijinal büyütme X 40 inverted mikroskop mikrograf).



Şekil III.9. hCG sonrası 17.saatte metafaz evresinde tubal oosit (P) ve epididimal fare spermleri (R) (orijinal büyütme X 40 inverted mikroskop mikrograf).



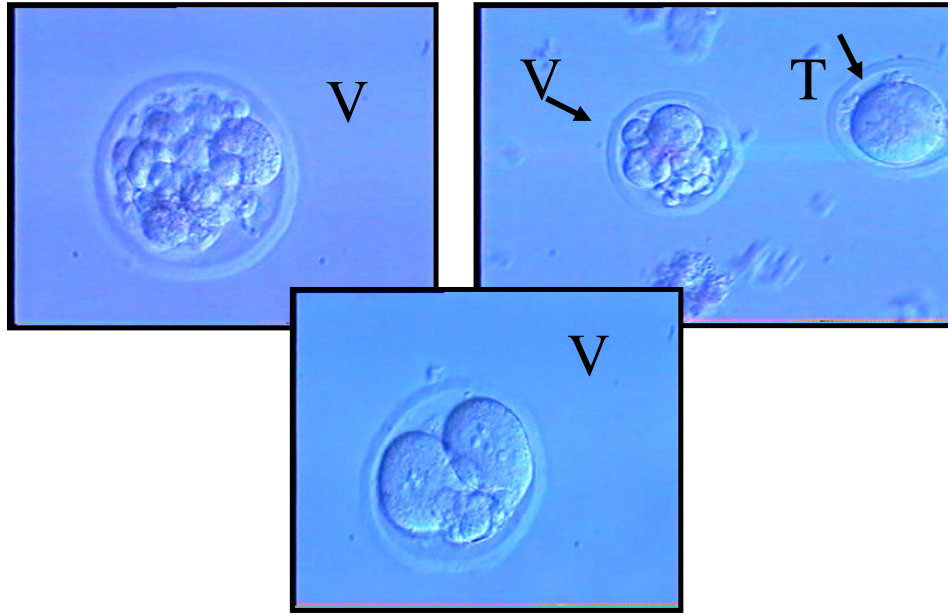
Şekil III.10. IVF sonrası fertilize olmamış fare oositi (orijinal büyütme x 40 inverted mikroskop mikrograf).



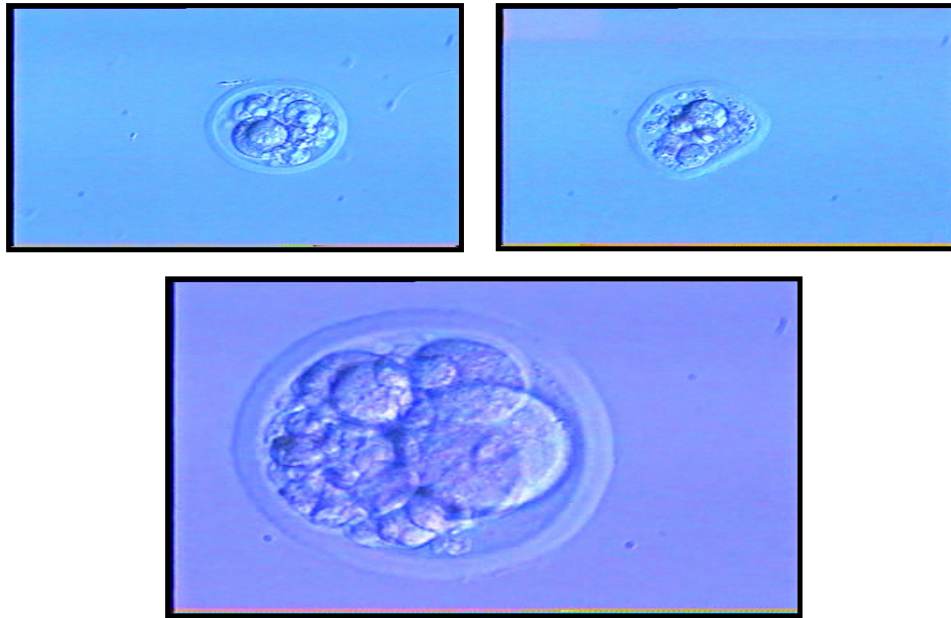
Şekil III.11. IVF sonrası fertilize olmuş fare oositi (orijinal büyütme x 40 inverted mikroskop mikrograf).



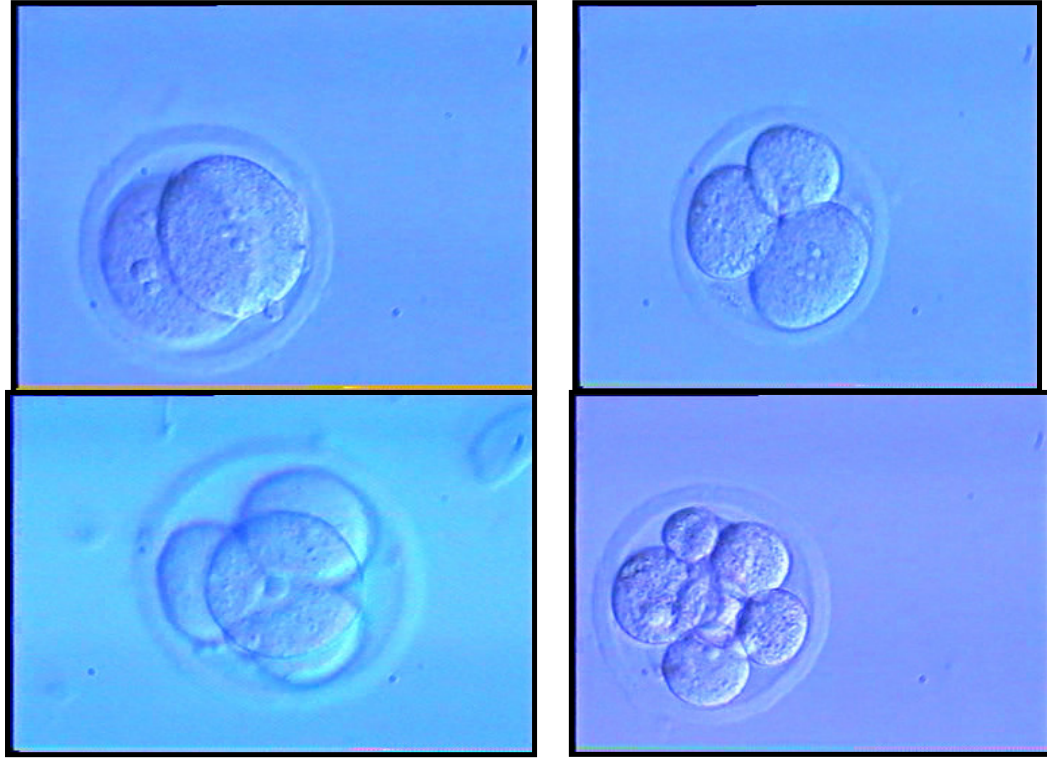
Şekil III.12. 3. günde genellikle morula evresinde grade I fare embriyoları (orijinal büyütme x 40 inverted mikroskop mikrograf).



Şekil III.13. 2. günde klivaj göstermeyen arrest (T) veya klivaj göstersedeki skoru düşük (V) ya da dejenere fare embriyosu (orijinal büyütme x 40 inverted mikroskop mikrograf).



Şekil III.14. 3. güne kadar gelişimini sürdürmüş ancak skoru düşük ya da dejenere fare embriyoları (orijinal büyütme x 40 inverted mikroskop mikrograf).



Şekil III.15. 2. günde skoru yüksek embriyolar (orijinal büyütme x 40 inverted mikroskop mikrograf).

Tablo III.2. Çalışma grupları.

	A ₂ grubu (KE)	B ₂ grubu (SDE)	C ₂ grubu (AOE)	D ₂ grubu (SDAOE)
A ₁ grubu (KD)	1. grup (KDKE)	2. grup (KDSDE)	3. grup (KDAOE)	4. grup (KSDAOE)
B ₁ grubu (SDD)	5. grup (SDDKE)	6. grup (SDDSDE)	7. grup (SDDAOE)	8. grup (SDDSDAOE)
C ₁ grubu (AOD)	9. grup (AODKE)	10. grup (AODSDE)	11. grup (AODAOE)	12. grup (AODSDAOE)
D ₁ grubu (SDAOD)	13. grup (SDAODKE)	14. grup (SDAODSDE)	15. grup (SDAODAOE)	16. grup (SDAODSDAOE)

Çalışma gruplarımız; kontrol grubu, sigara dumanına maruz bırakılan, E vitamini verilen ya da E vitamini ile beraber sigara dumanına maruz bırakılan dişi ve erkek farelerden elde edilen oosit ve spermilere deneysel IVF yapılması ile elde edildi (Tablo III.2.).

Çalışma Grupları:

- 1.grup(KDKE): **Dişi** (kontrol) ; **Erkek** (kontrol)
- 2.grup(KDSDE): **Dişi** (kontrol) ; **Erkek** (sigara dumanı)
- 3.grup(KDAOE): **Dişi** (kontrol) ; **Erkek** (E vit.)
- 4.grup(KSDAOE): **Dişi** (kontrol) ; **Erkek** (sigara dumanı + E vit.)
- 5.grup(SDDKE): **Dişi** (sigara dumanı) ; **Erkek** (kontrol)
- 6.grup(SDDSDE): **Dişi** (sigara dumanı) ; **Erkek** (sigara dumanı)
- 7.grup(SDDAOE): **Dişi** (sigara dumanı) ; **Erkek** (E vit.)
- 8.grup(SDDSDAOE):**Dişi** (sigara dumanı) ; **Erkek** (sigara dumanı + E vit.)
- 9.grup(AODKE): **Dişi** (E vit.) ; **Erkek** (kontrol)
- 10.grup(AODSDE): **Dişi** (E vit.) ; **Erkek** (sigara dumanı)
- 11.grup(AODAOE): **Dişi** (E vit.) ; **Erkek** (E vit.)
- 12.grup(AODSDAOE):**Dişi** (E vit.) ; **Erkek** (sigara dumanı + E vit.)
- 13.grup(SDAODKE):**Dişi** (sigara dumanı + E vit.) ; **Erkek** (kontrol)
- 14.grup(SDAODSDE): **Dişi** (sigara dumanı + E vit.) ; **Erkek** (sigara dumanı)
- 15.grup(SDAODAOE): **Dişi** (sigara dumanı + E vit.) ; **Erkek** (E vit.)
- 16.grup(SDAODSDAOE): **Dişi** (sigara dumanı + E vit.) ; **Erkek** (sigara dumanı + E vit.),(Tablo III.2.).

Tablo III.3. Sigara dumanına maruz bırakılan kafesdeki ortamdaki gazların başlangıç, 3.saatve 6. saat dağılımları.

	KONTROL (Saat 9.00)	3.SAAT (saat 12.00)	6.SAAT (saat 15.00)	3. ve 6.saat değerlerinin karşılaştırılması	
				(t , z)	(p)
O ₂ (%)	21	20.94 ± 0.0328 (min: 20.88; max: 21.02)	20.92 ± 0.0551 (min: 20.63; max: 20.97)	t= 2.31	P=0.022*
CO (ppm)	0	28.24 ± 6.37 (min: 16; max: 42)	36.60 ± 8.48 (min: 18; max: 67)	T=6.67	P=0.000***
NO (ppm)	0	1.10 ± 0.66 (min: 0; max:2)	1.12 ± 0.61 (min: 0; max: 2)	T=0.19	P=0.85 ^{NS}
NO ₂ (ppm)	0	0.9 ± 0.18 (min: 0; max:1)	0.15 ± 0.32 (min: 0; max:2)	Z=2.06	P=0.039*
SO ₂ (ppm)	0	0.45 ± 0.50 (min: 0; max: 1)	0.52 ± 0.50 (min: 0; max: 1)	Z=0.75	P=0.45 ^{NS}
ORTAM SICAKL IĞI (°C)	21 ± 1.30 (min: 19; max: 24)	20.59 ± 1.39 (min: 18.20; max: 24.00)	20.81 ± 1.26 (min: 18.90; max: 23.30)	T=0.75	P=0.322 ^{NS}

Sigara dumanına maruz bırakılan kafesteki, ortamda bulunan yanma gazlarının konsantrasyonlarını, ortamın O₂ konsantrasyonunu ve sıcaklığını hergün saat 9.00 (kontrol), 12.00 ve 15.00'de Testo t350 XL cihazı ile ölçtük. Ölçümlere baktığımızda saat 9.00 da O₂ konsantrasyonu % 21 iken gün içerisinde azalmaktaydı. 3. saat ve 6. saat yanma gazlarını karşılaştırdığımızda sigara dumanı maruziyeti ile ilgili olarak O₂ konsantrasyonu azalırken (P=0.022*), CO (P=0.000***), NO₂ (P=0,039*) konsantrasyonları artmaktaydı. NO, SO₂ ve ortamın sıcaklığında anlamlı düzeyde bir değişiklik saptanmadı (Tablo III.3.).

Tüm bulgular hazırlanan özet tablolara aktarıldı. Çalışma gruplarının ovulasyon induksiyonu ile elde edilen oosit sayıları, fertilizasyon oranı, klivaj oranı, embriyo gelişim oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistiklerin hesaplanmasında SPSS for Windows 13.0 ve MINITAB 14.0 programları kullanıldı. Ölçümsel değişkenler ortalama ± standart sapma (min, max) olarak verildi. İstatistiksel karşılaştırmalarda t testi (Independent Samples t test), Mann Whitney U Testi, two proportion testlerinden normal dağılım gösteren verilere Z testi, normal dağılım koşulunu sağlamayan verilere ise kıkare testi yapıldı. P<0.05 istatistiksel anlamlı kabul edildi.

IV.BULGULAR

Sigara dumanının ve antioksidan özelliği olan vitamin E'nin in vitro fertilizasyon parametreleri (fertilizasyon oranı, klivaj oranı, embriyo gelişim oranı) üzerine olan etkilerini incelediğimiz çalışmanın genel sonuçları Tablo IV.1'de verilmiştir. Sigara dumanının fertilizasyon parametreleri üzerine etkisini Tablo IV.2'de, sigara dumanına maruz bırakılan farelerde E vitamini kullanımının fertilite parametreleri üzerindeki etkileri Tablo IV.6'da, ayrıca E vitamininin fertilizasyon parametreleri üzerine etkileri Tablo IV.10'da gösterilmiştir.

Tablo IV.1. Çalışma gruplarına göre genel sonuçlar.

ÇALIŞMA GRUPLARI	Oosit sayısı (n)	Fertilizasyon Oranı (%n)	Klivaj Oranı (%n)	Embriyo gelişim oranı (%n)	3. gün embriyo dağılımı					
					*	*	*	DEJENE RE (%n)	ARREST (%n)	TOPLAM (n)
					GI (%n)	GII (%n)	GIII (%n)			
1. grup (KDKE) ^x	20	%85 17	%88 15	%75 15	%26 4	%40 6	- -	%20 3	%13 2	15
2. grup (KDSDE) ^x	16	%68.7 11	%90 10	%62.5 10	%20 2	%60 6	%20 2	- -	- -	10
3. grup (KDAOE) ^x	23	%73.9 17	%88.2 15	%65.2 15	%33.3 5	%20 3	%26 4	%6 1	%4 2	15
4. grup (KSDAOE) ^x	24	%62.5 15	%86.6 13	%54.1 13	-	%15.3 2	%23 3	%61.5 8	- -	13
5. grup (SDDKE) ^x	25	%36 9	%88 8	%32 8	%12.5 1	%12.5 1	%37.5 3	%25 2	%12.5 1	8
6. grup (SDDSDE) ^x	29	%20.6 6	%83.3 5	%17.2 5	%20 1	%20 1	%40 2	%20 1	- -	5
7. grup (SDDAOE)	31	%51.6 16	%68.7 11	%35.4 11	%9 1	%27 3	%36 4	%9 1	%18 2	11
8. grup (SDDSDAOE) ^x	31	%19.3 6	%83 5	%16.1 5	%20 1	%20 1	%40 2	%20 1	- -	5
9. grup (AODKE) ^x	16	%81.2 13	%92.3 12	%75 12	%33.3 4	%33.3 4	%25 3	%8 1	- -	15
10. grup (AODSDE) ^x	19	%21 4	%50 2	%10 2	- -	- -	- -	- -	%100 2	2
11. grup (AODAOE) ^x	16	%43.7 7	%71.4 5	%31.2 5	- -	%40 2	%60 3	- -	- -	5
12. grup (AODSDAOE) ^x	13	%23 3	%100 3	%23 3	- -	- -	%100 3	- -	- -	3
13. grup (SDAODKE) ^x	25	%20 5	%60 3	%12 3	%66.6 2	-	-	%33.3 1	- -	3
14. grup (SDAODSDE)	25	%20 5	%60 3	%12 3	%66.6 2	- -	- -	%33.3 1	- -	3
15. grup (SDAODAOE) ^x	16	%25 4	%50 2	%12.5 2	- -	%100 2	- -	- -	- -	2
16. grup (SDAODSDAOE)	19	%5 1	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	-

^x : Bkz. Çalışma grupları(Tablo III.2.)

* : Grade I,II,III

Tablo IV.2. Sigara dumanına maruz Balb-c farelerde sigara dumanının fertilitte parametreleri üzerindeki etkileri.

ÇALIŞMA GRUPLARI	Oosit sayısı	Fertilizasyon Oranı (%n)	Klivaj Oranı (%n)	Embriyo Gelişim Oranı (%n)	Sağlıklı Embriyo Dağılımı			3. Gün Embriyo Dağılımı					
					GI (%n)	GII (%n)	GIII (%n)	GI (%n)	GII (%n)	GIII (%n)	DEJ. (%n)	ARR. (%n)	TOP. (n)
1. grup (KDKE)	20	%85 ^{ab} 17	%88 15	%75 ^d 15	%20 4	%30 6	- -	%26 4	%40 6	- -	%20 3	%13 2	15
5. grup (SDDKE)	25	%36 ^a 9	%88 8	%32 ^c 8	%4 1	%4 1	%12 3	%12.5 1	%12.5 1	%37.5 3	%25 2	%12.5 1	8
2. grup (KDSDE)	16	%68.7 11	%90 10	%62.5 10	%12.5 2	%37.5 6	%12.5 2	%20 2	%60 6	%20 2	- -	- -	10
6. grup (SDDSDE)	29	%20.6 ^b 6	%83.3 5	%17.2 ^d 5	%3 1	%3 1	%6 2	%20 1	%20 1	%40 2	%20 1	- -	5

a: (1.grup/5.grup; fertilizasyon oranı)= p<0.01^{**}

b: (1.grup/6.grup; fertilizasyon oranı)= p<0.001^{***}

c: (1. grup/5.grup; embriyo gelişim oranı)= p<0.01^{**}

d: (1.grup/6.grup; embriyo gelişim oranı)= p<0.001^{***}

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının fertilizasyon oranları üzerine etkilerini inceledik. Fertilizasyon oranları kontrol grubunda (1.grup) %85, dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (5. grup) (%36) erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (2. grup) (%68.7), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (6. grup) (%20,6) olarak bulundu (Tablo IV.2). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta fertilizasyon oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaktaydı (P=0.002, P<0.01^{**}). Erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta fertilizasyon oranında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değişiklik olmazken (P=0,422, P>0.05^{NS}), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma (P=0.000, P<0.001^{***}) saptadık (Tablo IV.3.).

Tablo IV.3. Sigara dumanının fertilizasyon oranı üzerine etkisi.

Fertilizasyon oranı	1.grup (KDKE)	5.grup (SDDKE)	2.grup (KDSDE)	6.grup (SDDSDE)
1.grup (KDKE)		P<0.01**	P>0.05 ^{NS}	P<0.001***
5.grup (SDDKE)			P<0.05*	P>0.5 ^{NS}
2.grup (KDSDE)				P<0.001***
6.grup (SDDSDE)				

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının klivaj oranı üzerine etkilerini inceledik. Klivaj oranlarını, kontrol grubunda (1.grup) (%88), dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (5. grup) (%88), erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (2. grup) (%90), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (6. grup) (%83,3) olarak bulduk (Tablo IV.2). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre, dişilerin, erkeklerin ve hem dişi hemde erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı gruplar arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$),(Tablo IV.5.).

Tablo IV.4. Sigara dumanının klivaj oranı üzerine etkisi.

Klivaj oranı	1.grup (KDKE)	5.grup (SDDKE)	2.grup (KDSDE)	6.grup (SDDSDE)
1.grup (KDKE)		P>0.05 ^{NS}	P>0.05 ^{NS}	P>0.05 ^{NS}
5.grup (SDDKE)			P>0.05 ^{NS}	P>0.05 ^{NS}
2.grup (KDSDE)				P>0.05 ^{NS}
6.grup (SDDSDE)				

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının embriyo gelişim oranı üzerine etkilerini inceledik. Embriyo gelişim oranları, kontrol grubunda (1.grup) (%75), dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (5. grup) (%32), erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (2. grup) (%62.5), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (6. grup) (%17.2)

bulundu (Tablo IV.2). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta embriyo gelişim oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaktaydı ($Z=3,20$, $P<0.01^{**}$). Erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta embriyo gelişim oranında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değişiklik olmazken ($Z=0,81$, $P>0.05^{NS}$), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma ($Z=4,83$, $P<0.001^{***}$) saptadık (Tablo IV.5.).

Tablo. IV.5. Sigara dumanının embriyo gelişim oranı üzerine etkisi.

Embriyo gelişim oranı	1.grup (KDKE)	5.grup (SDDKE)	2.grup (KDSDE)	6.grup (SDDSDE)
1.grup (KDKE)		$P<0.01^{**}$	$P>0.05^{NS}$	$P<0.001^{***}$
5.grup (SDDKE)			$P<0.05^*$	$P>0.5^{NS}$
2.grup (KDSDE)				$P<0.001^{***}$
6.grup (SDDSDE)				

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Toplam embriyo sayısına göre 3.günde, kontrol grubunda (1.grup) (%26) olan grade I sağlıklı embriyo gelişimi; sigara dumanına maruz kalmış dişilerle elde edilen grupta (5. grup) (%12.5), erkeklerle elde edilen grupta (2. grup) (%20) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre, dişilerin ve erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı gruplar arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$), (Tablo IV.2.).

Tablo IV.6. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının fertilite parametreleri üzerindeki etkileri.

ÇALIŞMA GRUPLARI	Oosit sayısı	Fertilizasyon Oranı (%n)	Klivaj Oranı (%n)	Embriyo Gelişim Oranı (%n)	Sağlıklı Embriyo Dağılımı			3. Gün Embriyo Dağılımı					
					GI (%n)	GII (%n)	GIII (%n)	GI (%n)	GII (%n)	GIII (%n)	DEJ. (%n)	ARR. (%n)	TOP. (n)
6. grup (SDDSD E)	29	%20,6 6	%83,3 5	%17,2 5	%3 1	%3 1	%6 2	%20 1	%20 1	%40 2	%20 1	- -	5
14. grup (SDAODSD E)	25	%20 5	%60 3	%12 3	%8 2	- -	- -	%66,6 2	- -	- -	%33,3 1	- -	3
8. grup (SDDSDAO E)	31	%19,3 6	%83 5	%16,1 5	%3 1	%3 1	%6 2	%20 1	%20 1	%40 2	%20 1	- -	5
16. grup (SDAODSD AOE)	19	%5 1	-	-	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	-

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının fertilizasyon oranı üzerindeki etkilerini inceledik. Fertilizasyon oranlarına baktığımızda sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubumuzda (6. grup) (%20,6), sigara dumanıyla beraber Vit. E alan dişilerde (14. grup) (%20), erkeklerde (8. grup) (%19,3), hem dişi hem de erkeğin sigara dumanıyla beraber Vit. E aldığı grupta (16.grup) (%5) olarak saptandı (Tablo IV.6.). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda, dişilerin sigara dumanıyla beraber VitE aldığı grupta fertilizasyon oranında ($Z=0,06$, $P>0,05^{NS}$), erkeklerin sigara dumanıyla beraber Vit E aldığı grupta ($Z=0,13$, $P>0,05^{NS}$), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanıyla beraber Vit E aldığı grupta ($P>0,05^{NS}$) kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı fark saptamadık (Tablo IV.7.).

Tablo IV.7. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının fertilizasyon oranı üzerine etkileri.

Fertilizasyon oranı	6.grup (SDDSDE)	14.grup (SDAODSDE)	8.grup (SDDSDAOE)	16.grup (SDAODSDAOE)
6.grup (SDDSDE)		P>0.05 ^{NS}	P>0.05 ^{NS}	P>0.05 ^{NS}
14.grup (SDAODSDE)			P>0.05 ^{NS}	P>0.05 ^{NS}
8.grup (SDDSDAOE)				P>0.05 ^{NS}
16.grup (SDAODSDAOE)				

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının klivaj oranı üzerine etkilerini inceledik. Sadece sigara dumanına maruz bırakılan grupta (6. grup) (%83,3) olan klivaj oranı, sigara dumanıyla beraber Vit-E alan dişilerde (14. grup) (%60) ve erkeklerde (8. grup) (%83) olarak saptandı (Tablo IV.6). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin klivaj oranları arasında anlamlı fark saptamadık (P>0.05^{NS}), (Tablo IV. 8.).

Tablo IV.8. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının klivaj oranı üzerine etkileri.

Klivaj oranı	6.grup (SDDSDE)	14.grup (SDAODSDE)	8.grup (SDDSDAOE)	16.grup (SDAODSDAOE)
6.grup (SDDSDE)		P>0.05 ^{NS}	P>0.05 ^{NS}	
14.grup (SDAODSDE)			P>0.05 ^{NS}	
8.grup (SDDSDAOE)				
16.grup (SDAODSDAOE)				

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının embriyo gelişim oranı üzerine etkilerini inceledik Embriyo gelişim oranları sadece sigara dumanına maruz bırakılan grupta (6. grup) (%17,2), sigara dumanıyla beraber Vit-E alan dişilerde (14. grup) (%12) ve erkeklerde (8. grup) (%16,1) olarak saptandı (Tablo IV.6). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin embriyo gelişim oranları arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$), (Tablo IV. 9.).

Tablo IV. 9. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının embriyo gelişim oranı üzerine etkileri.

Embriyo gelişim oranı	6.grup (SDDSDE)	14.grup (SDAODSDE)	8.grup (SDDSDAOE)	16.grup (SDAODSDA OE)
6.grup (SDDSDE)		$P>0.05^{NS}$	$P>0.05^{NS}$	
14.grup (SDAODSDE)			$P>0.05^{NS}$	
8.grup (SDDSDAOE)				
16.grup (SDAODSDA OE)				

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Toplam embriyo sayısına göre 3.günde, sadece sigara dumanına maruz bırakılan grupta (6. grup) (%20) olan grade I sağlıklı embriyo gelişimi, sigara dumanıyla beraber Vit-E alan dişilerde (14. grup) (%66.6) ($P>0.05^{NS}$), erkeklerle elde edilen grupta (8. grup) (%20) ($P>0.05^{NS}$) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin Grade I embriyo gelişimi oranı arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$), (Tablo IV.6.).

Tablo IV.10. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının fertilitte parametreleri üzerindeki etkileri.

	Oosit Sayısı (n)	Fertilizasyon Oranı (%..n)	Klivaj Oranı (%..n)	Embriyo Gelişim Oranı (%..n)	Sağlıklı Embriyo Dağılımı			3. Gün Embriyo Dağılımı					
					GI (%..n)	GII (%..n)	GIII (%..n)	GI (%..n)	GII (%..n)	GIII (%..n)	DEJ. (%..n)	ARR. (%..n)	TOP. (n)
1. grup (KDKE)	20	%85 ^a 17	%88 15	%75 ^b 15	%20 4	%30 4	- -	%26 4	%40 6	- -	%20 3	%13 2	15
9. grup (AODKE)	16	%81.2 13	%92.3 12	%75 12	%25 4	%25 4	%18 3	%33.3 4	%33.3 4	%25 3	%8 1	- -	15
3. grup (KDAOE)	23	%73.9 17	%88.2 15	%65.2 15	%21 5	%13 3	%17 4	%33.3 5	%20 3	%26 4	%6 1	%4 2	15
11. grup (AODAOE)	16	%43.7 ^a 7	%71.4 5	%31.2 ^b 5	- -	%12. 5 2	%18 3	- -	%40 2	%60 3	- -	- -	5

a: (1.grup/11.grup; fertilizasyon oranı): P<0.05*

b: (1.grup/11.grup; embriyo gelişim oranı): P<0.05*

Balb-c farelerde antioksidan kullanımının fertilizasyon oranı üzerindeki etkilerine baktık. Fertilizasyon oranlarına baktığımızda kontrol grubumuzda (1. grup) (%85), Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%81.2), erkeklerde (3. grup) (%73.9), hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta (11.grup) (%43.7) olarak bulduk (Tablo IV.10). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre fertilizasyon oranını, Vitamin E alan dişilerde (P=1.00, P>0.05^{NS}) ve erkeklerde (P=0.467, P>0.05^{NS}) değişmezken, hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta istatistiksel olarak azalmış saptadık (P=0.014, P<0.05*), (Tablo IV. 11.).

Tablo IV.11. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının fertilizasyon oranı üzerine etkileri.

Fertilizasyon oranı	1.grup (KDKE)	9.grup (AODKE)	3.grup (KDAOE)	11.grup (AODAOE)
1.grup (KDKE)		P> 0.005 ^{NS}	P> 0.005 ^{NS}	P< 0.005 [*]
9.grup (AODKE)			P> 0.005 ^{NS}	P> 0.005 ^{NS}
3.grup (KDAOE)				P> 0.005 ^{NS}
11.grup (AODAOE)				

Balb-c farelerde antioksidan kullanımının klivaj oranı üzerindeki etkilerine baktık Kontrol grubumuzda (1. grup) (%88), olan klivaj oranı, Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%92.3), erkeklerde (3. grup) (%88.2), hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta (11.grup) (%71.4) olarak bulundu (Tablo IV.10). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre klivaj oranı, Vitamin E alan dişilerde (P=1.00, P>0.05^{NS}) ve erkeklerde (P=1.00, P>0.05^{NS}) değişmezken ayrıca hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark saptamadık (P=0.552, P>0.05^{NS}),(Tablo IV. 12.).

Tablo IV.12. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının klivaj oranı üzerine etkileri.

Klivaj oranı	1.grup (KDKE)	9.grup (AODKE)	3.grup (KDAOE)	11.grup (AODAOE)
1.grup (KDKE)		P> 0.005 ^{NS}	P> 0.005 ^{NS}	P> 0.005 ^{NS}
9.grup (AODKE)			P> 0.005 ^{NS}	P> 0.005 ^{NS}
3.grup (KDAOE)				P> 0.005 ^{NS}
11.grup (AODAOE)				

Balb-c farelerde antioksidan kullanımının embriyo gelişim oranı üzerindeki etkilerine baktık. Embriyo gelişim oranları kontrol grubumuzda (1. grup) (%75), Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%75), erkeklerde (3. grup) (%65.2), hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta (11.grup) (%31.2) olarak bulundu (Tablo IV.10). Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre embriyo gelişim oranı, Vitamin E alan dişilerde ($P=1.00$, $P>0.05^{NS}$) ve erkeklerde ($P=0.526$, $P>0.05^{NS}$), değişmezken , hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta istatistiksel olarak azalmış saptadık ($P=0.017$, $P<0.05^*$),(Tablo IV. 13.).

Tablo IV.13. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının embriyo gelişim oranı üzerine etkileri.

Embriyo gelişim oranı	1.grup (KDKE)	9.grup (AODKE)	3.grup (KDAOE)	11.grup (AODAOE)
1.grup (KDKE)		$P> 0.005^{NS}$	$P> 0.005^{NS}$	$P< 0.005^*$
9.grup (AODKE)			$P> 0.005^{NS}$	$P> 0.005^{NS}$
3.grup (KDAOE)				$P> 0.005^{NS}$
11.grup (AODAOE)				

Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Toplam embriyo sayısına göre 3.günde, kontrol grubunda (1.grup) (%26) olan grade I sağlıklı embriyo gelişimi; Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%33.3), erkeklerde (3. grup) (%33.3) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre, Vit E alan dişilerin ve erkeklerin Grade I embriyo gelişimi oranı arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$), (Tablo IV.10.).

V. TARTIŞMA (ÖN ÇALIŞMA):

Literatürde hayvan çalışmalarında kullanılmak üzere en uygun ovulasyon protokolünü belirlemek amaçlı çeşitli çalışmalar göze çarpmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, erişkin Wistar-Imamichi ratları intraperitoneal PMSG enjeksiyonunu takiben 48. saatte intraperitoneal hCG enjeksiyonu ile süperovulasyon için indüklendiler. Uygulanan PMSG ve HCG dozları 0, 75, 150, 300 IU/kg idi. Elde edilen sonuçlara göre, erişkin ratlarda (10-15 haftalık) PMSG oosit sayısını ve fertilize olmuş oosit sayısını doz bağımlı şekilde 150 IU/kg'a kadar artırdığını buldular. Fakat PMSG tedavisi sonucu, erişkin ratlarla karşılaştırıldığında genç ratlarda (6-9 hafta) bu etkinin yarısı gözlediler. Fertilizasyon oranı genç ve erişkin ratlarda yüksek yüzdede ve benzer buldular. Bu çalışmanın sonucuna bakıldığında yazarlar, transgenik rat üretimi için yüksek sayıda fertilize oosit toplanması amacıyla, süperovulasyon için 6-9 haftalık genç ratlar yerine 10-15 haftalık erişkin ratların kullanılması gerektiğini ve PMSG tedavisinin 150 IU/kg ve HCG tedavisinin 75 IU/kg olmasını önerdiler (187).

Ovulasyon üzerinde Estrus siklus etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 12, 18, 24, haftalık erişkin Wistar-Imamichi ratlarına PMSG (150 IU/kg)'u metestrus, diestrus, proestrus ya da estrus döneminde yapıldı ve 55 saat sonrasında HCG (75IU/kg) enjeksiyonu yapıldı. Ovulasyonu yaşa bakılmaksızın tüm sıçanlarda ve estrus siklusunun her döneminde artmış buldular. Aynı yaştaki sıçanlarda ovule olmuş oosit sayısı siklus döneminden etkilenmediğini fakat azalan yaşla beraber ovule olmuş yumurta sayısı arttığını buldular. Çalışmanın sonucunda Wistar-Imamichi ratların PMSG ve HCG tedavisi ile estrus siklusunun her döneminde indüklendiğini ve etkin süperovulasyonun 12 haftalık ratlarda olduğunu belirttiler (188).

Başka bir çalışmada, erişkin ratların estrus siklusları 4. gün LH-RH agonistleri vererek senkronize edildi. Ratlara 2. günde subkutan sürekli infüzyon yapabilen değişik dozlarda FSH + HCG içeren ozmotik minipompalar yerleştirildi. Ya da tek doz (15 IU-60IU arası) eCG yapıldı. Optimal doz (3.4 U/gün) FSH infüzyonu alan ratlarda 44.1 ± 5.4 oosit/rat ovule olurken en etkin dozda (60 IU) eCG

tedavisi sonrasında 1. günde 20.5 ± 4.3 oosit/rat ovule oldu. En yüksek ovulasyon hızı estrus senkronizasyonu sonrası FSH infüzyonu alan ratlarda gözükmesi nedeniyle bu metodun kullanılmasını önerdiler (189).

Sprague-Dawley ratlarda (5-7 hafta) yapılan çalışmada; 1. grup ratlara PMSG ve hCG (12.5, 25, 50 ve 100 IU/kg) enjekte ettiler. Takibinde fertil erkek ratlarla çiftleştirildi. Genç ratların PMSG ve hCG dozları 25 IU/kg olduğunda üreme performansları (doğum oranı %87.5) en yüksek bulundu. Grup 2 de PMSG ve hCG (100, 150, ve 300 IU/kg) superovulasyonu indüklemek için verildi. PMSG ve hCG dozu 150 ve 300 IU/kg dozunda, 100 IU/kg dozuna göre superovulasyon açısından daha fazla olduğunu buldular (190).

Bizim çalışmamızda Balb-c fareler 14-16 haftalık olarak seçildi. Farelere estrus siklusları göz ardı edilerek FSH enjeksiyonunu takiben 48 saat sonra hCG enjeksiyonu yapıldı. Çalışmamızda elde edilen oosit sayısının FSH ve hCG dozları ile orantılı olarak arttığı ve en yüksek oosit sayılarının 200 IU FSH, 200 IU hCG dozlarında elde edildiğini gördük. Ayrıca hCG enjeksiyonu sonrasında OPU için bekleme süresinde elde edilen oosit sayısı ile ilişkili görülmektedir.

Sonuç olarak, özellikle oosit toplama evresinden önce olasılıkla uzun süreli ve pahalı bir deneyin gerçekleştirildiği deneysel IVF çalışmalarında çalışmacıların kendi kullandıkları deneklere ait optimal doz ve süreyi belirleyen pilot ovulasyon indüksiyon çalışmalarını da çalışma planlarına almalarının gerekliliğini işaret etmektedir.

VI. TARTIŞMA

Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının fertilizasyon oranları üzerine etkilerini inceledik. Fertilizasyon oranları kontrol grubunda (1.grup) %85, dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (5. grup) (%36) erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (2. grup) (%68.7), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (6. grup) (%20,6) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta fertilizasyon oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaktaydı ($P=0.002$, $P<0.01^{**}$). Erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta fertilizasyon oranında % olarak azalma görülürken bu etki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi ($P=0,422$, $P>0.05^{NS}$). Ayrıca hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta kontrol grubuna göre fertilizasyon oranında anlamlı derecede azalma ($P=0.000$, $P<0.001^{***}$) saptadık (Tablo IV.2, Tablo IV. 3).

Sigara içen kadın ve erkeklerde yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarıyla ilgili çelişkili raporlar yayınlanmıştır. Bazı çalışmalar, bizim çalışmamızdan farklı olarak, fertilizasyon oranı, gebelik ve sigara içme alışkanlığı arasındaki ilişkiye dair kanıt gösteremediler (79,191,192,193).

Harrison ve ark.'nın,108'i sigara içen YÜT tedavisi alan, 650 hastanın sonuçlarını kapsayan çalışmalarında, ovulasyon, fertilizasyon, implantasyon ve gebelik sonuçları üzerine sigaranın etkilerini değerlendirdiler. Sigaranın fertilizasyon oranlarına etkisi açısından bizim çalışmamızdan farklı olarak anlamlı fark saptamadılar. Ancak sigara içen hastalarda sigara içmeyen hastalara göre daha az sayıda oosit, yarıdan daha az oranda gebelik elde edildiğini ve sigara içerek gebe kalanların daha yüksek oranda düşük yaptığını bildirdiler (191).

Hughes ve ark.'nın, sigaranın erkek ve kadın hastalarda IVF-ET sonuçlarına etkisini inceledikleri çalışmalarında, sigara içen ve içmeyen gruplar arasında fertilizasyon, gebelik oranlarının benzer olduğunu saptadılar. Buna rağmen çalışmalarında aktif sigara içenlerde gonadotropin dozunun daha yüksek (24.7 ampul ; 19.8 Ampul) ve tedavi süresinin sigara içmeyenlere göre daha yüksek (10.2 gün ;9.2) olduğunu bildirdiler. (192).

Pattinson ve ark.'nın (79), daha önceden tedavi almamış, IVF-ET tedavisi için başvuran 447 çifti retrospektif olarak inceledikleri çalışmada, sigara içenlerde ve içmeyenlerde sikluslarda ulaşılan pik östradiol düzeyi, toplanan oosit sayısı, fertilizasyon oranı ve implantasyon oranı arasında istatistiksel anlamlı fark saptamadılar. Fakat spontan düşük insidansı sigara içenlerde daha yüksek (%42.1; %18.9) ve dolayısıyla IVF siklusu başına doğum oranı sigara içen grupta anlamlı oranda düşük bulundu (11/124, %9.6; 40/236, %17). Pattison ve ark. sadece erkeğin sigara içmesinin fertilizasyon oranına etki göstermediğini belirttiler. Bizim çalışmamızda kontrol grubunda fertilizasyon oranı %85 iken, erkek farelerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta fertilizasyon oranını %68.7 olarak saptadık. Sadece erkek farelerin sigara dumanına maruz kalması fertilizasyon oranını yüzde olarak azaltırken bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi (P=0,422, P>0.05^{NS}). Ancak hem dişi hem de erkek farelerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta kontrollere göre fertilizasyon oranı %20.6'ya (P=0.000, P<0.001^{***}) düşmekte ve bu oran sadece dişi farelerin sigara dumanına maruz kaldığı gruptaki fertilizasyon oranındaki (%36) (P=0.002, P<0.01^{**}) düşmeden daha anlamlı düzeyde idi. Dolayısıyla sigaranın erkek fertilitesi azaltığı muhtemeldir (Bkz. Tablo. IV.2.)

Sterzik ve ark.'nın, yaşları 23-29 arasında değişen ve ilk defa IVF programına başvuran ovulatuvar fonksiyonlu, normal tubal faktörlü 197 kadın hastadan oluşan bir kohort çalışmasında sigaranın IVF tedavisi ile elde edilen fertilizasyon ve gebelik oranları üzerine etkisini incelediler. Çalışma popülasyonu sigara içmeyenler (n=68), pasif içiciler (n=26), aktif içiciler (n=103) idi. Sonuçlara bakıldığında fertilizasyon ve gebelik oranlarında farklı gruplar arasında anlamlı fark bulamadılar. Kadının sigara içmesi fertilizasyon potansiyeli üzerinde klinik olarak tesbit edilebilen bir bozulmaya yol açmadığını saptadılar (193).

Bizim çalışmamızın sonuçları ile benzer olarak, sigara kullanan kadınlarda, fertilizasyon oranının ve gebelik oranlarının düştüğünü bildiren yayınlar da mevcuttur (16,70,194,195).

Elenenbogen ve ark.'nın (16), 37 yaş altında, tubal faktörlü 41 kadın hastada (n= 20, sigara içen; n= 21 sigara içmeyen), sigaranın fertilizasyon oranı üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada sigara içen grupta, içmeyen gruba göre daha düşük fertilizasyon oranı saptadılar (%40.9; %61.7). Bizim çalışmamızda da benzer olarak

sigara dumanına maruz bırakılan dişi farelerde, fertilizasyon oranı % 36 iken, sigara dumanına maruz kalmayan farelerde % 85 olarak saptadık (Bkz. Tablo. IV.2.).

Rosevear ve ark.'nın (194), IVF tedavisi uygulanan hastalarda sigara içmeyle azalan fertilitte oranları arasındaki mekanizmayı inceledikleri çalışmalarında, ovaryan follüküler sıvıda kotinin konsantrasyonu 20ng/ml altında olan hastalarda 116 oosit toplandı ve bunlardan 84 tanesi fertilize (%72) oldu. Buna karşılık kotinin konsantrasyonu 20 ng/ml üzerinde olan hastalarda 45 oosit toplandı ve bunlardan 20 tanesi fertilize (%44) oldu ($p<0.01$). Bizim çalışmamızda buna benzer olarak sigara dumanına maruz kalmayan dişi farelerden 20 oosit toplandı ve bunlardan 17 tanesi (%85) fertilize oldu. Sigara dumanına maruz kalan dişi farelerden ise 25 oosit toplanırken bunların 9 tanesi fertilize (%36) oldu (Bkz. Tablo. IV.2.). Ancak çalışmamızda kotinin düzeyleri ölçülmedi. Rosevear ve ark. kotinin düzeyleri arttıkça fertilizasyon oranında anlamlı düşme olduğunu belirttiler ve IVF tedavisi uygulanacak hastaların sigarayı bırakmaları ya da azaltmaları yönünde teşvik edilmesini önerdiler .

Zenses ve ark., IVF-ET tedavisi alan 234 hastayı değerlendirdiler. Follikül sıvısı kotinin düzeyi ve IVF-ET sonuçları arasındaki ilişkiyi araştırdılar. 35 yaşın altındaki hastalarda kotinin konsantrasyonlarının fertilizasyon üzerinde etkisi olmadığını, fakat 35 yaş üzerindeki hastalarda lineer olmamakla beraber kotinin düzeyleri arttıkça fertilizasyonun azaldığını belirttiler (195).

El- Nemr ve ark.'nın IVF –ET tedavisi olan 173 kadın hastayı (108 sigara kullanmayan ve 65 sigara kullanan kadın) retrospektif olarak değerlendirdikleri çalışmada özellikle genç kadınlarda (<36 yaş) olmak üzere sigara içen kadınlarda daha yüksek ortalama bazal serum FSH konsantrasyonuna sahip olduklarını buldular($p\leq 0.0001$). Bu hastalar sigara içmeyenlere nazaran ovaryan stimülasyon için anlamlı şekilde daha yüksek gonadotropin dozlarına gereksinim duydular ($p<0.0001$). Sigara içmeyenlere nazaran sigara içenlerde daha düşük ortalama oosit sayısı elde edildi ($p\leq 0.0001$) ve kesintiye uğrayan siklus sayısı (%18.5'e karşın %8.5) ve total fertilizasyon başarısızlığı (%18.5'e karşın %8.5) daha yüksek bulundu. Sigara içenlerdeki siklus başına klinik gebelik oranı %16.9 iken sigara içmeyenlerde bu değer %21.3 tü. Sonuçta, kadınlardaki sigara içme alışkanlığının

over rezervlerini önemli ölçüde düşürdüğünü ve erken yaşlardaki ovaryan stimülasyonuna karşı yetersiz cevap vermelerine yol açtığını düşündüler (70).

Mevcut biyolojik, deneysel ve epidemiyolojik veriler infertilite ve sigara dumanı arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Sigara dumanındaki kimyasal maddeler reproduktif fonksiyon kaybını hızlandırmakta ve folliküler yetmezliği hızlandırıyor gözükmektedir. Ayrıca menopoz yaşını 1-4 yıl erken yaşa çekmektedir. Bazal FSH düzeyleri sigara içmeyenlere göre aktif ve pasif sigara içicilerde belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Sigara içenlerde luteal faz süresince üriner östrojen atılımı düşmekte ve bu da sigara dumanının granüloza hücrelerindeki aromatazları inhibe etmesine bağlanmaktadır. Ayrıca spontan abortus ve ektopik gebelik risklerinde artış olmaktadır. Sigaranın reproduktif performansı negatif yönde etkilediği muhtemel bir mekanizma, gamet mutagenesidir. İnsan germ hücrelerindeki hem kromozom hem de DNA hasarı tütün dumanına maruz kalmaktan kaynaklanabilir. Sigaranın yıkıcı etkisi tedaviye alınan yaşlı kadınlarda daha da aşikar hale gelmektedir. Dolayısıyla sigaranın etkileri ve ileri yaş oosit yetmezlik oranını hızlandıran bir sinerji yaratmaktadır. Bozulan oosit kalitesinde yer alan muhtemel mekanizmalar arasında folliküler sıvıdaki sigara dumanından elde edilen kadminyum, kotinin gibi toksinlerin varlığı yer almaktadır. Çalışmamızda saptadığımız sigara dumanına maruz kalan dişi farelerde fertilizasyon oranının azalması özellikle bozulan oosit kalitesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. ART sikluslarında sigara içenlerin içmeyenlere göre gebe kalmak için neredeyse 2 kat daha fazla IVF girişimine ve daha yüksek dozlarda gonadotropine ihtiyaç duyduklarına dikkat çekilmiştir. Pasif içiciliğinde sigara içenlerde gözlenenler kadar büyük reproduktif neticelere neden olabileceği gösterilmiştir. Semen parametreleri ve sperm fonksiyon testlerinin sonuçları sigara içenlerde sigara içmeyenlerden genellikle daha kötüdür, ancak sigaranın erkek fertilesini azalttığı henüz kesin olarak gösterilememiştir. Bizim çalışmamızda da sadece erkek fareler sigara dumanına maruz bırakıldığında fertilizasyon oranında anlamlı düzeyde azalma olmazken, hem dişi hem erkek fareler sigara dumanına maruz bırakıldığında sigara dumanının etkisinin daha da arttığını saptadık. Dolayısıyla sigaranın erkek fertilesini azalttığı muhtemeldir. Çalışmamızda, sigaranın implantasyon ve gebelik

sonuçları üzerine ve geleneksel sperm parametreleri (sperm konsantrasyonu, motilite, morfoloji) üzerine etkileri değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının klivaj oranı üzerine etkilerini inceledik. Klivaj oranlarını, kontrol grubunda (1.grup) (%88), dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (5. grup) (%88), erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (2. grup) (%90) , hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (6. grup) (%83,3) olarak bulduk. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre, dişilerin, erkeklerin ve hem dişi hemde erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupların klivaj oranları arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$), (Tablo IV.2, Tablo IV. 4).

Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının embriyo gelişim oranı üzerine etkilerini inceledik. Embriyo gelişim oranları, kontrol grubunda (1.grup) (%75), dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (5. grup) (%32), erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (2. grup) (%62.5), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta (6. grup) (%17.2) bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta embriyo gelişim oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaktaydı ($Z=3,20$, $P<0.01^{**}$). Erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta embriyo gelişim oranında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değişiklik olmazken ($Z=0,81$, $P>0.05^{NS}$), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma ($Z=4,83$, $P<0.001^{***}$) saptadık (Tablo IV.2, Tablo IV. 4).

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Toplam embriyo sayısına göre 3.günde, kontrol grubunda (1.grup) (%26) olan grade I sağlıklı embriyo gelişimi; sigara dumanına maruz kalmış dişilerle elde edilen grupta (5. grup) (%12.5), erkeklerle elde edilen grupta (2. grup) (%20) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre, dişilerin ve erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı gruplar arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$), (Tablo IV.2).

Sigara dumanının fertilize olan oositlerdeki embriyo klivaj oranlarına etkisini incelediğimizde, literatürdeki çalışmalarda bizim bulgularımızın aksine sigara dumanı ile embriyo klivaj oranı arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

Hughes ve ark.'nın, 297 IVF-ET siklusunda sigaranın etkilerini inceledikleri çalışmada, embriyo klivaj oranlarının içilen sigara sayısı ile korele olarak azaldığını buldular (196).

Başka bir çalışmada, insan sperminde bulunan DNA kırıklarının insidansını ve semen analiz parametreleri ile tesbit edilen DNA hasarı ile IVF'deki fertilizasyon arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla 298 semen örneği incelediler. Sigara içen (35 erkek hasta) dan elde edilen spermlerdeki DNA kırık oranı (4.7 ± 1.2) sigara içmeyen (78 erkek hasta) gruptan elde edilen spermlerdeki DNA kırık oranından (1.1 ± 0.02 ; $p=0.01$) daha fazlaydı. DNA kırık yüzdesi ile fertilizasyon oranı ve embriyo klivaj oranı arasında negatif bir ilişki olduğunu belirttiler(96). Bizim çalışmamızda Hughes ve ark (196), Sun ve ark.'dan (96) farklı olarak sigara dumanına maruz bırakılan dişi ve erkek farelerde klivaj oranının kontrollere göre değişmediğini saptadık (Bkz. Tablo. IV.2.).

Maximovich ve ark.'nın, IVF programına başvuran 340 hastada sigaranın etkilerini inceledikleri çalışmada embriyo transferi ile sonuçlanan oositin toplandığı sikluslar göz önüne alındığında ($n=253$), embriyo transferi başına gebelik oluşma oranı açısından, sigara içenlerle içmeyenler arasında anlamlı fark gösteremediler (%35, %31) fakat sigara içen grupta düşük oluşma oranı içmeyen gruba göre anlamlı düzeyde fazla bulundu. ($\%73$, $\%24$), ($P=0.01$) (197).

Weigert ve ark, IVF_ET tedavisi uygulanan 834 hastayı bir anket çalışmasıyla değerlendirdiler. Hastalar, uygulanan stimülasyon protokolüne göre kombine stimülasyon (I.grup: CC+HMG), ultra short protokol (II. Grup: GnRH –a + HMG ya da FSH), ve III. Grup long down regulation protokol olarak sınıflandırıldı. Sigaranın oosit sayısı, embriyo skoru ve bazal hormon değerleri üzerindeki etkisi araştırdılar. Genel olarak sigara içen hastaların, sigara içmeyen hastalara göre, daha az oosit üretme eğiliminde ($p=0.0931$) ve anlamlı şekilde düşük embriyo skoruna ($p=0.0379$) sahip olduğunu saptadılar. Kullanılan stimülasyon protokolüne göre incelendiğinde ise: Grup 1 stimülasyon protokolü uygulanan sigara içen hastalar sigara içmeyenlere göre belirgin şekilde ($p=0.023$) daha düşük embriyo

skoru ve daha az oosit üretimi ($p=0.0113$), daha az fertilizasyon oranı ($p=0.0072$) ve daha az embriyo transfer oranı ($p=0.0067$) gösterdiler. Embriyo transferi yapılan günde daha ince endometriuma sahiplerdi ($p=0.0366$). Çalışmada fertilizasyon ve gebelik oranları arasında sigara içen ve içmeyen gruplarda anlamlı derecede fark saptanmamasına rağmen özellikle klomifen sitrat stimülasyonu sonrası anlamlı derecede değişmiş hormonal parametreler ve negatif olarak etkilenmiş oosit parametreleri bulundu. Dolayısıyla sigara içen hastalar için GnRH-a + HMG ile olan protokolün daha uygun olduğunu ve IVF-ET tedavisi öncesinde sigaranın üreme ve hormonal sistem üzerindeki kompleks etkilerinden kurtulmak için sigaranın bırakılmasını önerdiler (198).

Neal ve ark retrospektif olarak IVF (n:97) , ya da ICSI tedavisi (n:128) alan 225 hastayı incelediler. Hastalar sigaraya maruziyetlerine göre gruplandırıldı. Buna göre 39 hasta sigara kullanan (18 IVF, 21 ICSI) 40 tanesi pasif içici (16 IVF, 24 ICSI) ve 146 tanesi sigara maruziyeti bulunmayan (63 IVF 83 ICSI) hastaydı. Çalışmanın klinik sonuçlarına bakıldığında hastaların yaşı, stimülasyon için kullanılan FSH miktarı, hCG enjeksiyonunun yapıldığı gündeki estradiol seviyesi, alınan oosit sayısı, nükleer matürite, transfer edilen embriyo sayısı ve kriyoprezarvasyon için uygun olan embriyolar açısından 3 grup arasında istatistiksel açıdan hiçbir farklılık bulamadılar. Sigara kullanan (%57), pasif içici (%58) ve sigara maruziyeti bulunmayan (%63) gruplarındaki fertilizasyon oranları benzer bulundu. 48 ve 72. saatte yapılan kümülatif embriyo skoru değerlendirmesinde embriyo kalitesinde hiçbir farklılık olmamasına ve transfer edilen embriyoların kalitesinde de hiçbir farklılık bulunmamasına rağmen sigara kullanan (%19.4), pasif içici (%20) ve sigara maruziyeti bulunmayan (%48.3) grupları arasında embriyo transferi başına düşen gebelik oranı açısından belirgin farklılık ($p<0.001$) bulunduğunu belirttiler (60).

Van Voorhis ve ark.'nın, 18 sigara içen ve 36 sigara içmeyen hastada sigaranın ovulasyon indüksiyonu üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, sigara içmeyenlerle eşit miktarda gonadotropin uygulanmasına rağmen sigara içenlerin daha düşük oranda serum östradiole sahip olduklarını, daha az folliküle sahip olduklarını ve bu hastalardan daha az oosit toplandığını siklus başına daha az embriyo elde edildiğini saptadılar (199).

Başka bir çalışmada, YÜT tedavisi alan 499 hasta üzerinde sigaranın ovarian fonksiyon ve fertilité üzerine etkisini incelediler. Çalışmada sigara içmeyen hastalarla karşılaştırıldığında, hem aktif içici hastalar hem de sigarayı bırakmış olan hastalar, gonadotropinin stimule ettiği ovaryan fonksiyonlarda azalma gösterdi. Artan sigara maruziyeti serum estradiol konsantrasyonları, toplanan oosit sayıları ve elde edilen embriyo sayılarında azalmayla ilişkili görüldü. Ortalama olarak her on-paket yıl sigara kullanımında 2.5 daha az matür oosit ve 2.0 daha az embriyo elde edildiğini bildirdiler (80).

Bazı çalışmalar babanın sigara içme alışkanlığının sperm fonksiyonu ve erken embriyo gelişimi üzerindeki etkilerine odaklanmışlardır (87).

Kapawa ve ark.'nın (87) erkeğin sigara kulanmasının testiküler fonksiyon, spermin fertilizasyon kapasitesi, implantasyon için blastokist gelişme kapasitesini araştırdıkları çalışmada 10 hafta boyunca A grubu (n:20) ratlar sigara dumanına , B grubu (n:20) ratlar tütsü dumanına maruz bırakıldılar C grubu (n:20) kontrol grubunu oluşturduklar. Sonuç olarak IVF tedavi sikluslarında ,Grub A da ,fertilizasyon oranı (%30), klivaj oranı (%23), blastokist gelişim oranı (%2-8; 96-108 saat) idi, Grub B de fertilizasyon oranı (%86), klivaj oranı (%64), blastokist gelişim oranı (%10-25; 96-108 saat),idi Grup C de fertilizasyon oranı (%82), klivaj oranı (%66), blastokist gelişim oranı (%9-23; 96-108 saat) idi. Sonuç olarak Grup A da fertilizasyon oranı, klivaj oranı, blastokist gelişim oranı daha azdı. ICSI sikluslarında gruplar arasında fertilizasyon oranı, klivaj oranı, blastokist gelişim oranı arasında fark saptanmadılar. Grup A da IVF tedavisinde fertilizasyon oranının, daha düşük bulunması sigara dumanının spermin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu üzerinde bozucu etkisi sonucunda spermin zona pellusida penetrasyonunun azalmasına bağladılar. Sigara içen erkek hastalarda ICSI'nin spermin fertilize etme kapasitesi, sonrasında klivajı ve blastokist gelişimini etkilememesi nedeniyle uygun bir tedavi olduğu düşündüler. (87). Bizim çalışmamızda da sigara dumanına maruz kalan dişilerde fertilizasyon oranı (%36) embriyo gelişim oranı (%32) azalırken klivaj oranı (%88) değişmedi. Dolayısıyla sigara dumanı dişilerde fertilizasyon oranı ve embriyo gelişim oranını etkilemektedir. Erkek farelerin sigara dumanına maruz kalmasıyla fertilizasyon oranı (%68.7) embriyo gelişim oranı (%62.5) yüzde olarak azalırken istatistiksel olarak anlamdı düzeyde değildi. Klivaj oranı (%90) değişmedi. Ancak hem erkek hemde

dişi farelerin sigara dumanına maruz kalması durumunda fertilizasyon oranı (%20.6), embriyo gelişim oranı (%17.2) daha da azalırken, klivaj oranı (%83.3) değişmedi (Bkz. Tablo. IV.2.). Bu bulgular bize Kapawa ve ark.'ları (87) ile benzer olarak erkeğin sigara dumanına maruz kalmasının ile fertilizasyon ve embriyo gelişim oranlarını etkilediğini düşündürmektedir. Literatürdeki bazı çalışmalarda sigara dumanının, spermdeki anöploidi sıklığının artışı, düşük seminal plazma antioksidan düzeyleri ve sperm DNA'sında oksidatif hasar artışı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Matür sperm oldukça düşük hücre tamir mekanizmasına sahip olduğundan sigara dumanına maruz kalmanın sonucu olarak biriken oksidatif stres mitokondrial ve nükleer DNA hasarını indükleyebilir. Kadınlarda sigara dumanında bulunan toksik maddelerin etkisi ile oosit kalitesi bozulmakta ayrıca değişen genetik ve epigenetik faktörlerin aktarılması ile ilişkili olarak embriyo gelişim oranlarında azalma olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız fertilize olan oositlerin klivajında sorun olmadığını göstermektedir. Bu bulgu bize süperovulasyonla elde edilen oositlerin birbirinden farklı etkilenmekte olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca zona-sperm birleşmesinde sigara dumanının olumsuz etkisinin daha belirgin olduğu söylenebilir. Dolayısıyla IVF endikasyonlu da olsa sigara içen eşlerde ICSI planlanmasında öngörü oluşturulabilir.

Çalışmamızda Balb-c farelerde antioksidan (E vitamini) kullanımının fertilizasyon oranı üzerindeki etkilerini inceledik. Fertilizasyon oranlarına baktığımızda kontrol grubumuzda (1. grup) (%85), Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%81.2), erkeklerde (3. grup) (%73.9), hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta (11.grup)(%43.7) olarak bulduk. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre fertilizasyon oranını, Vitamin E alan dişilerde ($P=1.00$, $P>0.05^{NS}$) ve erkeklerde ($P=0.467$, $P>0.05^{NS}$) değişmezken, hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta istatistiksel olarak azalmış saptadık ($P=0.014$, $P<0.05^*$) (Tablo IV.10, Tablo IV.11).

Çalışmamızda Balb-c farelerde antioksidan kullanımının klivaj oranı üzerindeki etkilerine baktık. Kontrol grubumuzda (1. grup) (%88), olan klivaj oranı, Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%92.3), erkeklerde (3. grup) (%88.2), hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta (11.grup) (%71.4) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre klivaj oranı, Vitamin E

alan dişilerde ($P=1.00$, $P>0.05^{NS}$) ve erkeklerde ($P=1.00$, $P>0.05^{NS}$) değişmezken ,ayrıca hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark saptamadık ($P=0.552$, $P>0.05^{NS}$),(Tablo IV.10, Tablo IV.12).

Çalışmamızda Balb-c farelerde antioksidan kullanımının embriyo gelişim oranı üzerindeki etkilerine baktık. Embriyo gelişim oranları kontrol grubumuzda (1. grup) (%75), Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%75), erkeklerde (3. grup) (%65.2), hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta (11.grup) (%31.2) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre embriyo gelişim oranı, Vitamin E alan dişilerde ($P=1.00$, $P>0.05^{NS}$) ve erkeklerde ($P=0.526$, $P>0.05^{NS}$), değişmezken , hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta istatistiksel olarak azalmış saptadık ($P=0.017$, $P<0.05^*$),(Tablo IV.10, Tablo IV.13).

Çalışmamızda Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Toplam embriyo sayısına göre 3.günde, kontrol grubunda (1.grup) (%26) olan grade I sağlıklı embriyo gelişimi; Vitamin E alan dişilerde (9. grup) (%33.3) ($P>0.05^{NS}$), erkeklerde (3. grup) (%33.3) ($P>0.05^{NS}$) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre, Vit E alan dişilerin ve erkeklerin Grade I embriyo gelişimi oranı arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$),(Tablo IV.10, Tablo).

Vitamin ve minerallerin üreme fonksiyonu üzerindeki etkileri yoğun araştırmalara konu olmuştur. Özellikle vitamin A prekürsörü olan Beta karotenin üreme fonksiyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca Vitamin E ve Selenyumun, kalsiyum, fosfor ve Vitamin D'nin dietle alımının üreme fonksiyonu üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (153). Biz de çalışmamızda antioksidan özelliği olan E vitamininin fertilizasyon parametreleri üzerine olabilecek etkilerini deneysel olarak hayvan modelinde göstermeyi amaçladık.

Kessopoulou ve ark. ROS'un erkek fertilesi üzerindeki etkilerinin antioksidan olarak kullanılan vitamin E tarafından düzeltilbileceğini plasebo kontrollü randomize çift kör bir çalışmada gösterdiler. Bu çalışmada sağlıklı kadın partnere sahip semenlerinde yüksek oranda ROS bulunan 30 sağlıklı erkek kullandılar. Hastaları randomize olarak iki gruba ayırdılar. Her hastaya üç ay süresince 600 mg/gün vitamin E (Ephynal 300 mg tb) ya da plasebo tedavisi

verdiler. Spermatozonun in vitro fonksiyonundaki düzelme semen analizi, motilite değerlendirilmesi, ROS üretimi, zona bağlanma testi, ve gebelik oranlar karşılaştırılarak araştırıldı. Artan vitamin E kan düzeyi ile zona bağlanma oranında artış olduğunu gözlediler (24).

Geva ve ark. (200) IVF programında olan hastalarda antioksidan tedavinin spermatozoalar ve fertilizasyon oranları üzerindeki etkilerini prospektif olarak araştırdılar. Daha önceki IVF siklusunda düşük fertilizasyon oranı bulunan normospermik erkek gönüllülere 200 mg/gün oral yolla 3 ay süreyle vitamin E vererek lipid peroksidasyon potansiyelleri spermatozoaların ultramorfolojik analizi ve siklus başına fertilizasyon oranına baktılar. 1 aylık Vitamin E tedavisi sonrasında siklus başına fertilizasyon oranı; 19.3 +/- 23.3 den 29.1 +/- 22.2 ye yükseldiğini tesbit ettiler. Bizim çalışmamızda Geva ve ark.'ndan (200) farklı olarak farelere, 10 hafta süreyle, intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün dl-alfa tokoferol asetat (E vitamini) verdik. Tedavi sonrası erkek farelerde, fertilizasyon oranı (%73.9), klivaj oranı (%88.2), embriyo gelişim oranı (%65.2) kontrol grubuyla benzer bulundu (Bkz. Tablo. IV.10.). Ayrıca tedavi alan dişi farelerde de benzer etki gözlemlendi. Geva ve ark.'(200). morfolojik analizde vitamin E tedavisinin subsellüler organelleri etkilenmediğini gösterdiler. Sonuç olarak erkeklerde bir aylık vitamin E tedavisinin fertilizasyon oranını subsellüler düzeyde değişiklik yapmadan, lipid peroksidasyonunu azaltarak düzelttiğini belirttiler .

Keskes ve ark. 54 gönüllü infertil erkek hastada yaptığı çalışmada semen örneklerini MDA düzeyleri sperm kalitesi ve vitamin E düzeyi yönünden karşılaştırdılar. Bu çalışma da 28 hastaya 3 ay boyunca 400 mg vitamin E 225 µg selenyum verdiler. Geriye kalan hastalara aynı sürede 4.5 mg /gün Vitamin B verdiler. Vitamin E ve selenyum takviyesi vitamin B ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerini azalttığını ve sperm motilitesinde iyileşme sağladığını buldular. Bu nedenle erkek infertil hastaların tedavisinde semen kalitesini arttırmak için vitamin E ve selenyum tedavisinin faydalı olduğunu önerdiler (201).

Bununla birlikte, erkek subfertilite tedavisi olarak oral antioksidan uygulamasının etkinliği hala şüphelidir Rolf ve ark ları, astenoozoospermisi ya da oligoasenozoospermisi olan 31 hastada Vitamin C ve vitamin E vererek randomize, plasebo kontrollü çift kör çalışma yaptılar ve yüksek doz antioksidan tedavinin

infertilite üzerine etkilerini araştırdılar. 56 gün süresince; gruplardan birine (n-15) 800 mg vitamin E ve 1000 mg vitamin C , diğerine (n-16) plasebo verdiler. Vitamin C ve vitamin E'nin konvansiyonel semen parametreleri (ejakulat volümü, pH ,renk motilite, morfoloji) ve 24 saat sperm yaşam süresi üzerinde düzeltici etki yapmadığı sonucuna vardılar (25).

Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının fertilizasyon oranı üzerindeki etkilerini inceledik. Fertilizasyon oranlarına baktığımızda sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubumuzda (6. grup) (%20,6), sigara dumanıyla beraber Vit. E alan dişilerde (14. grup) (%20), erkeklerde (8. grup) (%19,3), hem dişi hem de erkeğin sigara dumanıyla beraber Vit. E aldığı grupta (16.grup) (%5) olarak saptandı. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda, dişilerin sigara dumanıyla beraber VitE aldığı grupta fertilizasyon oranında ($Z=0,06, P>0,05^{NS}$), erkeklerin sigara dumanıyla beraber Vit E aldığı grupta ($Z=0,13, P>0,05^{NS}$), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanıyla beraber Vit E aldığı grupta ($P>0,05^{NS}$) kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı fark saptamadık (Tablo IV.6, Tablo IV.7).

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının klivaj oranı üzerine etkilerini inceledik. Sadece sigara dumanına maruz bırakılan grupta (6. grup) (%83,3) olan klivaj oranı, sigara dumanıyla beraber Vit-E alan dişilerde (14. grup) (%60) ve erkeklerde (8. grup) (%83) olarak saptandı. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin klivaj oranları arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$),(Tablo IV.6, Tablo IV.8).

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının embriyo gelişim oranı üzerine etkilerini inceledik Embriyo gelişim oranları sadece sigara dumanına maruz bırakılan grupta (6. grup) (%17,2), sigara dumanıyla beraber Vit-E alan dişilerde (14. grup) (%12) ve erkeklerde (8. grup) (%16,1) olarak saptandı. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin embriyo gelişim oranları arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$),(Tablo IV.6, Tablo IV.9).

Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Toplam embriyo sayısına göre 3.günde, sadece sigara dumanına maruz bırakılan grupta (6. grup) (%20) olan grade I sağlıklı embriyo gelişimi, sigara dumanıyla beraber Vit-E alan dişilerde (14. grup) (%66.6) ($P>0.05^{NS}$), erkeklerle elde edilen grupta (8. grup) (%20) ($P>0.05^{NS}$) olarak bulundu. Grupları istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin Grade I embriyo gelişimi oranı arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$),(Tablo IV.6).

Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen örnekleri üretilir. Serbest radikaller hücrelerde membran lipidleri, proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerine çok sayıda farklı moleküller yoluyla oksidatif hasara neden olmaktadır (202).

Bazı çalışmalarda oral antioksidanlar sigara tiryakilerindeki ve erkek faktörlü infertilite hastalarındaki sperm kalitesini arttırmışlardır. Aynı zamanda semeninde yüksek düzeyde ROS bulunan sağlıklı erkekler ile geçmişte yapılan IVF sikluslarından düşük fertilizasyon oranı gösteren fertil normospermik erkeklerdeki fertilizasyon potansiyelini arttırmışlardır (22,23,24,25).

Dawson ve ark.'nın ağır sigara içicilerde antioksidan tedavisinin sperm kalitesi üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, 75 hastaya (20-35 yaş arası hasta) 1 ay süresince 200 mg/gün, 1000 mg /gün askorbik asit ya da plasebo tedavisi verdiler. 3 tedavi grubu arasında tedavi öncesi döneme göre sperm kalitesi üzerinde iyileşme olup olmadığını araştırdılar plasebo alan grupta sperm kalitesinin değişmediğini askorbik asit 1000 mg/gün alan grupta 200 mg/gün alan gruba göre serum ve seminal plazma askorik asit düzeyindeki artışla korole şekilde sperm kalitesinin iyileştiğini saptadılar. Sonuç olarak ağır sigara içicilerin 200mg/günün üzerinde askorbik asit kullandıkları zaman sperm kalitesinin iyileştiğini öne sürdüler (22).

Kadınlarda uygulanan oral antioksidan tedavisiyle ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Erkeklerde olduğu gibi oral antioksidanların over, follikül sıvısı, tuba uterina gibi hedef sahalara ulaşip ulaşmadığı belirsizdir. Bununla birlikte, nikotin metabolitlerini kapsayan toksik maddeler bu bölgelere ulaşmaktadırlar; böylece

folliküler savunmaların aşıldığı ve optimal ilaçlar ve dozlar bilinmemesine rağmen antioksidan tedavisiyle kompanse edilen belirli şartların bulunduğunu öne sürmek mantıklıdır (26).

Igarashi, oral yolla günlük 400 mg askorbik asit verilmesinin anovulatuvar kadınlarda klomifenin ovulasyon indükleyici etkisini artırdığı tesbit etmiştir (203).

Antioksidan tedavinin, oosit yaşlanmasının, hücre dışı ortamda (in vitro) fertilizasyon hücresel fragmentasyon ve blastokist dönemine kadar gelişim üzerindeki negatif etkisini engellediği bildirilmektedir (156).

Kültür medyumunun ROS yakalayıcıları, disülfit azaltan reaktifler veya divalent katyon şelasyon ajanlarıyla zenginleştirilmesinin in vitro hayvan embriyo gelişimi için önemli olduğuna dikkat çeken kayda değer miktarda kanıt bulunmaktadır. Örneğin, çeşitli çalışmalarda suplementasyonun, fare embriyosunun iki hücreli bloğunu koruduğu; domuz ve sığır embriyolarındaki erkek pronükleer oluşumunu ve blastokist gelişimini tetiklediği ve fare embriyosu oosit çatlama oranlarını arttırarak yavaş soğutma teknikleriyle yürütülen dondurma-çözme işlemine gösterilen direnci arttırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, insanlarla yapılan çalışma sayısı daha azdır ve bu çalışmalar yoğun şekilde spermatozoaları ele almışlardır. Vitamin E gibi antioksidanlarla zenginleştirilen kültür medyumunun, poliformonükleer lökositler ile defektif spermatozoanın yarattığı ROS'un neden olduğu motilite kaybını nötralize ettiği ve sperm-oosit füzyonunu arttırdığı bazı in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Medyuma vitamin E veya diğer antioksidanlar eklenerek, dansite gradyent sperm hazırlama metotlarıyla ROS üreten hücrelerin uzaklaştırılabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte günümüzde yardımcı üreme laboratuvarlarında dansite gradyent hazırlama metotları rutin şekilde kullanılıyor olmasına rağmen in vitro insan sperm örnekleri için en uygun suplement tipini veya etkisini tanımlayacak hiçbir geniş skalalı prospektif çalışma bulunmamaktadır (26,204,205,206,207,208,209,210,211).

Çalışmamızda, erkek ve dişi farelere antioksidan (E vitamini) verildiğinde kontrol grubuna göre fertilizasyon, klivaj, embriyo gelişim oranlarını istatistiksel anlamlı düzeyde etkilemediğini gördük. Ancak hem erkek hem de dişi farelerin E vitamini aldığı grupta fertilizasyon (%43.7) ve embriyo gelişim oranında (%31.2) istatistiksel anlamlı düzeyde azalma saptadık ($P<0.05^*$) (Bkz. Tablo. IV.10.).

Olumsuz etkilerini saptadığımız antioksidan kullanımına ilgili sonuçlarımız; antioksidanların normal dozlarda gözlenen antioksidan etkilerini, yüksek dozlarında aksine, oksidan etki göstermesine paralel gözükmektedir. Bu bilgiler ışığında normal dozlar halinde, ancak uzun süreli (10 hafta) kullanmamız, yağda eriyen bir vitamin olduğu için idrar eşik düzeyi olmayan bu ajanın depolanması nedeniyle yüksek doz E vitamini ile gözlenen oksidan etkiyi gösterdiğini işaret etmektedir.

Sigara dumanının fertilizasyon parametreleri üzerine olası etkilerini, engellemek amacıyla E vitamini verdiğimiz grupları değerlendirdiğimizde; çalışmamızın sonuçlarına göre sigara dumanına maruz kalan erkek ve dişi fareler ile, sigara dumanı ile beraber antioksidan olarak Vitamin E verilen gruplar karşılaştırıldığında, fertilizasyon oranı, klivaj oranı, embriyo gelişim oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadık (Bkz. Tablo. IV.6.). Bu bulgular bize, sigara dumanının IVF parametreleri üzerine olan olası etkisinin E vitamini kullanımıyla etkilenmediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak bazı çalışmalarda, oral antioksidan kullanımının sigara tiryakilerinde, erkek faktörlü infertilite hastalarında, semeninde yüksek düzeyde ROS bulunan erkeklerde, IVF sikluslarından düşük fertilizasyon oranı gösteren fertil normospermik erkeklerde olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak özellikle kadınlarda uygulanan oral antioksidan tedavisiyle ilgili veriler yetersiz gözükmektedir. Bununla birlikte günümüzde yardımcı üreme laboratuvarlarında antioksidan kullanımı konusunda in vitro insan sperm örnekleri için en uygun supplement tipini veya etkisini tanımlayacak hiçbir geniş skalalı prospektif çalışma bulunmamaktadır. Dikkat edilmesi gereken bir nokta da antioksidan tedavisi iki ucu keskin bir kılıca benzemektedir. Bir yanda istenilen etkiler, diğer yanda antioksidan olarak kullanılan tedavinin doz aşımında oluşan istenmeyen etkiler vardır. Antioksidan kullanımı ile ilgili en uygun supplement tipini ve etkisini belirlemek amacıyla geniş skalalı prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde, yapılan çok sayıda çalışmada gösterildiği üzere, sigara dumanı, gebelik oluşumunun gecikmesi, gametogenezin veya fertilizasyonun etkilenmesi, implantasyon bozuklukları veya gebeliğin sublinik kaybı gibi birçok etkiden sorumludur. Hem kadınlar hem de erkeklerde sigaranın bırakılmasını

cesaretlendirmek ve sigara dumanına maruz kalınmasını önlemek infertiliteye yönelik koruyucu bir yaklaşım olarak önemlidir.

VII. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının fertilizasyon oranları üzerine etkilerini inceledik. Dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta fertilizasyon oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaktaydı ($P=0.002$, $P<0.01^{**}$). Erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta fertilizasyon oranında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değişiklik olmazken ($P=0,422$, $P>0.05^{NS}$), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma ($P=0.000$, $P<0.001^{***}$) saptadık.

2. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının klivaj oranı üzerine etkilerini inceledik. Dişilerin, erkeklerin ve hem dişi hemde erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı gruplar arasında klivaj oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$).

3. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının embriyo gelişim oranı üzerine etkilerini inceledik. Dişilerin sigara dumanına maruz kaldığı grupta embriyo gelişim oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaktaydı ($Z=3,20$, $P<0.01^{**}$). Erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta embriyo gelişim oranında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde değişiklik olmazken ($Z=0,81$, $P>0.05^{NS}$), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma ($Z=4,83$, $P<0.001^{***}$) saptadık.

4. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde sigara dumanının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Dişilerin ve erkeklerin sigara dumanına maruz kaldığı gruplar arasında 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranında kontrol grubuna göre anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$).

5. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının fertilizasyon oranı üzerindeki etkilerini inceledik. Dişilerin sigara dumanıyla beraber VitE aldığı grupta fertilizasyon oranında ($Z=0,06$, $P>0,05^{NS}$), erkeklerin sigara dumanıyla beraber Vit E aldığı grupta ($Z=0,13$, $P>0,05^{NS}$), hem dişi hem de erkeklerin sigara dumanıyla beraber Vit E aldığı grupta ($P>0,05^{NS}$) kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı fark saptamadık.

6. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının klivaj oranı üzerine etkilerini inceledik. Sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin klivaj oranları arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0,05^{NS}$).

7. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının embriyo gelişim oranı üzerine etkilerini inceledik Sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin embriyo gelişim oranları arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0,05^{NS}$).

8. Sigara dumanına maruz bırakılan Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Sadece sigara dumanına maruz bırakılan kontrol grubuna göre, sigara dumanıyla beraber Vit E alan dişilerin ve erkeklerin Grade I embriyo gelişimi oranı arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0,05^{NS}$).

9. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının fertilizasyon oranı üzerindeki etkilerine baktık. Kontrol grubuna göre fertilizasyon oranını, Vitamin E alan dişilerde ($P=1,00$, $P>0,05^{NS}$) ve erkeklerde ($P=0,467$, $P>0,05^{NS}$) değişmezken , hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta istatistiksel olarak azalmış saptadık ($P=0,014$, $P<0,05^*$).

10. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının klivaj oranı üzerindeki etkilerine baktık. Kontrol grubuna göre klivaj oranı, Vitamin E alan dişilerde ($P=1,00$, $P>0,05^{NS}$) ve erkeklerde ($P=1,00$, $P>0,05^{NS}$) değişmezken ,ayrıca hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark saptamadık ($P=0,552$, $P>0,05^{NS}$).

11. Balb-c farelerde antioksidan kullanımının embriyo gelişim oranı üzerindeki etkilerine baktık. Kontrol grubuna göre embriyo gelişim oranı, Vitamin E

alan dişilerde ($P=1.00$, $P>0.05^{NS}$) ve erkeklerde ($P=0.526$, $P>0.05^{NS}$), değişmezken , hem dişi hem de erkeğin Vitamin E aldığı grupta istatistiksel olarak azalmış saptadık ($P=0.017$, $P<0.05^*$).

12. Balb-c farelerde antioksidan (vitamin E) kullanımının 3. günde gelişen sağlıklı Grade I embriyo gelişimi oranı üzerine etkilerini inceledik. Kontrol grubuna göre, Vit E alan dişilerin ve erkeklerin Grade I embriyo gelişimi oranı arasında anlamlı fark saptamadık ($P>0.05^{NS}$).

13. Literatürde, yapılan çok sayıda çalışmada gösterildiği üzere, sigara dumanı, gebelik oluşumunun gecikmesi, gametogenezisin veya fertilizasyonun etkilenmesi, implantasyon bozuklukları veya gebeliğin subklinik kaybı gibi birçok etkiden sorumludur. Hem kadınlar hem de erkeklerde sigaranın bırakılmasını cesaretlendirmek ve sigara dumanına maruz kalınmasını önlemek infertiliteye yönelik koruyucu bir yaklaşım olarak önemlidir.

14. Antioksidan tedavisi iki ucu keskin bir kılıca benzemektedir. Bir yanda istenilen etkiler, diğer yanda antioksidan olarak kullanılan tedavinin doz aşımında oluşan istenmeyen etkiler vardır. Antioksidan kullanımı ile ilgili en uygun supplement tipini ve etkisini belirlemek amacıyla geniş skalalı prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1.Kesim MD. Sigara ve Gebelik. Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni. 2004;38(2),7-14.
- 2.The Practice Committe of the American Society for Reproductive medicine: American Society for Reproductive medicine, Birmingham, Alabama. Fertil Steril 2004;82:62-67.
- 3.Fıçıcıoğlu C, Devranoğlu B, Özden S, Yaltı S, Gürbüz B, Erkanlı G. Sigara içiminin semen kalitesi üzerine etkisi. Zeynep Kamil Tıp Bülteni. 2002;4:48-52.
- 4.Golding JF.: Smoking. In: Brewis RAL, Gibson GJ, Geddes DM. Respiratory Medicine. London. WB Saunders Company, 1990: 445-460.
- 5.Janoff A, Pryor WA, Bengali ZH.: Effects of Tobacco smoke components on cellular and biochemical processes in the lung. Am Rev Respir Dis. 1987; 136: 1058-1064.
- 6.Pekşen Y. Sigara içiminin nedenleri, epidemiyolojisi, pasif içicilik. In: Tür A (ed). Sigaranın sağlığa etkileri ve bırakma yöntemleri. Logos 1995;1-28.
- 7.Nusbaum ML, Gordon M, Nusbaum D, McCarty MA, Vasilakis D. Smoke alarm: a review of the clinical impact of smoking. Prim Care Update Ob/gyns 2000;7:207-214.
- 8.Ebrahim SH, Decoufle P, Palakathodi AS. Combined tobacco and alcohol use by pregnant and reproductive-aged women in United States. Obstet Gynecol 2000;19:193-196.
- 9.Fingerhut LA, Kleinman JC, Kendrick JS. Smoking before, during and after pregnancy. Am J Public Health 1990; 80:541-544.

10. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1532-1539.
11. Hull M, North k, Taylor H, Farrow A, Ford CNC, Delayed conception and active and passive smoking. *Fertil Steril* 2000; 74: 725-733.
12. Mumcu G: Sigaranın fertilitte ve gebelik üzerine etkileri. Özyardımcı N, editor. *Sigara ve sağlık*, Bursa 2002; 257-280.
13. Kulikaus V, Blaustein D, Ablin J. Cigarette smoking and it's possible effects on sperm. *Fertil Steril* 1985; 44(4):526-528.
14. Merino G, Lira SC, Martinez-Chequer JC. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch Andr* 1998; 41(1):11-15.
15. Holzki G, Gall H, Hermann J. Cigarette smoking and sperm quality. *Andrologia* 1991; 23(2): 141-144.
16. Elenbogen A, Lipitz S, Mashiach S. The effect of smoking on the outcome of in vitro fertilization embryo transfer. *Hum Reprod* 1991;6:242-244.
17. Shara F Beatse S, Leonardi M. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidence by the clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 1994; 62:257-262.
18. Carroll EW. Cellular adaptation, injury and death and wound healing. *Stead. Pathophysiology*. Lippincott, Philadelphia, 1998; 39.
19. Özdemir G. Reaktif Oksijen Partikülleri. Eskişehir OGÜTF yayını. 1995.
20. Cruch DF., Prior W.A, Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicologic implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64,111-126

- 21.Horwitt M.K.: Interpretations of requirements for tiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, vitamin E plus comments on balance studies and vitamin 6: *Am. J. Clin. Nutr.* 1986; 44; 973-985.
- 22.Dawson, C.B., Harris, W.A., Teter, M.C., et al.: Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil. Steril.* 1992;58: 1034.
- 23.Lenzi, A., Culasso, F., Gandini, L., et al.: Placebo-controlled, double-blind cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum. Reprod.* 1993;8: 1657.
- 24.Kessopoulou, E., Powers, H.J., Sharma, K.K., et al.: A double blind randomized placebo controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive species associated male infertility. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 825.
- 25.Rolf, C., Cooper, T.G., Yeung, C.H., Nieschlag, E.: Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized placebo controlled double blind study. *Hum. Reprod.* 1999;14, 1028.
- 26.Clare T. Taylor: Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility . *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2001; 10:189-198.
- 27.Tüberküloz S. Tütün. *Yeni Tıp Dergisi* 1988; 63-67.
- 28.Başaran N. Hıncal F.: Çevresel tütün dumanı ve pasif sigara içimi. *FABAD Form. Bil. Der.* 1990; 15:247-248.
29. Buns DM: Cigarette smoking. *Thoracic Oncology.* 1997;51-55.
- 30.Neal M.S., Hughes E.G., Holloway A.C., Foster W.G: Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes 2005;20 (9): 2531-2535.

31. DiCarlantonio G., Talpot P.: Inhalation of Mainstream Cigarette Smoke Retards Embryo Transport and Slows Muscle Contraction in Oviducts of Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Biology of reproduction* 1999;61:651-656.
32. Sohn Ho, Lim HB, Lee YG, Lee DW, Kim YT.: Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats. *Arch Toxicol* 1993; 67:667-673.
33. Lapenna D, Gionia SD, Mezzetti A, Ciofani G, Consoli A.: cigarette smoke, ferritin and lipid peroxidation. *Am J respire Crit Care Med* 1995; 151:431-435.
34. Bridges AB, Scott NA, McNeill GP, Pringle TH and Belch JJF. Circadian variation of white blood cell aggregation and free radical indices in men with ischaemic heart disease. *Eur Heart J* 1992; 13: 1632-1636.
35. Bush PG., Mayhew TM., Abromovich DR, et al.: A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. *Placenta*. 2000;21(3), 247-56.
36. Bab Z and Yan L.: ESR spin trapping studies on free radicals in gasphase of cigarette smoking. *Chin. Med. J.* 1991; 104, 591-594.
37. Brunnemann RD., Genoble L., and Hoffman D.: N-nitrosamines in chewing tobacco. An International comparison *J Agric Food Chem.* 1985;33, 1178-1185.
38. Koren G: Fetal Toxicology of environmental tobacco smoke. *Curr Opin Pediatr.* 1995; 7, 128-131.
39. Lambers DS, Clark KE: The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin Perinatol.* 1996; 20(2), 115-126.

40. English JP, Willius FA, Berkson J. Tobacco and coronary disease. JAMA 1940; 115:1327-1329.
41. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress: a report of the Surgeon General: executive summary. Rockville, Md: Department of Health and Human Services. CDC 1989; 89:8411.
42. Muscat JE, Harris RE, Haley NJ, Wynder EL. Cigarette smoking and plasma cholesterol. Am J Clin Nutr 1991; 54:141-147.
43. Cavendish JB, Rogers WJ, Fisher LD et al. Effects of smoking on survival and morbidity in patients randomized to medical or surgical therapy in the CASS: 10 year follow-up: Cass Investigators. JAMA 1992; 267:287-294.
44. Principles of Surgery 6th ed. USA 1996; 1:927.
45. Rutherford Vascular Surgery 5 ed. Denver, Colorado: Saunders company 2000; 10.
46. Snajdar RM, Busuttill SJ, Averbook A, Graham DJ et al. Department of surgery, June 2000 Case Western Reserve University Medical School, Cleveland, USA
47. Boyle P. Cancer, Cigarette smoking and premature death in Europe: A review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, Lung Cancer, October 1997; 17:1-60.
48. Hoffmann D, Djordjevic MV, Rivenson A, Zang E, Desai D, Amin S. A study of tobacco carcinogenesis. Relative potencies of tobacco-specific N-nitrosamines as inducers of lung tumour in A/J mice Cancer Lett 1993; 71:25-30.
49. Schottenfeld D. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J Natl Cancer Inst; 1999; 91(14): 1194-1210.

50. Skrett S: Host Defences Against Respiratory Infection. *Med Clin North Am* 1994; 78(5): 941-946.
51. Todisco T, Baglioni S, Amir E, Palumbo R. Effect of Bamipylline on Tracheobronchial Mucus Clearance in Subjects With Smokers Simple Chronic Bronchitis. *Respiratory* 1995; 62:16-20.
52. Bennett WD, Chapman WF. Ineffectiveness Of Cough For Enhancing Mucus Clearance in Asymptomatic Smokers. *Chest*, 1992;102:412-416.
53. Sherman CB. The Health Consequences of Cigarette Smoking. *Med Clin North Am* 1992;76(2): 355-375.
54. Srivasta ED, Barton JR, O'mahony S, et al. Smoking, Humoral Immunity, and Ulcerative colitis. *Gut* 1991; 32: 1016-1019.
55. Murray L., Nusbaum MD., Myron Gordon MD, Devra Nusbaum et al. Smoke alarm: A review of the clinical impact of smoking on women. *Prim Care Update Ob/Gyns* 2000;7:207-214.
56. Bodis J, Hanf V, Torok A, Tinneberg H-R: Smoking and corpus luteum function. *Fertil Steril* 1996; 4:810-814.
57. Evers J, Slaats P, Land J, Durmoilin J, Dunselman G: Elevated levels of follicle stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:1010-1014.
58. Berta L, Fortunati N, Gennari P, Appendino M, Casella A, Frairia R: Influence of cigarette smoking on pituitary and sex hormone balance in healthy premenopausal women. *Fertil Steril* 1991;56:788-789.

59. Weigert M, Hofstetter G, Kaupl D, Gottlich H, Krischker U et al.: The effect of smoking on oocyte quality and hormonal parameters of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Clinical Assisted Reproduction* 1999;16(6):287-293.
60. Neal M.S., Hughes E.G., Holloway A.C., Foster W.G: Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes 2005;20 (9): 2531-2535.
61. Neal M.S, Younglai E.V, Holloway A:C, Foster W.G. : Aromatase activity in granulosa cells as a predictor of pregnancy potential. *Int Congr Series* 2004;1271, 139-142.
62. Shah NR, Bracken MB. A systematic review and meta-analysis of prospective studies on the association between maternal cigarette smoking and preterm delivery. *Am J obstet Gynecol* 2000; 182:465-472.
63. Haug K, Irgens LM, Skjaerven R, Markestad T, Baste V, Schreuder P. Maternal smoking and birthweight: effect modification of period, maternal age and paternal smoking. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79:485-489.
64. Ananth CV, Smulian JC, Vintzileos AM. Incidence of placental abruption in relation to cigarette smoking and hypertensive disorders during pregnancy. A meta analysis of observational studies. *Obstet Gynecol* 1999; 93:622-628.
65. Conde-Agudelo A, Fernando A, Belizan JB, Kafury-Goeta AC. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systemic review *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1026-1035.
66. Zhang J, Klebanoff MA, Levine RJ, Puri M, Moyer P. The puzzling association between smoking and hypertension during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1407-1413.

- 67.Chuna KC, Kowalski CP, Kim KİM, Buchman SR. maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/plate. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:485-491.
- 68.Gruslin A, Perkins SL, Manchanda R, Fleming N, Clinh JJ. Maternal smoking and fetal erythropoietin levels. *Obstet Gynecol* 2000; 95:561-564.
- 69.Sarajya M, Berg CJ, Kendrick JS, Straus LI, Atrash HK. Cigarette smoking as a risk factor ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:493-498.
- 70.El-Nemr A., Al-Shawaf T., Sabatini L., Wilson C., Lower A.M. and Grudzinskas J.G: Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. 1998; 13(8): 2192-2198.
- 71.Racowsky C, Hendrics RC, Baldwin KV. Direct effects of nicotine on the meiotic maturation of hamster oocytes. *Reprod Toxicol* 1989; 3:13-21.
- 72.Trapp M, Kemeter P, Feictinger W: Smoking and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1986; 6:357-358.
- 73.Zenses MT., Krisnan S, Krishnan B, Zhang H, Casper RF: Cadmium accumulation in follicular fluid of women in-vitro fertilization-embryo transfer is higher in smokers. *Fertil Steril* 1995;64:599-603.
- 74.Zenses MT, Reed TE, Wang P, Klein J: Cotinine a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluid of women in in-vitro fertilization therapy. *Fertil Steril* 1996;66:614-619.
- 75.Barbieri RL, McShane M, Ryan KJ, Constituens of cigarette smoke inhibit human granulose cells aromatase. *Fertil Steril* 2000;74:725-733.

76. Borman SM, Christian PJ, Sipes IG and Hoyer PB: Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;167:191-198.

77. Zenses MT: Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2000;6:122-131.

78. The Practice Committee of the American Society for Reproductive medicine: American Society for Reproductive medicine, Birmingham, Alabama. *Fertil Steril* 2004;82:62-67.

79. Pattison HA, Taylor PJ, Pattison MH. The effect of cigarette smoking on ovarian function and early pregnancy outcome of in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 1991; 5: 780-783.

80. Van Voorhis BJ, Dowson JD, Dale MS. The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles. *Obstet Gynecol* 1996;88:785-791.

81. Cooper GS, Baird DD, Hulka BS, Weinberg CR, Savitz DA, Hughes CL. Follicle-stimulating hormone concentrations in relation to active and passive smoking. *Obstet Gynecol.* 1995; 85:407-411.

82. Knoll M, Talbot P. Cigarette smoke inhibits oocyte cumulus complex pickup by the oviduct in vitro independent of ciliary beat frequency. *Reprod Toxicol* 1998; 12:57-58.

83. Zenses MT, Reed TE. Cigarette smoking inhibits apoptosis human preembryos. *Hum Reprod* 1996, Abstract book 1,153.

- 84.Zenses MJ, Wong P, casper RF. Cigarette smoking may effect meiotic maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 1995; 10:3213-3277.
- 85.Feichtinger W, Papalambrou K, Poehl M, Krischker U, Neumann K. Smoking and in vitro fertilization: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:496-499.
- 86.Klonff-Cohen H, Natarjan L, Maris R, Yoe B. Effects of female and male smoking on succes rates of IVF and gamete intra-fallopian transfer *Hum Reprod* 2001; 16:1382-1390.
- 87.Kapawa A, Giannakis D, Tsoukanelis K, Kanakas N, Baltogiannis D, Agapitos E, et al. Effect of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia* 2004; 36: 57-68.
- 88.Vine MF: Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996;19:323-337.
- 89.Osser S.: Semen quality of smoking and non smoking men in infertile couples in a Swedish population. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1992;71:215-218
- 90.Chia SE, Ong CN. Effects of cigarette smoking on human semen quality. *Arch Androl* 1994;33:163-168.
- 91.Yamamoto Y, Isoyama E, Sofikitis N, Migayawa I: Effect of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urol Res* 1998; 26:45-48.
- 92.Lessells K. More mutations in males. *Nature* 1997; 390-236.
- 93.Rubes J. Lowe X, Moore ID. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage man. *Fertil Steril* 1998;70: 715-723.

94. Robbins WA, Vine MF, Troug KY, Everson RB. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen* 1989;30:175-183.
95. Belcheva A, Ivanova K, Tzvetkova P, Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma integrity and DNA fragmentation. *Int J Journal Andrology* 2004;27:296-300.
96. Sun JG, Juriscova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56:602-607.
97. Peluso JJ, Luciano AA, Nulsen JC. The relationship between alterations in spermatozoal deoxyribonucleic acid heparin binding sites, and semen quality. *Fertil Steril* 1992; 57: 665-670.
98. Collin O, Kilter S, Berg A. Tobacco smoke disrupts testicular microcirculation in the rat. *Int J Androl* 1995; 18:141-145.
99. Zineman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl* 2000;21:145-153.
100. Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1994;61:35-43.
101. Sofitikis N, Miyagawa I, Dimitriadis D. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995; 154: 1030-1034.
102. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Human Reproduction* 2002;17:1554-1559.

- 103.Comhaire F.N, Mamoud A.M, Depuydt C.F, Zalata A.A,Christophe A.B. Mechanism and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999; 5:393-398.
- 104.Pryor WA.: Oxyradicals and related species. *Ann. Rev. Physiol.* 1986;48, 657-667.
- 105.Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 15,222(1),1-15.
- 106.Halliwell B., Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 1985; 8(2): 89-193.
- 107.Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993; 23, 481.
- 108.Sies H: Oxidative stres: From basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91,131.
- 109.Cheseman KH: Lipid peroxidation in biological systems: Halliwell B, Aruoma OI (ed): *DNA and Free Radicals*, Ellis Horwood, London 1993;76.
- 110.Antwerpen VL., Theron AJ: Cigarette smoke-mediated oxidant stres, phagocytes, vit C, vit E and tissue injury. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 1992; 15, 53-65.
111. Park EM, Park YM, Gwak YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* 1998;25,79-86.
- 112.Kalra J., Chaudhory AK. And Prasad K.: Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int. J. Exp. Path.*, 1991;72,1-7.

113. Bridges R.B., Fu M.C. and Rahm S.R.: Increased myeloperoxidase activity associated with cigarette smoking. *Eur. J. Respir Dis.* 1985;67,84-93.
114. Frei B., Trudy FM.: Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma . *Biochem. J.* 1991;277, 133-138.
115. Bizler M. And Lauterburg H.: Glutathione metabolism in activated human neutrophils: Stimulation of consumption of glutathione by reactive oxygen species. *Eur. J. Clin. Invest.* 1991;21,316-322.
116. Hemilia H., Roberts P. And Wikstrom M.: *FEEBS lett.* 1984;178(1),25-30.
117. Duthie G.G., Arthur J.R., Philip W. and James T.: Effect of smoking and vit E on blood antioxidant status. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991;53,1615-1635.
118. Jendryezko A., Szpyrka G., Grunsczynski J., Korowicz M.: Cigarette smoke exposure of school children: Effect of passive smoking and vitamin E supplementation on blood antioxidant status. *Neoplasma.* 1993;40,199-203.
119. Reznick A.Z., Cross C.E., Hu M.L., Yuichiro J.S., Khwaja S., Sofadi A.: Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem.J.* 1992;286,607-611.
120. Cruch DF., Prior W.A, Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicologic implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64,111-126.
121. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG: Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002;78(6):1215–1224.

122. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA: Role of oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003;79:829–843.
123. 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 Wom Med* 2000;45(5):314–320.
124. Jozwik Ma, Wolczynski S, Jozwik Mi, Szamatowicz M: Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Rep* 1999;5(5):409–413.
125. Oyawoye O, Abdel GA, Garner A, Constantinovici N, Perret C, Hardiman P: Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: Relationship to outcome. *Hum Reprod.* 2003;18(11):2270–2274.
126. Klebanoff SS: Inactivation of estrogen by rat uterine preparations. *Endocrinology* 1985; 76, 301.
127. Ishikawa Y., Hirai K., Ogawa K: Cytochemical localization of hydrogen peroxide in the rat uterus. *J Histochem Cytochem* 1984; 32,674.
128. Cherouny P., Ghodgoankar J., et al: Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and contractions of the pregnant rat uterus. *Am J. Obstet Gynecol.* 1988;159,1390.
129. Miyazaki T, Sueoka A.M., Dharmarajan A.M., et al: Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in vitro perfused rabbit ovary. *J. Reorod Fertil.* 1991; 91:207.
130. Goto Y., Noda K., Narimoto K., et al: Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Rad Biol Med.* 1992;13,47.

131. Yagi, K.: Female hormones act as natural antioxidants a survey of our research. *Acta Biochem. Pol.* 1997;44: 701.
132. Paszkowski, T., Traub, A.I., McMaster, D., et al., 1995. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta.* 1995; 236: 173.
133. Paszkowski, T., McMaster, D., Traub, A.I., et al.: Total iron levels in the preovulatory follicular fluid of in vitro fertilization patients. *Med. Sci. Res.* 1996;24: 187.
134. Carlson J.C., Wu X.M., Sawada M: Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function. *Free Rad Biol Med.* 1993; 14,79.
135. Aten, R.F., Duarte, K.M., Behrman, H.R., 1992. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F_{2a}. *Biol. Reprod.* 1992;46: 401.
136. De Lamirande E., Gagnon C.: Reactive oxygen species (ROS) and reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 336, 185.
137. Aitken R.J., Clarkson J.S.: Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 1988; 9,367.
138. Aitken, R.J., Paterson, M., Fisher, H., et al., : Redox regulation of tyrosin phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell Sci.* 1995; 108: 2017.
139. Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., 1996: Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum. Reprod.* 1996;11: 1655.

140.Lewis, S.E., Sterling, E.S., Young, I.S., Thompson, W.: Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 1997; 67: 142.

141.Aitken, R.J., Irvine, D.S., Wu, F.C.: 1991. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obs. Gynaecol.* 1991;164,542.

142.Aitken, R.J., West, K.M., Buckingham, D.W.: Relationship between biochemical markers for residual sperm cytoplasm reactive oxygen species generation and the presence of leucocyte and precursor germ cells in human sperm suspension. *Mol. Reprod. Devel.* 1994; 39: 268.

143.Aitken, R.J., West, K.M., Buckingham, D.W.: Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligospermic patients and fertile donors. *J. Reprod. Fertil.* 1992;94, 451.

144.Kessopoulou, E., Tomlinson, M.J., Barratt, C.L.R., et al.: Origin of reactive oxygen species in human semen-spermatozoa and leukocytes. *Reprod. Fertil.*1992; 94, 463.

145.Nonogaki T., Noda Y., Narimoto K, Et al: Localization of Cu-Zn superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum Reprod.* 1992; 7,81.

146.Alvarez, J.G., Storey, B.T: Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from the loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gam. Res.* 1989;23: 77.

147.Storey, B.T: Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Re-prod.* 1997;3: 203.

148.Zini A., de lamirande E., Gagnon C: Reactive oxygen species in semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase and catalase like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J. Androl.* 1993; 16, 183.

149.Sanocka, D., Miesel, R., Jedrezjczak, P.: Oxidative stress and male infertility. *J. Androl.* 1996;17: 449.

150.Therond, P., Auger, J., Legrand, A., Jovannet, P.: Alpha tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationship with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Hum. Reprod. update.*1996; 2: 739.

151.Ford, W.C.L., Whittington, K., Williams, A.C.: Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int. J. Androl.* 1997;20 (suppl 3), 44.

152.Chen, H., Cheung, M.P.L., Chow, P.H., O, W.S.: Oxidative stress on the genomic integrity of epididymal and uterine sperm produced by male with all major accessory sex glands removed in the golden hamster. *Reproduction.* 2001; 27: 87.

153.Hurley, W.L., Deane, R.M.: Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J. Dairy Sci.* 1987; 72: 785.

154.Chew, B.P.: Effects of supplemental beta carotene and vitamin A on reproduction in swine. *J. Anim. Sci.*1993; 71: 247.

155.Luck, M.R., Jeyaseelam, I., Scholes, R.A.: Ascorbic acid and fertility. *Biol. Reprod.* 1995;52: 262.

156. Tarin, J.J., Vendrell, F.J., Ten, J., Cano, A.: Antioxidant therapy counteracts the disturbing effects of diamide and maternal ageing on chromosomal distribution and segregation in Mouse oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 1998;4: 281.

- 157.Ford, W.C.L.: Reactive oxygen species and sperm. Hum. Fert. 2001;4, 77.
- 158.Whittington, K., Ford, W.C.L.: The effect of incubation periods under 95% oxygen on the stimulated acrosome reaction and the motility of human sperm. Molec. Hum. Reprod. 1998;4: 1053.
- 159.Bjorneboe A., Bjorneboe G., Drevon C. : Absorbtion, transport and distrubition of vitamn E. J. Nutr. 1990: 120; 233-242.
- 160.Brom J. Vitamins, Mineral and Nutrition. Crowe L. Medical biochemistry. Mosby, London. 1999; 114.
- 161.Mayes PA. Structure and function of the lipid-soluble vitamins. Harper's biochemistry. Barnes DA. McGraw-Hill, New york,2000;647-649.
- 162.Leiber DC: The role of metabolizm in the antioxidant function of vitamin E. Crit Rev Toxicol 1993;23:147-169.
- 163.Marina G, Angel C,: The effect of alfa-tocopherol on the lipid peroxidation of mitochondria and microsomes obtained from rat liver and testis. Moleculer and Cellular Biochemistry 2001; 225: 121-128.
- 164.Akkuş İ. Serbsest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza, 1995.
- 165.Turk CY, Halıcı M, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S: Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. The Journal of International Medical Research. 2004; 32: 507-512.
- 166.Burton G.W., Joyce A., Ingold K.U.: First proof that vitamin E is major lipid soluble, chain-breaking antioxidantin human blood plasma: Lanset. 1982: August 7, 327.

167. Ingold K.U., Webb A.C., Witter D., Burton G.W.: Vitamin E remains the major lipid soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency: *Arch. Biochem. Biophys.* 1987; 59, 224-225.
168. Wartson R.R., Leonard T.K.: Selenium and vitamin A,E and C: Nutrients with cancer prevention properties. *J. Am. Diet Assoc.* 1986; 86,505-510.
169. Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, Tuncel T, Tuncel P, Özbek R, Turan K,: Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *J Int Med Res* 1996; 24: 419-424.
170. Shklar G., Shwartz J., Trikler D., Reid S.: Prevention of experimental cancer and immunostimulation by vitamin E. *J. Oral. Pathol. Med.* 1990; 19, 60-64.
171. Traber MG, Packer L. Vitamin E. Beyond antioxidant function . *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1501-1509.
172. Jialal I, Fuller CJ. Effect of vitamin E, vitamin C and beta carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. *Can J Cardiol.* 1995;11 Suppl:97-103.
173. Massey K.D., Burton K.P.: Alpha-tocopherol attenuates myocardial membrane related alterations resulting from ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* 1989;256, 1192-1199.
174. Riemersma R.A., Wood D.A., Macintyre C.C.A., Elton R.A., Gey K.F., Oliver M.F.: Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamin A,C,E and carotene . *Lancet.* 1991; 337,1-5.
175. Leske MC, Chylack LT , He Q, Wu SY, Schoenfeld E, Friend J, Wolfe J.: Antioxidant vitamins and nuclear opacities: The longitudinal study of cataract. *Ophthalmology* 1998; 105:831-836

176.Clausen J., Nielson S.A., Kristensen M.: Biochemical and clinical effects an antioxidative supplementation of geriatric patients. *Biol. Trace Element Res.* 1985;20,135-151.

177.Ross W.M., Creighton M.O., Trevithick J.R.: Radiation cataractogenesis induced by neutron or gamma irradiation in the rat lens is reduced by vitamin E. *Scanning Microscopy.* 1990; 4, 641-650.

178.Brewster MA. Vitamins. Kaplan LA. Pesce AM. *Clinical Chemistry.* Mosby, Baltimore. 1996: 764-769,

179.Marcin L.J.: Vitamin E, In: *Handbook of vitamins.* Marcel Dekker. Inc New york and Basel 1984;99-145.

180.Carpenter D.: Vitamin E deficiency *Sem. Neurl.* 1985; 5, 283-287.

181.Spiekerman AM. Vitamins and Nutritional assessment. Mc Graww L. *Clinical chemistry.* Lippincott Williams and Wilkins., Philadelphia,2000; 543-544.

182.Stephens NG., Parsons A., Schofield PM. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996 Mar 23;347:781-786.

183.Donald B., McCormick PD., Grene HL. Vitamins Burtis CA., Ashwood ER. *Clinical chemistry.* WB Saunders Company, Philadelphia, 1999;1005-1007.

184.Takahashi O, Ichikawa H, Sasaki M.: Hemorrhagic toxicity of d-alpha tocopherol in the rat. *Toxicology.* 1990; 63(2): 157-165.

185.Horwitt M.K.: The promotion of vitamin E. *J. Nutr.* 1986;116, 1371-1377.

186. Murphy P.G., Davies M.J., Columb M.O.: Effect of propofol and thiopentone on free radical mediated oxidative stress of the erythrocyte. *Br. J. Anaesth.* 1996; Apr: 76(4),536-543.
187. Mukumoto S, Mori K, Ishikawa H.: Efficient induction superovulation in adult rats by PMSG and HCG. *Exp Anim.* 1995; Apr 44(2): 111-118.
188. Hiroe KON, Atsushi TOHEI, Ryoji Hokao, and Motoo SHINODA. Estrous cycle stage-independent treatment of PMSG and hCG can induce superovulation in adult Wistar-Imamichi rats. *Exp. Anim.* 2005;54(2):185-187.
189. Hamilton GS, Armstrong DT. The superovulation of synchronous adult rats using follicle-stimulating hormone delivered by continuous infusion. *Biol Reprod.* 1991; May 44 (5): 851-856.
190. Hirabayashi M, Ito K, Sekimoto A, Hochi S, Ueda M. Production of transgenic rats using young Sprague-Dawley females treated with PMSG and hCG. *Exp Anim* 2001; 50 (5): 365-369.
191. Harrison, K.L., Breen, T.M. and Hennessey, J.F: The effect of patient smoking habit on the outcome of IVF and GIFT treatment. *Aust. NZ Obstet. Gynaecol.* 1990; 30: 340–343.
192. Hughes, E.G., Yeo, J., Claman, P. et al.: Cigarette smoking and the outcomes of in-vitro fertilisation: measurement of effect, size and level of action. *Fertil. Steril.* 1994; 62, 807–814.
193. Sterzik, K., Strehler, E., Desanto, M. et al.: Influence of smoking on fertility in women attending an in-vitro fertilisation program. *Fertil. Steril.* 1996; 66: 810–814.
194. Rosevear, S., Holt, D.W., Lee, T.D. et al.: Smoking and decreased fertilisation in-vitro. *Lancet.* 1992; 340: 1195–1196.

- 195.Zenzes, M.T., Reed, T.E. and Casper, R.F.: Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum. Reprod.*, 1997; 12: 1736–1741.
- 196.Hughes EG, YoungLai EV, Ward SM: Cigarette smoking and outcomes of in-vitro fertilization and embryo transfer: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 1992 Mar; (3): 358-361.
- 197.Maximovich, A. and Beyler, S.A.: Cigarette smoking at time of in-vitro fertilisation cycles initiation has negative effect on IVF, embryo transfer success rates. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1995; 12: 75–77.
- 198.Weigert M, Hofstetter G, Kipl D, Heimo G, Krischer U, Bichler K, Poehl M and Feichtinger W: The effect of Smoking on Oocyte Quality and Hormonal Parameters of Patients Undergoing In Vitro Fertilization-Embryo Transfer. *Clinical Assisted Reproduction.* 1999;16(6):287-293.
- 199.Van Voorhis BJ., Dunn MS., Syrop C.H. et al :Effects of smoking on ovulation induction for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril.* 1992;58: 981-985.
- 200.Geva E, Bartoov B, Zabludovsky N, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program.Fertil steril. 1996 Sep;66(3):430-4.
- 201.L. Keskes -Ammar, N. Feki –Chakroun sperm oxidative stres and effect of oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *archieves of andrology.*2003; 49:83-94.
- 202.Park EM, Park YM, Gwak YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* 1998;25,79-86.

203. Igarashi M.: Augmentative effect of ascorbic acid upon induction of human ovulation in Clomiphene-ineffective anovulatory women. *Int J Fertil.* 1977; 22: 168-173.
204. Parinaud, J., Le Lannou, D., Viertez, G. et al.: Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 2434–2436.
205. Johnson, M.H. and Nasr-Esfahani, M.H.: Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *BioEssays*, 1994; 16: 31–38.
206. Sawai, K., Funahashi, H. and Niwa, K. (1997) Stage-specific requirement of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biol. Reprod.* 1997; 57: 1–6.
207. De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F. et al.: Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 45: 451–457.
208. Tarin, J.J. and Trounson, A.O.: Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 1993; 49: 1362–1368.
209. Irvine, D.S.: Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.*, 1996; 1: 6–12.
210. Meyers, D.G., Maloley, P.A. and Weeks, D.: Safety of antioxidant vitamins. *Arch. Intern. Med.* 1996; 156: 925–935.
211. Hathcock, J.N.: Vitamins and minerals: efficacy and safety. *Am. J. Nutr.* 1997; 66: 427–437.

212.Dikshit RK, Buch JG, Mansuri SM.: Effect of tobacco consumption on semen quality of a population of hypofertile males. *Fertil Steril.* 1987 Aug; 48(2): 334-336.

213.Lewin A. Gonen O, Orvieto R, Schenker JG.: Effect of smoking on concentration, motility and zona-free hamster test on human sperm. *Arch. Androl.* 1991 Jul-Aug; 27(1) : 51-54.