

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK OLARAK SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN SIÇANLARDA  
MELATONİNİN OVER REZERVİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. Emre KÖLE**

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**KOCAELİ**

**2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK OLARAK SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN SIÇANLARDA  
MELATONİNİN OVER REZERVİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. Emre KÖLE**

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Ahmet Yiğit ÇAKIROĞLU**

**Etik onay no: 2015/37 KOÜ HADYEK9/2-2015**

**KOCAELİ**

**2017**



## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	1
TEŞEKKÜR .....	2
BEYAN .....	3
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	4
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	6
TABLolar .....	8
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	10
2. GENEL BİLGİLER .....	14
2.1 OVER.....	14
2.1.1. Over Anatomisi .....	14
2.1.2 Over Histolojisi.....	16
2.1.3 Over Embriyolojisi .....	17
2.1.4 Over Fizyolojisi .....	21
2.2 İnfertilite.....	23
2.2.1 İnfertilite ilk değerlendirilmesi.....	24
2.2.2 İnfertilite nedenleri.....	26
2.2.3 Over rezervi ve azalmış over rezervi.....	36
2.2.4 İn vitro fertilizasyon.....	41
2.3 Sigara.....	45
2.3.1. Sigara Dumanı, Katran Fazı ve Gaz Fazı .....	46
2.3.2 SİGARANIN İNFERTİLİTE ÜZERİNE ETKİLERİ .....	47
2.4 Melatonin.....	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	51
4. BULGULAR.....	63
5. TARTIŞMA .....	115
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	120
7. ÖZET .....	121
8. ABSTRACT .....	122
9. KAYNAKLAR .....	123

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca cerrahi bilgilerini ve akademik birikimlerini benimle paylaşan değerli Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. İzzet YÜCESOY' a, Perinatoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Gülseren YÜCESOY' a

Mesleki tecrübeleri ve bilgilerini paylaşmanın yanında yakın ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim, hakkını ödeyemeyeceğim, çok değerli hocam Prof. Dr. Aydın ÇORAKÇI 'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez hazırlığım boyunca her zaman ve her konuda desteğini gördüğüm değerli danışman hocam ve abim Doç. Dr. Yiğit ÇAKIROĞLU' na,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığımız ve bana her daim yanımda olan ve yardımlarının esirgemeyen, tez yazımında yardımlarını unutmayacağım Anabilim Dalımız değerli hocaları; Prof. Dr. Sebiha ÖZDEMİR ÖZKAN, Prof. Dr. Birol VURAL ve abim Doç. Dr. Emek DOĞER' e,

Asistanlık sürecini birlikte geçirdiğimiz beraber masai harcadığımız ve çok şey paylaştığımız asistan arkadaşlarıma ve mesai arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın histolojik bulgularının değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serdar FİLİZ' e, biyokimyasal parametrelerinin incelenmesinde gösterdiği destekten dolayı Yrd. Doç. Dr. FATMA CEYLA ERALDEMİR'e, farmakolojik ve hayvan deneyleri aşamalarında gösterdiği yardımlarından dolayı Doc. Dr. Fürüzan YILDIZ AKAR, tezimde katkısı bulunan tüm asistan arkadaşlarıma,

Tıp yaşantımın başından itibaren hep yanımda olan, hekimlik mesleğine saygı duymamı sağlayan ve hayattaki her adımda fikirleri ve öğütleriyle bana yol göstermiş olan değerli hocam Prof. Dr. Zafer UTKAN ve değerli hocam Prof. Dr. Tijen UTKAN' a

Beni büyütüp bugüne gelmemi sağlayan, bana ahlaki ve akademik değerler katan sevgili annem Nurdan TOYGAR KÖLE ve sevgili babam Hakkı KÖLE' ye, her zaman bana destek olan kardeşim Melike KÖLE' ye,

Bana attığım her adımda destek olan, hayatıma sevgi, huzur ve renk katan sevgili eşim Dr. Merve ÇAKIR KÖLE' ye, şükranlarımı sunmayı bir borç biliyorum.

Dr. Emre KÖLE

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Emre KÖLE

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

ABD:	Amerika Birlesik Devletleri
AMH:	Antimüllerian hormon
APUD:	Amine Precursor Uptake Deamin
cm:	santimetre
CO:	Karbon monoksit
DMBA:	Dimetilbenzaantracene
DNA:	Deoksiribo Nükleik asit
E2 :	Estradiol
FSH:	Folikül stimulan hormon
GnRH:	Gonadotropin releasing hormona
GSH:	Glutathione
Gpx:	Glutasyon peroksidaz
H2O2:	Hidrojen peroksit
HCG:	İnsan koryonik gonadotropin
HSG:	Histerosalpingografi
HSP:	Isı şok proteini
ICSI:	İntra sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGH:	İlkel germ hücrelerinin
IVF :	İn vitro fertilizasyon
IUI:	İntrauterin inseminasyondur
kg:	Kilogram
LH:	Luteinizan hormon
Max:	Maksimum
MDA:	Malondialdehid
mg:	Miligram
min:	Minimum
mm:	milimetre
n. Splanchnicus minör:	Küçük splenik sinir

NAT:	Triptofan N-asetiltransferaz
NO:	Azot monooksit
NOS:	Reaktif nitrojen türevlerini
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Süperoksit anyonu
OH:	Hidroksil radikali
OHSS:	Ovaryen hiperstimulasyon sendromunu
pH:	Power of Hydrogen
PID:	Pelvik inflamatuvar hastalık
ROS:	Reaktif oksijen türevleri
SOD:	Superoksid Dismutaz
USG:	Ultrasonografi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

**Şekil 1:** Uterus, Uterin Tüpler, Overler ve ligamanları

**Şekil 2:** Overin histolojisi

**Şekil 3:** Folükül gelişimi

**Şekil 4:** Folikulogenezis

**Şekil 5:** Türkiye istatistik kurumu

**Şekil 6:** Bazal vücut ısı eğrisi, bifazik patern

**Şekil 7:** İnfertilite nedenleri

**Şekil 8:** Tubal nedenli infertilite değerlendirilmesinde histerosalpingografi

**Şekil 9:** Sigara dumanı maruziyet sistemi

**Şekil 10:** İmmunfloresan boyanma ile bakılan gruplar arası tünel görüntüleri

**Şekil 11:** Kontrol grubu (grup I) Hematoksilen-Eozin boyaması

**Şekil 12:** Sadece sigara dumanına maruz kalan grup (grup II) Hematoksilen-Eozin boyaması

**Şekil 13:** Oda havasında 10 mg melatonin uygulanan grup (grup III) Hematoksilen-Eozin boyaması

**Şekil 14:** Oda havasında 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) Hematoksilen-Eozin boyaması

**Şekil 15:** Sigara dumanına maruz kalan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup V) Hematoksilen-Eozin boyaması

**Şekil 16:** Sigara dumanına maruz kalan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup VI) Hematoksilen-Eozin boyaması

**Şekil 17:** Oda havasında 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması

**Şekil 18:** Kontrol grubu (grup I) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması

**Şekil 19:** Sigara dumanına maruz kalan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup VI) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması

**Şekil 20:** Oda havasında 10 mg melatonin uygulanan grup (grup III) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması

**Şekil 21:** Sigara dumanına maruz kalan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup V) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması

**Şekil 22:** Sadece sigara dumanına maruz kalan grup (grup II) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması

**Şekil 23:** Oda havasında 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) TUNEL boyaması

**Şekil 24:** Kontrol grubu (grup I) TUNEL boyaması

**Şekil 25:** Sigara dumanına maruz kalan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup VI) TUNEL boyaması

**Şekil 26:** Oda havasında 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup III) TUNEL boyaması

**Şekil 27:** Sigara dumanına maruz kalan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup V) TUNEL boyaması

**Şekil 28:** Sadece sigara dumanına maruz kalan grup (grup II) TUNEL boyaması

## **TABLO DİZİNİ**

### **TABLO**

**Tablo 1:** Over rezervini etkileyen başlıca faktörler

**Tablo 2:** IVF endikasyonları

**Tablo 3:** Yardımcı üreme tekniklerinin nedenleri

**Tablo 4:** Tanıya göre canlı doğum oranları

**Tablo 5:** Sigaradaki zararlı maddeler

**Tablo 6:** Sigaradaki karsinojenik ve toksik ajanlar

**Tablo 7:** Histolojik Doku Takip Serileri

**Tablo 8.** Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi Basamaklarına Ait Uygulama Prosedürü

**Tablo 9:** Genel İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

**Tablo 10:** İmmünohistokimyasal Boyanma Yoğunluğunun Derecelendirilmesi

**Tablo 11:** TUNEL Yöntemi Uygulama Prosedürü (Floresan)

**Tablo 12:** Gruplar arasında doku SOD düzeyleri mean ve median değerleri arasındaki karşılaştırma

**Tablo 13:** Gruplardaki doku SOD düzeyleri ( mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 14:** Gruplar arasında doku Gpx düzeyleri mean ve median değerleri arasındaki karşılaştırma

**Tablo 15:** Gruplardaki doku Gpx düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 16:** Gruplar arasında doku katalaz aktiviteleri mean ve median değerleri arasındaki karşılaştırma

**Tablo 17:** Gruplardaki doku katalaz düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 18:** Gruplar arasında serum SOD düzeyleri mean ve median değerleri arasındaki karşılaştırma

**Tablo 19:** Gruplardaki serum SOD düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 20:** Gruplar arasında serum Gpx düzeyleri mean ve median değerleri arasındaki karşılaştırma

**Tablo 21:** Gruplardaki serum Gpx düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 22:** Gruplar arasında serum katalaz düzeyleri mean ve median değerleri arasındaki karşılaştırma

**Tablo 23:** Gruplardaki serum katalaz düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 24:** Gruplardaki doku MDA düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 25:** Gruplardaki serum MDA düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 26:** Gruplar arasında serum MDA düzeyleri mean ve median değerleri arasındaki karşılaştırma

**Tablo 27:** Gruplara göre folikül sayıları ve foliküler yapı değerlendirilmesi (oda havası, oda havasında 10mg/kg melatonin uygulana ve oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan gruplar)

**Tablo 28:** Gruplara göre folikül sayıları ve foliküler yapı değerlendirilmesi (sigara, sigaraya maruz kalan sıçanlarda 10mg/kg melatonin uygulana ve sigaraya maruz kalan sıçanlarda 20mg/kg melatonin uygulanan gruplar)

**Tablo 29:** Gruplardaki Primordial folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 30:** Gruplardaki Primer folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 31:** Gruplardaki Sekonder folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 32:** Gruplardaki matür folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

**Tablo 33:** Gruplara göre apoptotik indeks(oda havasında maruz kalan gruplar)

**Tablo 34:** Gruplara göre apoptotik indeks(sigara dumanına maruz kalan gruplar)

**Tablo 35:** Gruplara göre H-score dağılımı

## GİRİŞ ve AMAÇ

Sigara bilindiği üzere birçok etken maddeden oluşmaktadır. Sigaranın dumanı içerisinde yaklaşık olarak 4700 ün üzerinde bileşen mevcuttur. Bu bileşenlerin çoğu aktif farmakolojik olup çoğu toksik, mutajenik ve karsinojeniktir. Sigaranın kadınlarda uterus, overler ve tubalar üzerine olumsuz etkilerine dair birçok kanıt bulunmaktadır. Bunlar arasında oksidanlar, prooksidanlar ve serbest radikallerin yanında redükleyici ajanlar, formaldehid, asetaldehid, akrolein gibi aldehit ve ketonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, karboksilik asitler, steroidler, nitrozamin sayılabilir.<sup>1 2 3</sup>

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.<sup>4</sup> Sigara başlıca infertilite nedeni olabileceği uzun zamandır tartışılmaktadır. Fertilite; hipotalamus-hipofiz-over arasındaki aksı, gametleri ve endometriumu içine alan birçok sistemin normal çalışması sonucunda oluşmaktadır. Üreme sisteminin işleyişi kompleks olup, bu sistemin içindeki yapılar birçok faktörden ve etmenden kolayca etkilenabilmektedir. Sigaranın bu sistemi etkilediğine dair pek çok kanıt literatürde mevcuttur.<sup>5 6</sup> Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, morbidite ve mortalitenin önlenemez majör nedenleri arasında sayılmaktadır. Sigara içme prevalansının tüm dünyada, özellikle üreme çağındaki kadınlarda arttığı, ABD ve Avrupa'da bu yaş grubundaki kadınların 1/3'ünün sigara içicileri olduğu bildirilmektedir.<sup>7</sup>

Sigaranın infertilitesi üzerine etkileri başlıca oosit sayısını azalttığı, in vitro fertilizasyon sikluslarında fertilizasyon oranını azalttığı, gebelik oranlarını düşürdüğü, düşük oranlarını artırdığı gösterilmiştir.<sup>8</sup> Sigara kullanımı zararları arasında aynı zamanda erken menopoza ve over rezervinin azalmasına neden olmaktadır.<sup>9</sup> Son yıllarda, sigaranın üreme sağlığı üzerine olumsuz etkilerini ortaya koymaya yönelik oluşturulan hayvan modellerinden elde edilen veriler, sigaranın azalmış konsepsiyon oranları, yardımla üreme tekniklerinin kullanıldığı tedavi süreçlerinde daha düşük başarı oranları ve prematür over yetmezliği ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur.

Kız çocukları, overlerinde sabit sayıda over follikülü ile dünyaya gelirler ve primordial folliküllerde Mayoz I basamağında gelişimleri duraklatılan (arrest) bu belli sayıdaki over follikülleri, puberte çağında ovulasyon hedeflenerek primer, sekonder, antral folliküller

şeklinde bir araya toplanırlar (Recruitment).<sup>10 11</sup> Bu follüküler büyüme süreci, follüküler havuzun tükenmesine ve menopoza kadar devam eder. Over rezervinin tükenmesi, sigara gibi çeşitli çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin olumsuz etkilerine sekonder olarak hızlanma dönemlerine girebilir.<sup>12 13</sup>

Çok sayıda bilimsel çalışmada, sigaranın yardımla üreme teknikleri kullanılan tedavi sikluslarında, elde edilen oosit sayısının azalması, fertilizasyon oranlarının düşük olması, elde edilen embriyoların kalitesinin daha düşük olması, implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının azalması ile ilişkili olduğuna dair veriler sunulmuştur.<sup>14 15</sup> Sigara içen kadınlarda menopozun daha erken yaşlarda gerçekleştiği (1-4 yıl daha erken), bunun sigaranın azalmış over rezervine yol açtığına işaret ettiği, sigarayı bırakmanın ise over sağlığında ve fertilitite oranlarında iyileşmelerle ilişkili olduğunu destekleyen bilimsel veriler de bu bilgilerle uyumludur.<sup>16 17</sup>

Sigaranın over rezervini hangi etiyopatogenetik mekanizmalar üzerinden olumsuz etkilediğine dair hayvan modelleri gözden geçirildiğinde ise, follüküler sağkalımın ve sellüler viabilitenin proapoptotik belirteçler Bax, aktive Caspase 3, HSP 90ab1'de artış ve DNA fragmentasyonu ile ilişkili olarak azaldığı tespit edilmiştir.<sup>18</sup> Yenidoğan overlerinin sigaraya maruz kalması sonucunda apoptozisin indüklendiği, Caspase 2-3 düzeylerinin ve DNA fragmentasyonunun arttığı izlenmiştir.<sup>19</sup> Sigaranın içinde bulunan ve aryl hidrokarbon reseptörleri üzerinden etkiyen kimyasalların apoptotik yolları indüklediği, yine karbon monoksit ve nikotinin vazokonstrüktif etkilerinin intervillöz aralıklardaki koagülasyona ek olarak apoptozisi uyardığı gösterilmiştir.<sup>20</sup> Sonuç olarak, apoptozise sekonder gerçekleşen follüküler atrezinin yol açtığı primordial follükül havuzunun küçülmesi, prematür over yetmezliğinin ve infertilitenin muhtemel mekanizmalarından biri olarak görülmektedir.<sup>21</sup>

Follüküler gelişimin Mayoz I aşamasında uzun süre duraklaması sırasında, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) ortamda biriktiği, ROS'a bağlı mitokondrial DNA hasarının ve mitokondrial DNA mutasyonlarının, telomer kısalmasının ve disfonksiyonunun azalmış oosit sayısı ve kalitesi ile ilişkili olduğu, üreme fonksiyonlarında başarısızlık ve infertilite ile sonuçlandığı bildirilmiştir.<sup>22</sup> Ayrıca reaktif oksijen türevlerinin over follüküllerinde ve granuloza hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne yol açtığı, overin antioksidan savunma reaksiyonlarının azaldığı, etkisiz kaldığı ve oksidatif hasarın yaş ilerledikçe arttığı

gözlenmiştir.<sup>10</sup> Overlerin folliküler ortamındaki oksidan/antioksidanlar arasındaki imbalansın bozulmuş follikülogenezle ilişkili olduğu belirtilmiştir.<sup>23</sup> Oksidatif stresin telomer hasarına yol açarak kromozomal instabilite ve apoptozisle sonlandığına dair veriler sunulmuştur.<sup>24</sup>

Sigara, reaktif oksijen türevleri ve serbest radikalleri kapsayan pek çok kimyasal-reaktif molekülleri içerir (CO, hidrojen peroksit, nitrojen oksitleri gibi). Serbest radikallerin önemli bir kaynağı olup ROS-ilişkili endojen enzimleri aktive etme kapasitesine sahiptir. Sıçan over dokusunun, sigaranın içeriğindeki kimyasal maddelerden DMBA (dimetilbenzaantracene) ile kültüre edildiğinde oksidatif stresin indüklediği apoptoziste artış olduğu, glutasyon ile kültüre edildiğinde ise doğal koşullarda antioksidanlar tarafından engellenen hücre ölümünün gerçekleştiği izlenmiştir.<sup>7</sup> DMBA etkisi ile overlerde granuloza hücresi-oosit, granuloza-granuloza hücreleri interaksyonu için gereken gap junction proteinleri Connexin 37-43'de azalma meydana geldiği gösterilmiştir.<sup>23</sup> Aynı işlemin primordial ve primer folliküllerde kayba neden olduğu görülmüştür.<sup>24</sup>

Diğer fare ve sıçan çalışmalarında da nikotin maruziyetinin primordial folliküllerde değil ancak primer, sekonder ve antral folliküllerde azalmaya yol açtığı, bunun da büyüme aşamasındaki folliküllerin ölümü ile ilişkili olduğuna işaret edilmiştir.<sup>25</sup> Sabinoff'un çalışmasında ise farelerde B(a)P'a maruziyetin oksidatif stresi arttırarak oosit kalitesini, sperm-oosit bağlanmasını ve füzyonunu olumsuz etkileyerek sadece kantitatif değil kalitatif olarak da bazı reproduktif parametrelerin olumsuz etkilendiği gösterilmiştir. Primordial folliküllerin oluşturduğu folliküler havuzun küçülmesi, prematür over yetmezliğine gidişi gösterdiği gibi kalan oositlerin de azalmış kalite nedeni ile düşük fertilizasyon kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir.<sup>12</sup>

Resveratrol, Pentoksifilin, Vitamin E, Vitamin C gibi çeşitli antioksidan moleküllerin farklı dokulardaki oksidatif hasarı önleyebilme ve bu şekilde koruyucu etki gösterme üzerinden klinikte kullanımları olabileceğine dair veriler mevcuttur.<sup>26 27 28 29</sup>

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), vücutta başta pineal glandda olmak üzere beyin, göz, gastrointestinal sistem, akciğerler, cilt, böbrek, karaciğer, tiroid, timus, pankreas, immun sistem ve reproduktif sistem gibi çok farklı dokularda üretilen bir nörohormondur.<sup>30 31 32</sup>

Esansiyel aminoasitlerden triptofandan sentezlenen bir indolamin olup, sirkadien ritmlerin ve uyku-uyanıklık sikluslarının regülasyonunda anahtar rol oynar. Seksüel aktivite ve reproduktif fonksiyonlar, immun yanıt, yaşlanma süreci, ısı regülasyonu ve tümör büyümesi gibi fizyolojik süreçlerde de görev aldığı tespit edilmiştir.<sup>25</sup> Nöroendokrin, nöroimmunolojik, kardiyovasküler ve onkostatik aktivitelerde, lipid metabolizmasında, gebelik ve doğum zamanlamasında, korpus luteum fonksiyonunda da yer aldığına dair veriler mevcuttur.<sup>33</sup> Melatonin, bazı etkilerini spesifik membran reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirirken, direkt serbest radikal temizleyiciliği görevini yüksek lipofilik karakteri ve diffüzyon kapasitesi ile reseptöre gereksinim duymaksızın yerine getirir.<sup>33</sup> Melatoninin direkt ve indirekt mekanizmalar üzerinden etki gösteren kuvvetli bir antioksidan molekül olduğu bilinmektedir.<sup>34 35 36</sup>

Melatonin ve metabolitleri, direkt aktivitelerini reaktif oksijen türevlerini (ROS) ve reaktif nitrojen türevlerini (NOS) temizleme işlemi üzerinden, indirekt etkilerini ise muhtemelen epigenetik mekanizmaların rol aldığı antioksidatif enzimlerin stimülasyonu, pro-oksidatif enzimlerin inhibisyonu yoluyla gerçekleştirir.<sup>37 38</sup> Melatonin, amfifilik yapısından dolayı tüm morfofizyolojik bariyerlerden kolayca geçerek yüksek antioksidatif etkinliğini kolayca sergiler ve reaktif türevlere karşı sitoprotektif etkinlik gösterir. Serebrospinal sıvı, tükürük, süt, amnios, semen ve overde folliküler sıvıda varlığı saptanmış olup, folliküler ve serebrospinal sıvılarda kandaki düzeylerinden bile yüksek konsantrasyonlara ulaşabileceği gösterilmiştir.<sup>31</sup> Özellikle reproduktif sistem incelendiğinde, overlerde, kümülüs hücrelerinde, oositte, folliküler sıvıda ve plasentada melatonin üretildiği bildirilmiştir.<sup>32</sup> Melatoninin antioksidan aktivite ile overleri oksidatif hasardan koruması ve mitokondrial apoptozis yollarının indüksiyonunu önlemesi sayesinde, yardımla üreme tedavilerinin uygulandığı olgularda daha iyi oosit ve embriyo kalitesi, daha yüksek fertilizasyon ve gebelik oranları elde edilebildiğine dair veriler mevcuttur.<sup>39 40</sup>

Bu hayvan çalışmasında, sigaraya maruz kalan sıçanlarda sigaranın over rezervi üzerine olumsuz etkilerine karşı, antioksidan bir molekül olan melatoninin koruyucu etkileri olup olmadığının araştırılması planlanmıştır.

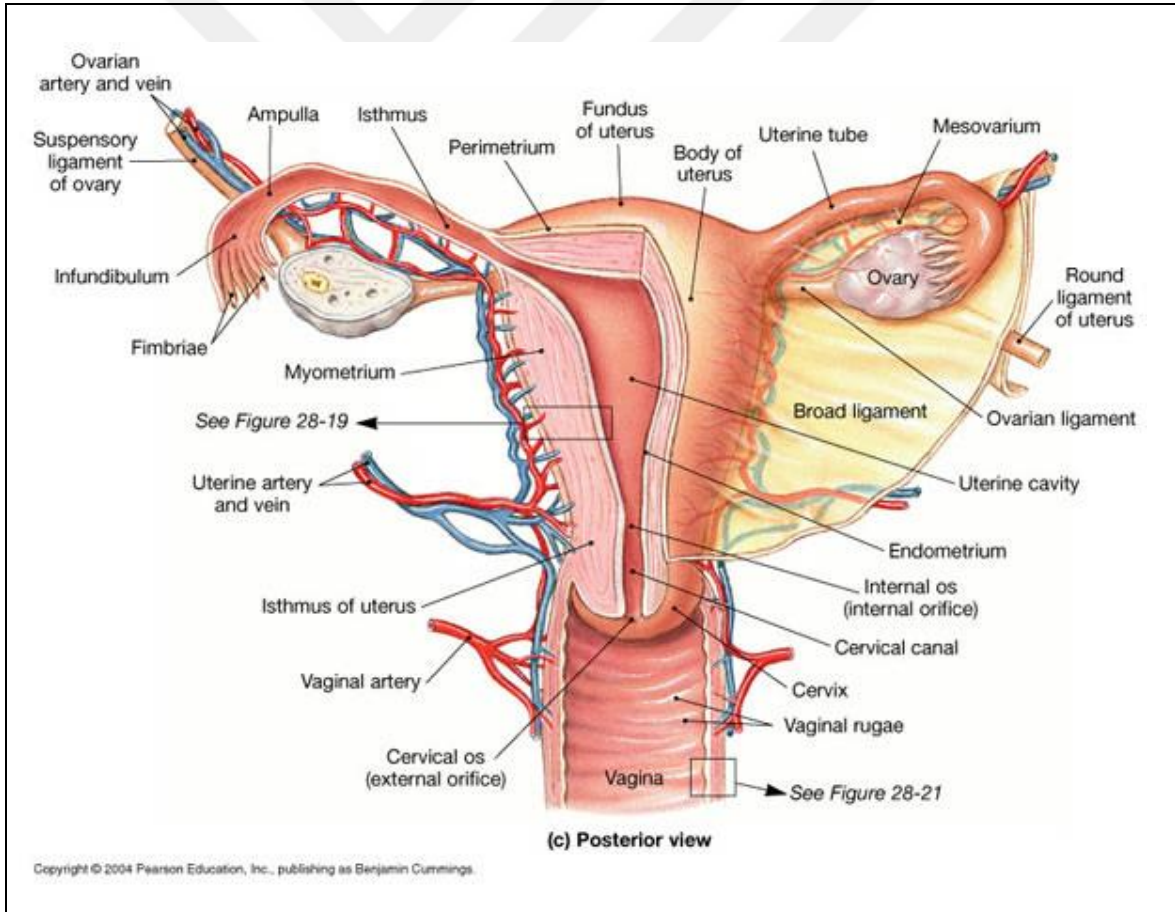


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 OVER

#### 2.1.1. Over Anatomisi

Kadın üreme sisteminin organlarından olan overler, erkeklerdeki testislerin karşılığı olup, uterusun her iki yanında yerleşmiştir. Batın alt kadranda sağ ve sol olarak pelvise oturmuş olarak bulunurlar. Overler adneksial boşluk içine yerleşmişlerdir.<sup>41 42</sup> Overler ve tubalar adneksleri oluştururlar. Overler hormon aktivitesi ve büyüklüğü yaşa, menstürel siklusun zamanına ve ekzojen hormon süpresyonuna bağlı olarak değişir.<sup>43</sup> Overler, reproduktif dönemde yaklaşık olarak 2.5-5 cm uzunluğa, 1.5 ile 3 cm kalınlığa ve 0.7 ile 1.5 cm genişliğe sahiptirler.<sup>43 44</sup> Ağırlıkları yaklaşık olarak 45 gram kadardır. Menopozal dönemle birlikte atrofiye uğrayan overlerin ağırlıkları 23 grama kadar düşebilir.<sup>41 42</sup>



Şekil 1: Uterus, Uterin Tüpler, Overler ve ligamanları (2004, pearson education, Benjamin Cumming)

Overler dışta bir korteks tabakası ve bunun iç kısmında bulunan medulla tabakasından oluşur. Kortekste temel olarak bulunan yapılar folikül, korpus luteum ve korpus albikanslardır. Medulla da esas olarak damar yapıları ve fibromuskuler doku yani bağ dokusundan meydana gelmektedir.<sup>43 44</sup> Overin yüzeyi tunika albuginea bağ dokusu ile örtülü olması sebebiyle pembe-beyazımsı renktedir. Adölesan dönem öncesinde düz ve pürüzsüz olan overlerin yüzeyi, ovulasyon süreciyle beraber düzensiz ve pürtüklü bir hal alır.<sup>45</sup>

Her iki over mediyal kısımlardan uterusu uteroovaryan ligament ile bağlanır. Diğer taraftan lateral kısımlardan infundibulapelvik ligament aracılığıyla pelvik duvara bağlanır. İnfundibulopelvik ligament, diğer bir adı ligamentum suspensoriumun içinden arteria ovarica ve sinirler geçer.<sup>43 44 45</sup> Overlerin kendine ait mezenterleri bulunmakta olup, bu mezenter dokusuna mezoovarium olarak adlandırılmaktadır.<sup>44</sup>

**Overin kan dolaşımı**, abdominal aortanın n yüzünden çıkan arteria ovaricalar tarafından ve de uterin arterlerin ovaryan dalları tarafından beslenir.<sup>43</sup> Venleri ise farklılık gösterir. Sağ ovaryan ven, vena kava inferiora direkt boşalırken; sol ovaryan ven ise sol renal vene boşalır ve burdan vena kava inferiora drene olur.<sup>43</sup> Mezoovaryumda, overlerin kanlanmasını sağlayan uterin arterin ovaryan dalları ile ovaryan arter anastomoz yaparlar.<sup>46</sup>

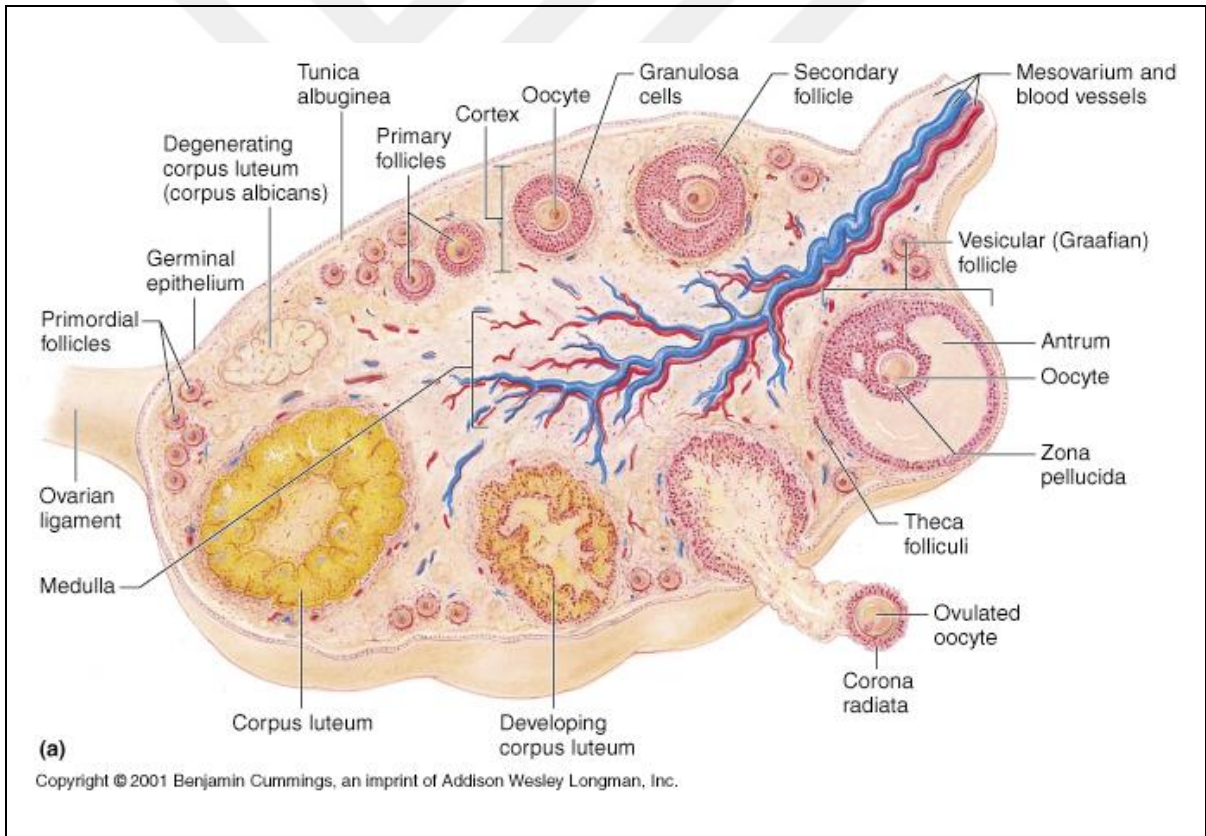
**Overin lenfatikleri**, ovaryan arteri takip ederler ve lomber 1. disk seviyesinde para-aortik lenf nodlarına açılırlar.<sup>41 42</sup>

Overlerin inervasyonu, infundulapelvik ligamentteki seyrinin ardından, plexus renalis tarafından sağlanır.<sup>43</sup> Otonom sisteme ait sempatik lifler *N. Splanchnicus minor* aracılığı ile gelirken, parasempatik lifleri vagus siniri aracılığı ile gelir.<sup>41</sup>

## 2.1.2 Over Histolojisi

Overlerin yüzeyi tek katlı yassı yada kübik epitel hücreleri tarafından kaplıdır; bu epitel tabakasına germinal epitelyum denir. Epitel tabakasının altında, overin rengini veren sıkı bir bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea bulunur.<sup>47 48 49</sup>

Tunika albugineanın alt tabakasında over folliküllerinin bol miktarda bulunduğu korteks tabakası yer alır. Oositlerin içinde yer aldığı folliküller, korteksin bağ dokusu (stroma) içinde gömülü halde bulunurlar.<sup>49</sup> Overin stromasında iğ biçiminde olan fibroblast hücreleri bulunur. Fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer dokulardaki fibroblastlara nazaran farklı yanıt verirler. Overin en iç kısmında yer alan, gevşek bağ dokusunun çevrelediği yoğun damarlanma gösteren medüller tabaka bulunur. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur.<sup>48 49</sup>



Şekil 2: Overin histolojisi (2001, Benjamin Cumming)

Overin diğer parankim hücresi olan granüloza hücreleri ile oosit arasında karşılıklı sinyal iletimini sağlayan gap-junctionlar bağlantıları bulunmaktadır. Granüloza hücreleri bu

oluklu bağlantılar yardımıyla oositin metabolik ihtiyacının %85'ini aktararak beslenmesini sağlamaktadır. Ayrıca bu sinyal iletimi sonucu oosit transkripsiyonal aktivitesi düzenlenmekte ve birçok oosit proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonları uyarılmaktadır.<sup>50</sup> Granüloza hücreleri bir bazal membran içinde yer aldıklarından histolojik preparatlarda diğer yumurtalık hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Buna karşın tek hücreler yapısal özellikleri nedeniyle stromal dokudaki fibroblastlar ve diğer bağ dokusu hücrelerinden, kolayca ayırt edilemezler.<sup>51 52 53</sup>

### 2.1.3 Over Embriyolojisi

Gonadal cinsiyet, döllenme sırasında belirlenen genetik cinsiyet sonucunda oluşur.<sup>54 55 56</sup> Yaklaşık 5. gebelik haftasında, gonad çifti yapısal olarak gonadal çıkıntıları oluşturmak üzere mezonefros üzerinde çölemik çıkıntı şeklinde yoğunlaşır. Bu noktada, gonadın morfolojik olarak over veya testis olduğu ayırt edilememektedir. Gonad dışta çölemik yüzey epitel hücreleri ile iç içe olan ilkel germ hücreleri ve içte merkezde bulunan medullar mezenşimal dokudan oluşmaktadır. Tam bu çıkıntının altında mezonefrik kanal bulunmaktadır. Bu farklılaşmamış dönem yaklaşık 7- 10 gün sürer.<sup>57</sup>

Gonadların oluşması ve farklılaşması ilkel germ hücrelerinin (IGH) ara (intermediate) mezoderm bölgesine gelmesiyle başlar. IGH'yi yolk kesesi adı verilen embriyo dışı zarın duvarındaki hücrelerden döllenme sonrası 4. haftada farklılaşır. 4 ile 6. haftalar arasında IGH'yi ameboid hareketler ile ilkel barsağın etrafındaki dorsal mezenter yolu ile vücut arka duvarına doğru göç eder. İlk IGH'ler 5. haftada torokal 10. vertebra düzeyinde orta hattın iki yanında karın arka duvarına göç ederek gevşek mezenkimal doku içine yerleşirler ve burada mitoz ile çoğalmaya başlarlar. IGH'lerin yerleştiği yerin yanında sölom epitelide bu hücrelerle birlikte çoğalır ve kalınlaşırlar. Sölom epiteli ve IGH birlikte bir çift genital kabartıyı oluşturur. 6. haftada gerek sölom epitelinden gerekse ara mezoderminden genital kabartıya gelen gonadın somatik destek hücreleri ile IGH'leri kaynaşır. Overlere gelen destek hücreleri IGH etrafında toplanırlar. Oogonyumla somatik destek hücrelerinin karşılıklı etkileşimi sonucu overin kabuk kısmı içinde ilkel (primordiyal) foliküller oluşur.<sup>58 59 60</sup>

Göç sırasında germ hücreler prolifer olmaya başlamaktadır.<sup>60</sup> Germ hücreleri; overlerin oluşumu ve devamı için çok önemlidirler. Overler germ hücreleri yokluğunda bozularak

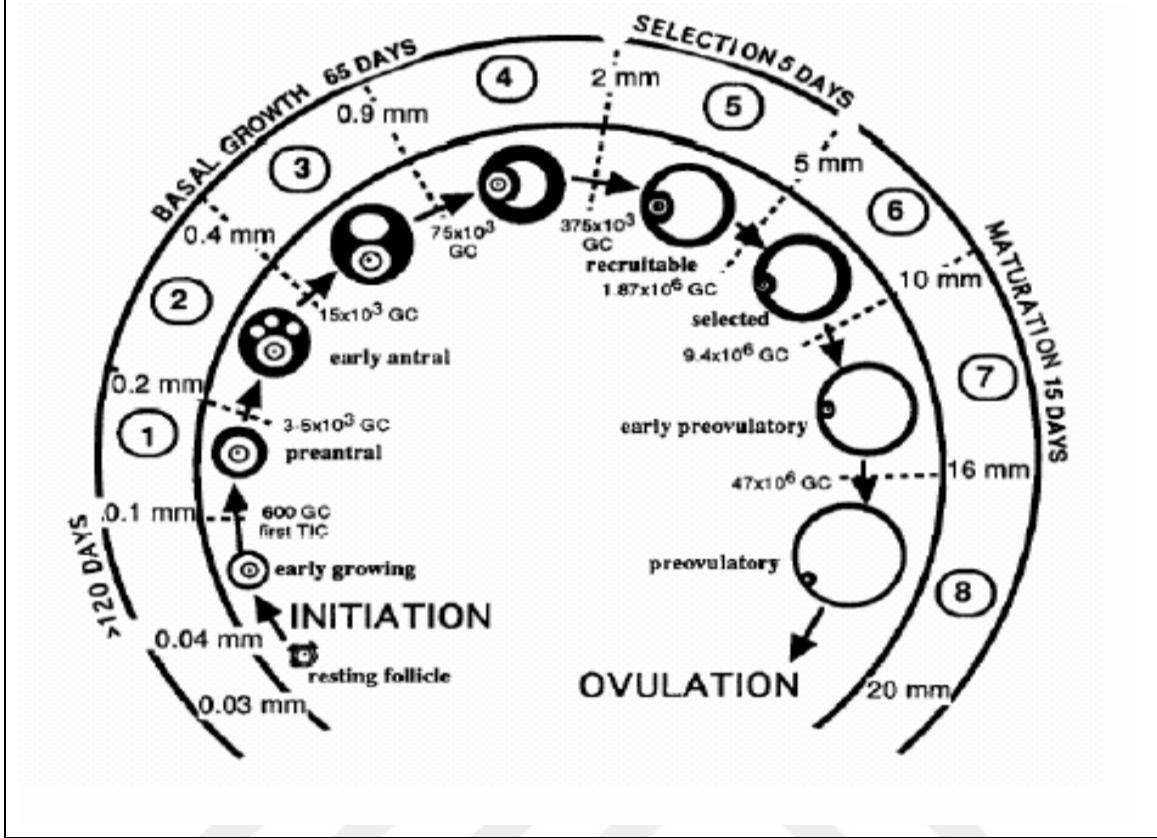
kordon benzeri yapılara dönüşürler.<sup>58 59</sup> Yani germ hücreleri ovumun primer öncülleridir. Yaklaşık 6. Gebelik haftasında farklılaşma evresi tamamlanır ve birincil cinsiyet oluşur.<sup>57</sup>

Gestasyonun 6- 8. haftalarında ovaryan farklılaşmanın ilk işaretleri, 16- 20. Haftalarda 6- 7 milyon oogoniaya ulaşmasını sağlayacak germ hücrelerinin hızla mitotik çoğalmaya başlamasıdır.<sup>57 61 62</sup> Bu dönemden sonra germ hücre sayısı giderek azalacak ve 50 yıl sonra ise oosit deposu tamamen tükenecektir.<sup>57</sup> Programlı hücre ölümü sonucunda bu sayı daha sonra hızla azalır. Adölesan dönemde bu sayı yaklaşık olarak 400.000 civarındadır.<sup>63</sup>

Yaklaşık 9. Gebelik haftası içerisinde germ hücreleri mitoz ile oogonyuma dönüşürler. Oogoniyalar ilk mayotik bölünmeye girip profaz evresinde durdukları dönemde oositlere dönüşürler. Bu süreç 11- 12. Haftalarda başlar. Mayozun diploten evresine ilerlemesi ancak gebeliğin geri kalanında olmakta ve doğumda tamamlanmaktadır.<sup>57</sup> Birinci evrenin sonunda mayozun duraklamasının sebebi muhtemelen granüla hücrelerinden sentezlenen inhibe edici maddeler aracılığı ile sağlanmaktadır.

Oyum, oositin iki kez mayoz bölünmesi ile oluşur. Birinci mayoz bölünme ovulasyon öncesinde meydana gelmektedir. İkinci mayoz bölünme ise sperm girişi ile meydana gelmektedir.<sup>57</sup> Gestasyonun 18- 20. haftalarında hücreden oldukça zengin olan korteks daha derindeki medullar bölgeden kaynaklanan vasküler kanallar tarafından yavaş yavaş delinir ve bu folikül oluşmasının başlangıcını belirtir.<sup>64</sup> Vaskülarizasyon kortekse doğru ilerledikçe, yoğun kortikal hücre grupları gittikçe daha küçük kısımlara ayırır. Mezenşimal yada epitelyal kaynaklı perivasküler hücreler de damar ile birlikte sürüklenir ve bu hücreler mayozun birinci evresini tamamlamış olan oositleri çepeçevre sarar. Sonuçta oluşan primordiyal folikül- mayozun profaz evresinde duraklanmış olan bir oosit ve onun etrafında bir bazal membran tarafından çevrelenen tek katlı iğsi şeklinde öncül granüloza hücreleridir.<sup>57</sup> Öncül granüloza hücrelerinde oluşan tabakanın granüloza hücre tabakasına dönüşmesi ile primer folikülün oluşumu belirlenir. Daha ileri bir farklılaşma daha tamamlanmamış bir granüloza hücre çoğalması ile preantral folikül oluşur. Gebeliğin 6. Ayında pre-antral foliküller tespit edilebilir.<sup>57</sup>

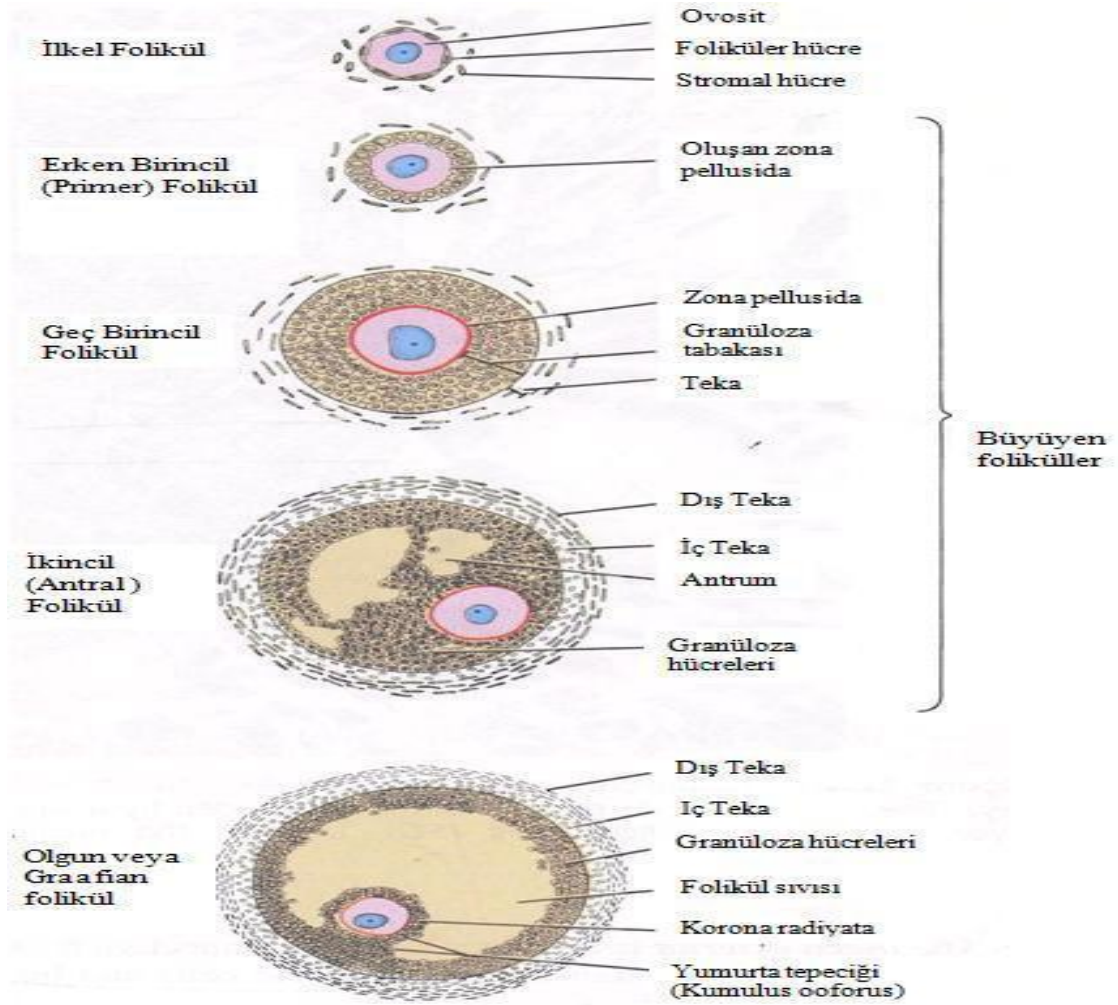
Şekil 3: Folikül gelişimi (Gougeon, 1996)



**Folikülogenez;** overlerin olgunlaşmasıyla üç tip folikül gözlenir: İlkel foliküller, büyüyen foliküller ve olgun (Graaf, Tersiyer) foliküller. Büyüyen foliküller de gelişiminde gözlenen değişikliklere göre üç farklı evrede incelenir: Erken primer foliküller, geç primer foliküller, ikincil (antral foliküller). Birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde duraksayan ilkel foliküle içerisindeki birincil oosit bulunmaktadır. İlkel foliküller, overlerin parankim hücresi olan, tek tabaka yassı granüloza hücreleri ile çevrilirken; diğer foliküller granüloza ve en dıştaki stromal hücreler olarak bilinen teka hücreleri tarafından çevrilmiştir. Folikülogenezin son basamağında olgun folikül içerisinde ikincil oosit bulunmaktadır. Foliküller büyüdükçe ve matürleştikçe tunika albugineaya doğru göç eder.<sup>65 66</sup>

Geç Birincil Folikül evresinde FSH'a cevap vermeyen foliküller atreziye uğramaktadır.





Şekil 4. Folikulogenezis (Ross MH,1995, Histology A Text And Atlas)

Oositlerdeki gelişim ve atrezi, apoptoz birçok moleküler mekanizmanın kontrolü altındadır. Apoptoz, ovaryan follikül'de bazı hücrelerde görülür. Apoptoz *Granuloza hücrelerinde* ve *luteal hücreler* sıklıkla erişkin dönemde olur iken, oositlerdeki apoptoz fetal hayatta karşımıza çıkar. Oositlerde apoptoz 13.haftadan başlar ve 14-20. haftalar arasında maximum seviyeye (%11-17) ulaşır.<sup>67</sup> Doğuma dek gitgide azalır ve postnatal oositlerde apoptoz izlenmemektedir. Çevresel etmenler ( sigara) nedeniyle apoptoz görülebilmektedir.

## 2.1.4 Over Fizyolojisi

Steroid hormonlarının salınması (steroidogenez), oositin periyodik olarak oluşumu ve atılması (oogenez) olmak üzere overlerin primer olarak iki fonksiyonu vardır.<sup>68</sup> Hipotalamusta sentezlenen gonadotropin releasing hormona (GnRH) yanıt olarak ön hipofiz hormonlarından folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salgılanır. Ön hipofiz bezinden salgılanan bu iki hormona yanıt olarak overler tarafından primer steroid hormonlar östrojen ve progesteron salgılanır.<sup>69 70</sup> FSH, foliküllerin gelişimini ve foliküler hücrelerden östrojen salgılanmasını uyarır.<sup>70 71</sup> LH, ikincil oositte 1. mayotik bölünmenin tamamlanmasını uyararak ovulasyonu tetikler ve ovülasyon sonrasında ovumun atılması sonrası kalan folikülden korpus luteum oluşumuna ve buradan progesteron salınımına neden olur.<sup>70 71</sup>

Doğurganlık çağında üretilen östrojenler arasında en etkin ve miktar olarak fazla olan östadiol, granüloza hücreleri tarafından üretilir.<sup>72 57</sup> Overlerin teka hücreleri tarafından sentezlenen progesteron, menstrual siklusun luteal fazında endometriumun sekresiyonel değişimleri başlatarak uterusu zigotun implantasyonuna hazır hale getirir.<sup>50</sup>

Adölesan dönem ile birlikte folikülogenez başlar. Folikülogenez, temel olarak 3 bölümde oluşur. Bunlar başlangıç, döngüsel (siklik) ve dominant folikül dönemleridir. Folikül içindeki birincil oosit bu dönemde 1. mayozun profaz 1 evresinden 2. mayozun metafaz 2 evresine kadar ilerler. Oosit etrafındaki folikül hücreleri ise genel olarak gonadotropin bağımsız ve gonadotropin bağımlı olmak üzere iki ana süreçten geçer.<sup>50 73</sup> Bu folikülogenez süreci her bir folikül için 84 gün sürelidir. Gonadotropin bağımsız dönem, 84 günlük periodun son 14 gününe tekabül eder. Bu dönemde oosit kapasitesine, yaşa ve çevresel faktörlere bağımlı olarak her bir yumurtalıkta 3-11 adet folikül seçilir. Bu foliküller FSH'ın tonik salınmalarının etkisi ile geç birincil folikül evresine kadar gelişir.<sup>50 74 75</sup>

Gonadotropin bağımlı dönemde FSH ve LH birlikte folikülü etkileyerek siklik folikülogenez dönemine geçişi sağlarlar. Ovulasyondan önceki son 7 günde seçilen foliküllerden bir tanesi dominant folikül haline geçer. Ovulasyondan önceki son 24 saatte ise LH pikiyle dominant foliküldeki oosit ovulasyonla birlikte atılır.<sup>50 74 75</sup>



Ovulasyon, ortalama 28 günlük menstrasyon siklusun yaklaşık 10-17. Günleri arası olur ve her siklusta yumurtalıktan bir oosit serbest bırakılır. LH olgun folikülün hızlıca şişmesine ve duvarının zayıflamasına sebep olarak ovulasyonu tetikler.<sup>50 75</sup> Menstrual siklusta her zaman ovulasyon gerçekleşmeyebilir ya da birden fazla oosit atılabilir.<sup>50 74</sup>

Folikül hücreleri; ovulasyondan önce sahip oldukları FSH reseptörlerinin yanısıra LH reseptörleri de bulunur. Bunun nedeni dominant folikülün (preovülatuar) korpus luteuma dönüşmesi için granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin gelişmesi gerekmektedir. LH reseptörleri, teka hücreleri üzerinde bulunmaktadır ve başlangıçta granüloza hücreleri üzerinde yoktur. Ancak folikül büyüdükçe FSH, granüloza hücreleri üzerinde LH reseptörlerinin ortaya çıkışını uyarır. LH tarafından uyarılan teka interna hücrelerinde androjen sentez ve salınımı artar, oluşan androjenler östrojen öncülü olarak granüloza hücrelerine yollanır. Granüloza hücreleri de FSH etkisiyle iç tekadan gelen androjenleri östrojene çevirirler. Östrojenin artışı sonucu granüloza hücrelerinde çoğalma artar ve folikül büyümeye devam eder. Ovulasyondan 24 saat önce olan LH piki ile granüloza hücreleri üzerindeki LH reseptörleri duyarsızlaşır ve LH cevabı sonucu sentezlenen östrojenin üretimi durur. Ovulasyondan sonra ise yumurtalıkta kalan folikülün granüloza ve iç teka hücreleri, LH tarafından uyarılarak luteinizasyona uğrarlar ve hormon salgılayan geçici, büyük bir endokrin bez olan korpus luteumu oluştururlar. Korpus luteum, progesteron ve az miktarda östrojen salgılamaktadır.<sup>76 77</sup>

Korpus luteum, fertilizasyon sonrası 8. haftaya kadar varlığına devam eder. Daha sonra progesteron salgılanmasını plasenta sürdürür. Bu süreçte korpus luteumun bozulması sinsityotrofoblastlardan gelişen insan koryonik gonadotropin (hCG) tarafından engellenir.<sup>78</sup> Gebelik oluşmamışsa korpus luteum giderek geriler, progesteron yapımı durur ve korpus albicans olarak beyaz renkli fibrotik dokuya dönüşür. Korpus luteumun gerilemesine olayına luteoliz denir. Korpus albicans yumurtalıklarda küçülür ve bir nedbe dokusu olarak kalır.<sup>78 79</sup>

## 2.2 İnfertilite

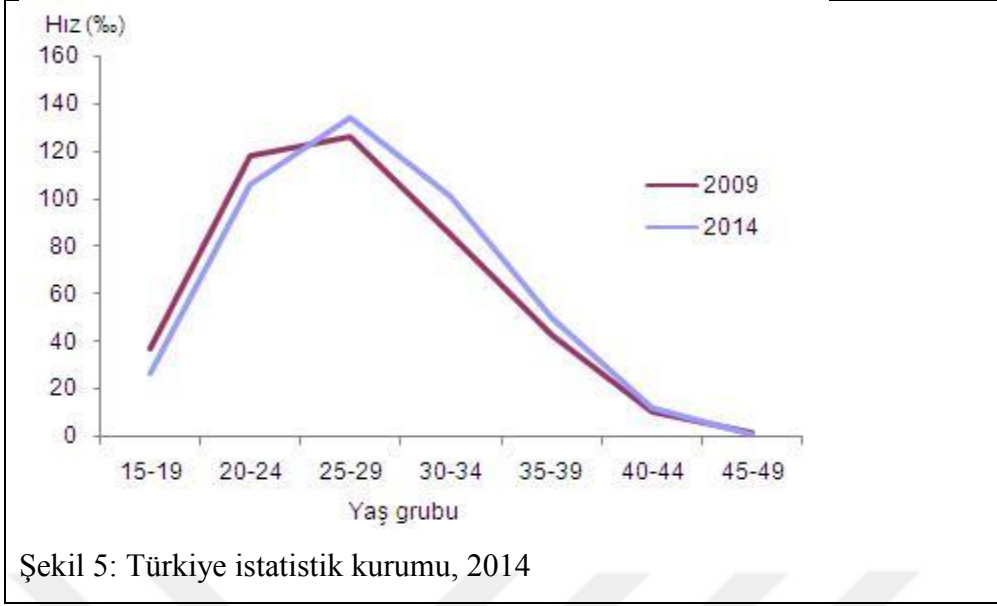
İnfertilite bir yıl süreyle korunmasız cinsel ilişkiye girilmesine rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanmaktadır.<sup>80</sup> Sağlıklı genç bireyler yaklaşık olarak %85-90 oranında bir yıl içerisinde gebe kalmaktadır. Bunların çoğunluğu ilk 6 ay içerisinde olmaktadır.<sup>81 82</sup> Fekundabilite bir siklustaki gebelik oluşma olasılığı iken, fekundite canlı doğum ile sonuçlanan siklusu ifade etmektedir.<sup>57</sup>

İnfertilite tanı ve tedavisindeki gelişmeler son 25-30 yıl içinde çarpıcı bir şekilde artmıştır. İnfertilite konusunda halkın ve hekimlerinde farkındalığı artmakta ve nedenleri araştırma kapasitesi günden güne gelişmektedir. Özellikle invitro fertilizasyon ( IVF) ve diğer yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmeler, bazı infertilite gruplarında prognozu iyileştirmiştir.<sup>57</sup>

ABD de kadınların daha ileri eğitim alma ve kariyer yapma isteği, ileri yaşta evlilikler, boşanmanın sıklığı, korunma yöntemlerindeki gelişmeler ve aile planlamasının daha etkin kullanılması sonucunda yaşlılığa bağlı infertilite sıklığında artış gözlenmektedir. Yaşlanmanın kadın infertilitesine olan etkisi, istemli kısıtlama olmayan çiftlerden oluşan doğal popülasyonda yapılan fertilitte çalışmaları sonucu gösterilmiştir.<sup>57</sup> Genel olarak, doğurganlık oranları toplumda 25-29 yaş kadınlarda %4-8 iken, 30-34 yaşta kişilerde %15-19, 35-39 yaş arasında %26-45 ve 40-45 yaş arasında %95 ten daha düşük değerlere sahiptir.<sup>83 84</sup> Aynı zamanda yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen başarı oranları yaşla beraber azalmaktadır. Bunun en önemli nedeni toplanan oositler ve elde edilen embriyoların azalması ve implantasyon olasılığının azalması olarak düşünülmektedir.<sup>85 86</sup>

Yardımcı üreme tekniklerindeki canlı doğum oranındaki azalmanın ikincil nedeni olarak gebelik kayıp oranlarındaki artış olarak gözükmektedir. Doğal olarak elde edilen gebeliklerde düşük oranları 30 yaş öncesinde %7-15 iken 40 yaş üzeri bu oran % 34-52 seviyelerine yükselmektedir.<sup>83 87 88</sup>

Overin folikül tüketim miktarının doğru bir şekilde model oluşturulması önemlidir. Keza üremeye ilgili plan yapmalarına yardım edebilmek için mevcut folikül sayısının öngörülmesi lazımdır.<sup>89</sup>



### 2.2.1 İnfertilitenin Değerlendirilmesi

İnfertilite değerlendirilmesi, üreme performanslarına bakılmaksızın çiftler birlikte değerlendirilmelidir. İnfertilite bir bütün olarak değerlendirilmesi gerektiğinden çiftler görüşmelere ve her muayeneye birlikte gelmesi önemli bir husustur. Çiftlerin birlikte muayenelere iştirak etmesi hatırlanmayan veya bilinmeyen bir bilgiye ışık tutabilmektedir. Bununla beraber sorular direkt olarak sorulabilmekte, öneriler veya tedavi interaktif bir şekilde yönlendirilebilmektedir.<sup>57</sup>

İnfertil çiftleri değerlendiren klinisyenlerin 4 temel amacı olmalıdır:

- Mümkünse infertilite özel nedenlerinin tanısının konulup tedavisinin uygulanması
- Geçmişte öğrenilen yanlış bilgilerin düzeltilmesi, arkadaş ve çevresinden edinilmiş bilgilerin doğru bir şekilde anlatılması.
- Tedavi süresince duygusal desteğin sağlanması, gerekirse destek grupları kurulmalı ve grup terapisi yapılmalı ve durumun olağanlığı anlatılmalıdır.
- Doğal yollardan gebelik sağlanamayan çiftlerde, İVF, donör gametler ve evlat edinme hakkında bilgi verilmelidir.

Danışmanlık verilmesi aslında infertilite değerlendirilmesinin temelini oluşturmaktadır.  
<sup>57</sup> Değerlendirmeye başlarken en önemli adım ayrıntılı bir öykü alınması ve fizik muayanedir. Spesifik belirti ve bulgular ışığında infertilite nedeni erken olarak saptanabilir.  
92

Öyküde başlıca anamnezinde başlıca sorgulanması gerekenler; gravida, parite, gebelik sonuçları ve ilişkili komplikasyonlar, menstruasyon süresi, dismenore şiddeti, cinsel ilişki sıklığı ve işlev bozukluğu, geçirilen cerrahi işlemler, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, kullanılan ilaçlar, anormal smear bulgusu, madde kullanım öyküsü mevcut mu, doğumsal anomali, aile öyküsü, tiroid hastalıkları, galaktore ve disparonidir.

Fizik muayenede; ağırlık, vücut kitle indeksi, tiroid bezinde büyüme veya nodül, meme salgıları ve özellikleri, androjen fazlalığı bulguları, pelvik veya abdominal hassasiyet, organ büyümeleri veya kitle, adnekslerde veya douglasta hassasiyet veya nodülerite saptanması önemlidir.<sup>57</sup>

Menstruasyon ile ilgili bulgular; ovulasyonla ilgili bozukluklara, servikal intraepitelyal neoplazi öyküsü olanlarda servikal faktörlere bağlı bozukluklara ve stenozun tanısını saptamaya yardımcı olmaktadır. Geçirilmiş uterin cerrahiler ve komplike olmayan gebelik sonlandırmaları, gebelik elde etmede olumsuz etkisi bulunmaktadır.<sup>90 91</sup>

Keza endometriyozis düşünülen olgularda, dismenore, disparoni, Douglas hassasiyeti anlamlı olabilir. Oligomenore, hipomenore veya amenore ataklarında azalmış over rezervi ve polikistik over sendromu akla gelmelidir.<sup>57</sup>

### 2.2.2 İnfertilite Nedenleri

Normal bir gebelik etmek için; ovulasyon, ovumun fallop tüpü tarafından tutularak tubaya aktarılması, tuba içerisinde ovum ve spermin fertilize olması, fertilize olan ovumun uterin kaviteye taşınması ve en son endometriuma implantasyonunu içeren, bir dizi kompleks olaylar dizisi meydana gelmektedir. Tabii bunun yanında yeterli miktarda ve nitelikte sperm, ovulasyon zamanında servikste depolanmış olmalıdır. Tüm bunların ışığında uygun değerlendirme ve tedavi etmek ve tedavi stratejisinin geliştirmek için klinisyen bu olaylar dizisini göz önünde bulundurmalıdır. <sup>43</sup>

İnfertilite nedenini araştırmaya başlamadan önce, infertilitenin majör sebepleri ve değerlendirme için temel bulgular göz önünde bulundurulmalıdır. İnfertilitenin temel olarak nedenlerini sınıflandırılacak olunursa; ovulatuvar bozukluklar (%20-40), tubal ve pelvik patoloji (% 30-40), ve erkek faktörleri (% 35) dir. Tüm değerlendirmelere rağmen bir kısım çiftte infertilite nedeni açıklanamamaktadır(%10). Tüm bu nedenlerin sıklığı yaşla birlikte değişmektedir. Ovulasyon bozuklukları daha genç yaşlarda sıklığı fazla olsa da, tubal ve peritoneal faktörler yaklaşık olarak genç ve yaşlılarda sıklıkları eşit olarak gözlenir. Erkek faktörleri ve nedeni açıklanamayan infertilite yaşlı çiftlerde daha sık görülmektedir. <sup>92 93</sup>

Erkek infertilitesi, infertilite nedenleri arasında yaklaşık olarak %35 i kapsamaktadır. Bu yüzden önem arz etmektedir. Erkek infertilitesinin araştırılmasının ilk basamağı olarak semen analizi görülebilir. Erkek eşin öyküsünde herhangi bir travma, cinsel işlevlerde bozukluk veya genital bir anomali yoksa, semen analizi ilk basamak olarak alınabilir. Aksi takdirde, ilk basamak olarak muayene ve ayrıntılı genital sistem değerlendirilmesi gerekmektedir. Sperm analizindeki aşikar patolojik bulgular ek değerlendirme gerektirmektedir ve ürolog veya erkek infertilitesi üzerine özelleşmiş bir uzman tarafından değerlendirilmesi esastır. <sup>94</sup> Olgun sperm oluşum süreci (spermatogenez) 90 gün olduğundan, erkek eş 3 aylık öyküsü alınmalıdır. Keza erkeğin adölesan dönem hikayesi ve yüksek ateşli hastalıklar sorgulanmalıdır. <sup>43</sup> Cinsel yolla bulaşan hastalıklar vas deferens tıkanmasına yol açtığından dikkatle sorgulanmalıdır. Toplum içinde yaygın olarak görülen varikozel de bir diğer akıldaki tutulması gereken durumdur. <sup>57</sup>

Kadın infertilitesinde, herhangi bir hastalıkta olduğu gibi ayrıntılı anamnez ve fizik muayene en önemli basamağı oluşturur. Kadın için alınan öykü eksiksiz bir jinekolojik öykü olmalıdır. Özellikle menstrüel öyküsü ve sıklığı, süresi, dismenore ve kanama miktarı önem teşkil eder. Bunun yanında persiste eden over kisti olması, endometriozis öyküsü , leiomyom olması veya myomektomi öyküsü, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve pelvik inflamatuvar hastalık öyküsü olması yine önemli hususlardır. Daha önce geçirilmiş bir gebelik mevcutsa; gebelik sonucu, gebelik kaybı mevcut mu, erken doğum var mı, karyoamnionit veya plasental retansiyon öyküsü mevcut mu ve fetal anomali mevcut mu iyi sorgulanmalıdır. Konizasyon öyküsü olanlarda servikal stenoz veya servikal mukus kalitesi ve miktarı azalması beklenebilir. Cinsel ilişki sıklığı ve zamanı yani ilişki öyküsünde sorgulanmalıdır. <sup>43</sup>

İnfertilite nedenlerine yönelik değerlendirmede düşünülmesi gereken ana nedenler;

- 1) Ovulasyonla ilgili işlev bozukluğu
- 2) Tuba ve pelvik hastalıklar
- 3) Uterus kaynaklı hastalıklar
- 4) Servikal kaynaklı hastalıklar
- 5) Erkek eşe bağlı hastalıklar olmak üzere belli ana başlıklarda toplanabilir. <sup>43 57</sup>

Genel olarak ovulasyon ile ilgili problemler infertil çiftlerin yaklaşık % 20' sinden sorumludur. Ovulasyon sorunları gebelik elde edilemeyecek kadar ciddi anovulasyon veya oligoovulasyon olabilir. Anamnezin yanında ovulasyon fonksiyon bozukluklarını saptamak için belirli tetkik ve yöntemler belirlenmelidir. Tabiki hiç bir test kesin tanı koyduramamaktadır. <sup>57</sup> Menstrüel öyküsü; anovulasyon tanısı konulmasında tek başına anlamlıdır. <sup>43 57</sup> Normal düzenli bir menstrüel öykü 25-35 gün aralıklarla olan ve 3-7 gün kanamanın devam ettiği sikluslar olarak tanımlanabilir. <sup>43</sup> Premenopozal veya menopozal dönemi andıran düzensiz, miktarı azalmış menstruel kanama anovulasyon paterni olarak gelmektedir. Ovulasyonu belirlemede siklus ortası pelvik ağrı, meme hasasiyeti, akne, yeme değişiklikleri kullanılabilir. <sup>43 57</sup>

Bazal vücut ısısı artışları ile de ovulasyon günü hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bunun nedeni progesteronun termogenik özelliklerine dayanmaktadır. İdeal bir bazal vücut ısı kaydı belirgin olarak bifazik patern gösterir, ısı artışından yaklaşık 12 gün sonra kanama

beklenir. Gözlenen ısı artışından 7 gün önce cinsel ilişki başlanması ve ısı artışının olduğu gün sonlanması önerilmektedir.<sup>57</sup>

**Şekil 6: Bazal vücut ısısı eğrisi, bifazik patern**



Serum progesteron ölçümü, doğru zamanda yapıldığında en basit, güvenilir ve objektif testtir, bu yüzden en sık kullanılanı testtir. Foliküler fazda 1ng/ml' nin altında olan progesteron değerleri, LH piki ile beraber yükselmekte, ovulasyonun 7-8 günlerinde en yüksek seviyelere çıkmaktadır. Adetin hemen başında veya adet başlamadan önce 3 ng/ml altındaki değerler normal olarak değerlendirilmektedir. Bunların haricindeki günlerde anovulasyonu göstermektedir.<sup>95 96</sup> İdeal olarak ovulasyonun en iyi değerlendirilen progesteron ölçüm zamanı adet tarihinden yaklaşık 1 hafta önce bakılandır. Genel inanış olan adet 21 günü progesteron ölçümü her zaman en doğru sonucu vermez.<sup>57</sup> Ovulasyonun belirlenmesinde kullanılan bir diğer test ise LH kitleridir. Genel prensip olarak midsiklustaki LH piki ile beraber idrarda atılan metabolitlerinin kitler ile tayinine yarar. Genel olarak öngörülen ovulasyondan 2 ila 3 gün önce bakılmaya başlanmalıdır. LH yarılanma ömrü 48-50 saat olduğundan test ovulasyondan sonraki gün pozitif olarak çıkmaktadır.<sup>43</sup>

Ovulasyonu değerlendirmek için kullanılan bir diğer yöntem ise, progesteronun endometrial dokuda oluşturduğu histolojik değişimlerini gösteren endometrial biopsidir. Foliküler faz boyunca, endometrium dominant ovaryan folikülden salgılanan östrojenle ilişkili olarak proliferasyon gösterecektir. Luteal fazda ise korpus luteumdan salgılanan progesteron etkisiyle sekretuar transformasyon olacaktır. Anovulasyonda siklus devamlı foliküler fazdadır; endometriyumu devamlı proliferasyon göstermektedir ve artmış

östrojen uyarısıyla birlikte hiperplastik duruma geçmektedir. Kronik anovulasyonu olan hastalarda endometrial biopsi, spesifik tedavi gerektirecek endometrial hiperplazinin tanısında veya ekarte edilmesinde kullanılmaktadır.<sup>57</sup> İnsan implantasyon aralığı ovulasyon sonrası 6-10 günü içeren kısıtlı bir dönemdir.<sup>99</sup>

Korpus luteumdan yetersiz salınan progesteron salgılanması veya luteal faz yetmezliği hem erken gebelik kayıplarının hem de infertilitenin önemli bir sebebidir.<sup>97 98</sup> İmplantasyon penceresi göreceli olarak dar olduğu düşünülmektedir.<sup>99 100 101</sup> Dolaşımında düşük düzeyde progesteron seviyeleri endometrial olgunlaşmada gecikmelere neden olacak ve sonuçta implantasyon penceresinde kayma veya gecikmelere neden olacaktır. Yakın zamana kadar rutin endometrial doku örnekleme, luteal faz yetersizliği için kullanılmaktaydı.<sup>102 103</sup> Artık infertilite değerlendirilmesinde kullanılmamaktadır.<sup>57</sup> Bunun en önemli nedeni değerlendirmeler ve değerlendiriciler arasında çok fark olmasıdır.<sup>43</sup>

Transvajinal ultrason ile seri görüntüleme yöntemi en son bulunan ve en komplike ovulasyon değerlendirme testidir. Görüntülemeler sayesinde ovulasyon sonrası oluşan karakteristik değişiklikler izlenmekte ve problem hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Her ne kadar ovulasyonun pozitif kanıtları hala kesin olmasada; seri ultrasonografi muayeneleri, ovulasyon öncesi foliküllerin sayı ve boyutları hakkında detaylı bilgi vererek ovulasyonun ne zaman olduğunun doğru bir biçimde tahminini yapabilmektedir.

Ovulasyon öncesi dönemde, preovulatar foliküller günde yaklaşık 2 mm lik büyüme göstermektedir (1-3 mm/gün). Ovulasyondan sonra, folikül boyutu hızla azalır, kenarları hızla düzensizleşir, ekojenitesi artar ve culdesac'da sıvı miktarı artar.<sup>104</sup> Anormal folikül gelişmeleri de izlenmektedir.

Serviks sağlıklı bir gebelik sürecinde önemli rol oynamaktadır. Servikal mukus, ilişki sonrasında vajinaya gelen spermleri ejakülden ayırarak, morfolojik olarak kötü olan spermleri elemine etmektedir.<sup>105</sup> Spermin canlı kalabilmesi için biyokimyasal olarak hazır hale getirilmesi servikal mukusun görevidir. Aynı zamanda servikal mukus sperm için rezervuar görevi de yapar. Böylelikle ejakülden ovulasyona kadar spermin canlı tutar. Mukus, jel yapısında bir glikoproteindir. Müsin dizileri arasında kanallar olan bir yapısı vardır. Östrojen seviyelerinde değişimlerle birlikte menstrüel siklus boyunca bu



kanallarda genişleme ve daralma olmaktadır ve sperm geçişlerini ayarlamaktadırlar.<sup>106 107</sup>  
108

Östrojen ile servikal mukus üretimini uyarılmaktadır. Foliküler gelişim boyunca östrojen düzeyi arttıkça mukusun miktarı ve akışkanlığı artarak sperm geçişine olanak sağlanmaktadır.<sup>109</sup> Progesteron ise servikal mukus üretimini azaltarak visköz yapıya gelmesine neden olur, böylece sperm geçişine engel olacaktır.<sup>43 57</sup>

Postkoital test, infertilitede servikal faktörü belirleyen infertilitenin geleneksel bir metoddur. Postkoital testin zamanlaması yani mukusun toplanması önerilen tekniklere uygun olmaması ve yorumlar değişiklik göstermeydi.<sup>110</sup> Bununla birlikte, servikal mukus örnekleme beklenen ovulasyondan hemen önce ilişkiden 2-12 saat sonra yapılmalıdır. Mukus aspirasyon veya nazal polip forsepsiyile toplanmalıdır. Toplanan mukusun mikroskopik ve makroskopik incelemesi ile var olan spermelerin motilite ve sayısı belirlenir. Mukusun fiziksel özellikleri olarak, hacmi, pH, berraklığı, selüleritesi, viskozitesi (spinbarkeit ) ve ferning testine bakılmalıdır. Spinbarkeit; santimetre olarak mukusun uzama yeteneğine denir. Ferning testi ise mukusun cam üzerinde kurutulması sonrası kristal yapısının incelenmesidir. Motil sperm gözlenmesi, ilişki tekniği ve sperm yaşam süresinin yeterli olduğunu göstermektedir.<sup>111 112 43</sup>

Birçok hekim, inceleme alanlarında tek bir motil sperm izlenmesini pozitif veya normal test olarak değerlendirmektedir.<sup>110 113 114</sup> Yapılan testin normal olmaması veya negatif çıkmasının en sık nedeni mukus toplama zamanlamasının uygunsuzluğudur. Servikal faktör tanısının konulması için normal kişilerde de anormal test verir, bu yüzden ikinci kez test tekrarlanmalıdır.<sup>110 113 115</sup> Servikal faktör infertilitesinde uygulanan en etkili yardımcı üreme yöntemi intrauterin inseminasyondur (IUI). IUI tedavisi ile ilgili sonuçlar ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur fakat hiç tedavi uygulanmayanlara göre orta düzeyde bir fayda sağlamaktadır.<sup>116</sup>

Servikal mukus üretiminde veya sperm mukus ilişkilerindeki anormalliklerin nadiren infertilite nedeni olması nedeniyle; postkoital test, uzun süre infertilite araştırmalarında temel ve önemli bir yöntem olarak sunulmasına rağmen artık nadir olarak kullanılmaktadır. Spekulum muayenesi, kronik servisit olabileceğini düşündürüp ileri inceleme ve tedavi

gerekliliği hakkında bilgi verebilmektedir. Bu muayene aynı zamanda ağır servikal stenoz hakkında da bilgi vermektedir. Her iki durumda da sperm-mukus ilişkisi bozulacaktır. Postkoital testin standart yöntemi ve yorumu bulunmaması da diğer bir dezavantajdır.<sup>110</sup> Testin yorumlanması ve performansı deneyimli kişiler arasında da farklılıklar göstermektedir.<sup>117</sup>

Endometrial örneklemede olduğu gibi postkoital testin de kanıtlanmış tanısal değeri yoktur. İnfertil çiftlerin çoğunda test sonuçları tedavi seçimini etkilememektedir. Test sonuçları ışığında oluşan çiftler arasında anksiyete ışığında, rutin postkoital test anlamsız bir metod olmaktadır. Sonuçların tedavinin yönünü değiştireceği düşünülen kişilere test uygulanabilmektedir.<sup>118</sup>

Uterin faktörler infertilite hastalarında nadir olup, infertil hastaları değerlendirirken her zaman akılda tutulması gerekir. Uterin anomaliler, diğer infertilite nedenlerine bağlı başarılı tedaviler ile elde edilen gebeliklerde olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Uterin faktörleri olarak, doğumsal anomalilerin yanı sıra leiomyomlar, endometrial polipler, asherman sendromu gibi hastalıklar sayılabilir. Bunlara ek olarak kronik endometritte fonksiyonel olması nedeniyle önemli bir yer tutar. Burda bahsedilen hastalıklar infertiliteye olumsuz etkilerinin yanında, gebelik idamesi ve sonuçlarına da olumsuz etki yapmaktadır. Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisinde de yer alırlar.<sup>57</sup> Konjenital uterin anomalilerinden bahsedilecek olursa, kalıtsal olanlar en sık karşılaşılanlar uterin septum, unikornat uterus, bikornat uterus ve uterin didelfus olarak sayılabilir. Tabii bunların içinde uterin septum histeroskopik rezeksiyon olanağı ile kolay bir şekilde tedavi olduğundan ve de tedavi sonrası olumlu gebelik sonuçları olması nedeniyle sıkça cerrahi seçenek tercih edilen bir hastalıktır. İntrauterin yaşamda maruz kalınan, sentetik östrojen içeren dietilstilbesteron nedeniyle oluşan uterin anomalileride göz önünde bulundurmak gerekir. Klasik olarak T şeklinde ve küçük bir uterus bu hastalarda gözlenir.<sup>43</sup>

Uterin anomaliler uzun zamandan beri gebelik kayıpları ve kötü obstetrik sonuçlarla ilişkilendirilmiş ancak genellikle infertilite ile net bir ilişkilendirme yapılamamıştır. Uterin anomalilerin infertil kadınlardaki oranı % 2- 4 arasındadır.<sup>119 120</sup> Habituel abortus tanılı kadınlarda yaygınlığı % 13 lere kadar ulaşmaktadır. İnfertilite tedavilerinde genellikle çoğul gebelik riski taşıdığından, uterin anomaliler önem kazanır.<sup>57</sup> Uterin anomalilerin sıklıklarına bakıldığında en sık uterin septum akla gelir (% 35). Bunu % 26 ile bikornat

uterus, % 18 ile arkuat uterus ve %8 iuterus didelfus ile takip eder. <sup>120</sup> Düşüklerin yanı sıra septat uterus intrauterin gelişme geriliği, malprezentasyon, erken doğum ile de ilişkilendirilmiştir. <sup>57 120</sup>

Uterin septum kesin tedavisi primer olarak septoplasti gerektirmesede tedavi edilmemiş kadınlarda gebelik öyküleri kötü olarak bulunmuştur (% 80 gebelik kaybı, % 10 preterm doğum, % 10 term doğum ). Gebelik kayıplarının çoğu ilk trimesterdedir (% 65) ve cerrahi uygulandıktan sonra sonuçlarda (% 80 term doğum, % 15 gebelik kaybı) düzelme görülmüştür. <sup>121</sup> Geçmişte uterin septumlu hastaların tedavisinde kullanılan laparotomik metroplasti uygulamaları, postoperatif adezyon oluşumuna neden olmaktaydı. Bu adezyonlar gebelik oluşumunu engelleyecek veya daha sonraki gebeliklerin sezaryen ile sonuçlanmasına neden olabilecekti. Endoskopik yöntemlerin gelişmesiyle beraber, ofis Histereskopi ofis ortamında uygulanabilen, düşük mortalite ve morbidite oranlarına sahip, hızlı, pratik bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır. <sup>57</sup>

Diğer bir uterin faktör ise leiomyomlardır. Benign düz kas tümörleri olan leiomyomlar boyutları ve yerleşimlerine bağlı olarak implantasyonu olumsuz etkileyebilir. <sup>122</sup> Leiomyomlar reproduktif dönemdeki kadınlarda %20-40 oranında görülebilir. İnfertil hastalar arasındaki oranı %10 civarlarındadır. <sup>123 124</sup>

Myomların infertilite oluşum nedenleri;

- 1) Serviksin anatomik olarak yer değişimi sonucunda sperm geçişinin azalması
- 2) Uterin kavitenin şeklinin bozulması veya kavite hacim değişiklikleri ile sperm transportunda olumsuzluklar
- 3) Tubal ostiumların çevresinde yerleşmesi nedeniyle tubal tıkanıklık
- 4) Adneksiyel anatomiye bozması sonucu ovumun fimbriyalar tarafından tutulumunun engellenmesi
- 5) Kavite basısı nedeniyle veya uterin kontraksiyonlardaki değişiklikler nedeniyle sperm veya fertilize olan ovumun transportunda olumsuzluklar
- 6) Uterusun fokal olarak kanlanma bozukluğu nedeniyle implantasyon bozulması olarak sıralanabilir. <sup>80</sup>

Myomların infertiliteye etkisini en iyi gösteren çalışmalar, myomu olan ve olmayan infertil kadınlardaki IVF sonuçlarından elde edilmiş olup, infertilite ve gebelik oluşum oranları submukoz myomlarda düşük iken, endometrial kaviteye bası yapmayan ve 5-7cmlik büyüklüğü olan orta boyutlardaki intramural ve subseroz myomlarda normaldir.<sup>125</sup><sup>126</sup><sup>127</sup><sup>128</sup> Sonuç olarak asemptomatik intramural myomu olan infertil kadınlar hakkındaki karar en zor klinik yaklaşımdır. Hastanın bu kararı verirken over rezervi, infertilite süresi ve yaşı göz önünde bulundurulmalıdır. Submuköz myomlarda ise cerrahi genellikle histeroskopik olarak yapılır. Histeroskopide morbidite düşüktür ve açık cerrahiye göre riskler daha az olmaktadır. İntramural veya subseröz myomlardaki yaklaşım ise laparoskopi ve laparotomik myomektomidir.<sup>43</sup><sup>57</sup>

Uterin faktörlerle ilgili bir diğer konu ise uterin yapışıklık yani Asherman sendromudur.<sup>129</sup><sup>130</sup> Travma sonrası endometrium bütünlüğünü bozacak, damarlanması ve fonksiyonunda bozulma yapacak herhangi bir işlem yapışıklıklara yani asherman sendromuna neden olabilir. İntrauterin adezyonlar genellikle asemptomatik olsa da görülen semptomları; menstrüel bozukluklar (hipomenore, amenore ve dismenore) ve pelvik ağrının yanı sıra; tekrarlayan gebelik kayıpları, infertilite ve plasenta accreta etyolojisinde yer almaktadır.<sup>129</sup><sup>130</sup> Gebeliğin özellikle postpartum döneminde yapılan müdahaleler daha hassas olan endometriumun hasarlanmasını kolaylaştırmaktadır ve endometriumun hasara uğraması sonucunda adezyon görülme riskini artırır.<sup>131</sup> Aynı zaman da enfeksiyonlar ve inflamasyonda adezyonların etyopatogenezinde yer almaktadır.<sup>132</sup><sup>133</sup><sup>134</sup> Genellikle olguların %90 kadarı doğum sonrası missed abortus, inkomplet abortus veya gestasyonel trofoblastik hastalık sonucunda küretajı ya da sezeryan veya vajinal doğum sonrası restlerle ilişkilendirilmiştir.<sup>135</sup> Geri kalan yüzde 10' luk kısmı ise uterin leiomyoma için yapılan abdominal veya histeroskopik myomektomiler sonrasında, uterin anomaliler nedeniyle yapılan septum rezeksiyonları veya metroplastinda sonrası veya endometrial polip eksiyonları sonrasında karşımıza çıkmaktadır. Genital tüberküloz gibi kronik enflamatuar ve enfeksiyöz durumlara yol açan hastalıklarda da intrauterin adezyonlar görülebilmektedir. Elektif küretajlar sonrasında nadir de olsa asherman sendromu görülme riski mevcuttur.<sup>43</sup><sup>57</sup>

Asherman sendromu düşünülen hastalarda HSG ve sonohisterografi ile tanı doğrulanmalıdır. Her iki metodunda özgünlük ve duyarlılığı %80 civarındadır. Bu yöntemler etkili tarama yöntemleri olsa da histeroskopinin adezyonların lokalizasyonu ve

yayılımını göstermedeki başarısı daha yüksektir ve aynı zamanda tedavi olarak kullanılabilir. <sup>136</sup>

Asherman sendromu tanısında altın standart kabul edilen histeroskopi; kaviter adezyonların tedavisinde tercih edilen metottur. Histeroskopik adezyolizis mekanik küretajdan daha güvenilir ve etkindir. Mukozal adezyonlar çevre doku ile benzerlik gösterdiğinden adezyolizis daha kolay iken; fibromuskuler ve bağ dokudan oluşan adezyonlar yoğun ve dens olduğundan mekanik olarak açılması ve adezyolizis yapılması gerekmektedir. <sup>43 57</sup> Birçok sınıflama sistemi önerilen bu konuda herhangi bir ortak konsensusa varılamamıştır. Adezyolizis mekanik olarak yapılmasının yanı sıra, elektrocerrahi ve lazer gibi yöntemlerle direkt gözlem altında adezyolizis işlemi uygulanabilir. Adezyolizis işleminden sonra yeniden adezyon oluşmaması için ilaçsız rahim içi araçlar yada balon kateterler kullanılmasında yarar vardır. Aynı zamanda yeniden epitelizasyon içinde konjuge östrojen ve progesterinler tedavide kullanılmaktadır.

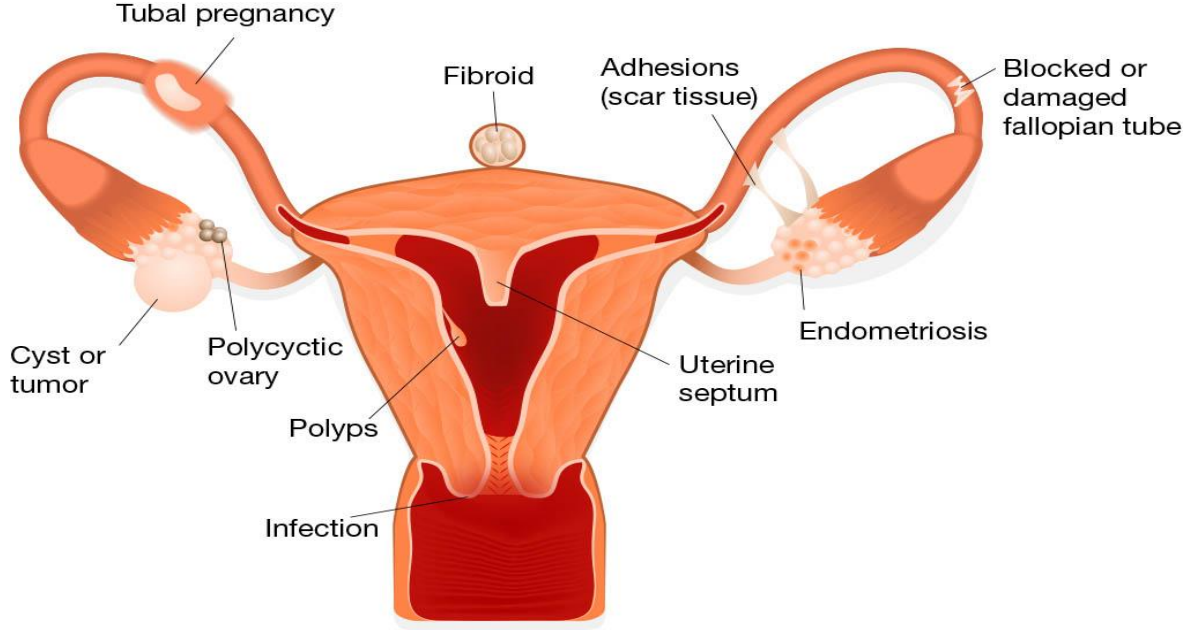
Bir diğer faktör olarak uterin kaviteye doğru uzanım gösteren, kanlaması olan, saplı veya sapsız formları olan endometrial büyümeler; endometrial polipten söz etmek gerekir.

<sup>57</sup> Sık rastlanılan endometrial polipler fertilitiyi olumsuz etkilemektedir. <sup>43</sup>

Etyopatogenezinden sorumlu tutulan mekanizmalar ise endometrial hiperplazi, endometrial dokunun gen mutasyonu ve aromatazın aşırı ekspresyonu olduğu düşünülmüştür. <sup>137</sup>

<sup>138</sup>Tanıda en yardımcı yöntem sono ultrasonografi ile endometrial kavitenin görüntülenmesidir. Tabi bu yöntemde submüköz myomlarla ayırıcı tanısı önemlidir. <sup>43 57</sup>

Histeroskopik polipektomi sonrası infertil hastalarda fertilité sonuçları çelişkilidir. Bununla birlikte 2 cm'nin üzerinde endometrial polipi olan infertil kadınlarda yapılan bir çalışmada IVF sonuçları tedavi edilen ve edilmeyen kadınlarda benzer çıkmıştır. <sup>139</sup> İnfertil kadınlar arasında sıklığı yaklaşık % 3-10' dur. <sup>140</sup> Endometriozisi olan kadınlarda endometrial polip olasılığı daha yüksektir. <sup>141</sup> Poliplerin tanısında HSG veya transvajinal ultrasonografi ile kullanılabilir. <sup>43</sup> Mevcut kanıtlar ışığında endometrial polipi olan infertil kadınlara tedavi önerilmektedir. <sup>57</sup> Bununla birlikte semptomatik kadınlarda da histeroskopik değerlendirme ve tedavi tercih edilebilmektedir. <sup>57</sup>



Şekil 7: İnfertilite nedenleri (2015, Wright State Physicians)

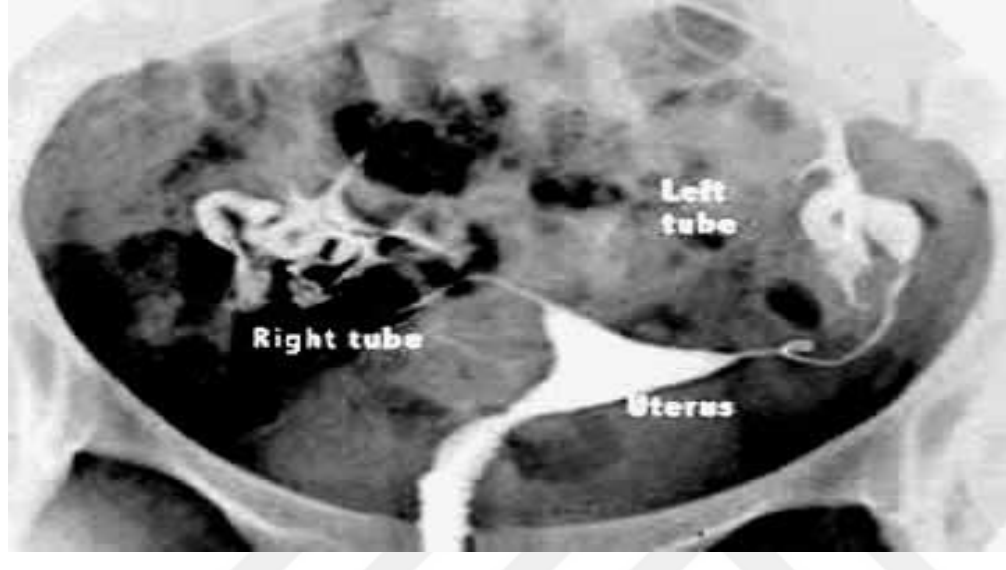
Bir diğer nadir ama önemli infertilite nedeni ise kronik endometrittir. Servisit ve persiste eden bakteriyel vajinosisi gibi semptomatik alt genital sistem enfeksiyonları olan kadınlarda subklinik endometrit görülmesi olasıdır.<sup>142 143</sup> Müköpürülen servisit etkeni olan Chlamydia (*C. trachomatis*) ve mycoplasma (*M. genitalium*) enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiş olup; her iki organizma da tubal nedenli infertilitede önemli rolü bulunup kronik endometrite neden olmaktadır.<sup>144 145 146</sup>

Uterin faktörlerin değerlendirilmesinde, kaviter lezyonların saptanmasında genellikle transvajinal ultrasonografi, histerosalpingografi ve histeroskopi kullanılmaktadır.<sup>43</sup>

Kronik pelvik ağrı veya dismenore gibi spesifik olmayan semptomlar tubal kaynaklı infertilite nedeni olabilir. Adezyonlar nedeniyle tubal hareketler etkilenmekte, ovumun alınması veya fertilize olan ovumun taşınmasında sıkıntı yaşanabilir.<sup>43</sup> Tubal ve peritoneal infertilite de en sık görülen infertilite nedenleri arasında olup, infertil hastaların yaklaşık üçte birinde görülmektedir. Pelvik inflamatuvar hastalık (PID) öyküsü, septik abortus, endometriozise bağlı inflamasyon, rüptüre apandisit, tubal cerrahi veya diğer cerrahi nedenli travmalar ve de ektopik gebelik gibi hastalıklarda tubal hasar nedenleri olarak

düşünülebilir.<sup>43</sup> Bunların arasında PID; tubal nedenli infertilite ve ektopik gebeliklerin en sık nedenidir

**Şekil 8:** Tubal nedenli infertilite değerlendirilmesinde histerosalpingografi  
2016, Advanced Fertility Center Chicago



İnfertil kadınlarda tubal geçişi değerlendirmek için kullanılan tanısal testler histerosalpingografi ve laparoskopidir. Uterin kavite ve tubal lümen değerlendirmede histerosalpingografi ile iyi sonuçlar alınırken laparoskopik cerrahi bizlere bilgi vermez. Ancak tubal infertilite nedenine yönelik araştırmada yani adezyon, endometriozis ve ovaryan patolojileride içeren pelvik anatomi bozan durumlarda da laparoskopi bilgi vermektedir.<sup>43 57</sup>

### 2.2.3 Over Rezervi ve Azalmış Over Rezervi

Kadınlarda doğum sonrası yaşla beraber mevcut ovum sayısı ve kalitesi giderek azalır, menopozla ovumlar tükenir. Bayanlarda genelde bu doğal süreç olsada, bazı durumlarda reproduktif dönem kadınlarda gözüküp infertiliteyi etkilemesi sonucu klinisyenleri over rezervin araştırılmasına itmiştir. Günümüzde infertilite değerlendirilmesinde önemli basamaklardan birini oluşturmaktadır.<sup>57</sup> Overdeki rezervin patolojik olarak erken azalmasının mekanizması bazı durumlarda açıklanamamıştır. Açıklanan durumlarda ise çevresel faktörlerin etkisiyle oluştuğu düşünülen oksidatif hasar ve hormonal instabilitenin folikülleri atreziye götürdüğü ve böylece infertilite nedeni olabileceği düşünülmüştür.<sup>147</sup>

Sonuç olarak over rezervi iyi olan kadınlarda fertilité olasılığında artma, over rezervi azalmış olan hastalarda ise fertilité olasılığında azalma hatta infertilite olmasının kaçınılmaz olduğunu düşünülmektedir. Azalmış over rezervi, son 20 yıldır araştırmaların giderek yoğunlaştığı ve infertilitenin giderek artan önemli bir sebebidir.<sup>57</sup>

Over rezervi, overlerde follikülogenez ve steroidogenez fonksiyonunu yerine getirecek folliküllerin sayısını, kalitesini ve yeterliliğini tanımlamaktadır. Embriyolojik olarak over rezervindeki azalma intrauterin dönemde yaklaşık olarak 20. gebelik haftasından itibaren başlamaktadır. Göç sonrasında hızlı bir şekilde mitoz ile çoğalan oogonların çoğalması durmakta, depolar doğum sonrasıyla beraber başlayarak yenidoğanlarda 1-2 milyon civarında, sonrasında puberte başlangıcında 300-400 bin civarına kadar azalmaktadır. Menstürel sikluslarla her siklusta yaşlaşık 800-1000 folikül atreziye uğramaktadır. Oositlerin kayıp hızı kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Tabi belli faktörler tanımlanmasına rağmen her over rezervi azalmış olan kadın, risk faktörü taşımamaktadır ve prematür kaybı destekliyecek neden bulunamamaktadır.<sup>148 149</sup> Genel olarak artmakta olan fertilité yaşı nedeniyle over rezervi primordiyal folliküllerin apoptotik kaybına bağlı olarak, üreme yeteneğinde de azalmalar son yıllarda artan bir sorundur.<sup>43 57</sup>

Sadece yaşa bağlı sayı azalmamaktadır. Kabaca overin yaşlanması olarak tarif edilen bu durumda fertilize olacak oosit kalitesi düşmekte, fertilizasyon ve implantasyon şansıda azalmaktadır. Buna ek olarak embriyoda kromozomal anomali olasılığı artmakta, bunun sonucunda sağlıklı fetüs ve buna bağlı gebelik kaybı riski artmaktadır. Zahmetli ve pahalı bir infertilite tedavi programına girmeden önce over rezervinin bir tarama testi ile değerlendirilmesi giderek önem kazanmaktadır.<sup>150</sup>

Birçok araştırmada prematür over yetmezliği etyolojisine yönelmiştir ve birçok teori öne sürülmüştür. Overde bulunan granuloza hücrelerine karşı oluşan otoantikolar, anjiogenesis de azalma veya bozulma, apoptotik mekanizmalardaki patoloji bunlardan başlıcaları olmaktadır. Genetik faktörlerde önemli olup, aile bireylerindeki öyküde over rezervinin tahmininde etkili olabilmektedir. Bazı hasta gruplarında prematür over yetmezliği olanlarda sayısal ve yapısal kromozomal anomali görölme sıklığı artmış olduğu görölmektedir.<sup>43 57 74</sup>



Risk faktörleri tanımlanacak olursa en başlıca akla geleni yaş riskidir. Kadınlardaki son yıllardaki gebelik yaşı artmaktadır. Bunun başlıca nedeni olarak iş veya eğitim anlamında kariyer yapma isteği nedeniyle doğum yaşını ertelenmesi olarak görülmektedir. Bunun yanında evlenme yaşında gecikmeler bir diğer sebep olarak görülmektedir.<sup>57</sup> Overler reproduktif çağın sonuna doğru, menstrüel siklusda oluşan ovumlar yaşlı ve düşük kaliteli olarak elde edilir.<sup>151</sup>

Yaş	Sigara kullanımı
Geçirilmiş over cerrahisi	Latent veya prematur over yetmezliği
Şiddetli endometriosis	Daha önce yardımcı üreme tekniklerine kötü yanıt
Obezite	Beslenme alışkanlıkları
Çevresel Faktörler	Kullanılan ilaçlar
Anatomik bozukluklar	Enfeksiyonlar

Son yıllarda over rezervini saptamaya ve rezervinin korunmasını sağlayarak reproduktif dönemin olabildiğince uzatılmasına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar doğrultusunda bazı testler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu testler tanı testinden çok tarama testi olup, risk altındaki bireylerin saptanması amaçlanmıştır.<sup>57</sup> Over rezervinin tayini gebelik edilmesi olasılığı ile ilgili fikir vermekte, gecikmiş tedavilerin önlenmesi, gebelik planlanmasının doğru bir şekilde yapılması ve gerekiyorsa iptal edilerek maddi ve manevi zararların önlenmesi sağlayabilmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca IUI ve IVF hasta uygulamalarında amaçlanan sayıda folikül gelişiminin sağlanması ve OHSS gelişmesinin önlenmek için uygun tedavi protokolleri ile kullanılan ilaçların dozunun ayarlanması için de kullanılmaktadır.<sup>43 57 74</sup>

Literatürde over rezervinin değerlendirilmesi için yaş, klomifen sitrat testi, bazal FSH, FSH/LH oranı, bazal E2, over volümü, Antimüllerian hormon gibi over fonksiyonlarını

indirekt olarak gösteren çeşitli parametrelerle birçok çalışma bulunmaktadır. Bu testlere göz atılacak olursa ilk olarak FSH ve LH' dan söz etmek gerekir. Klinik uygulamada reproduktif dönemde üreme ile ilgili sorunlarda en erken gösteren FSH düzeylerinden bahsetmek gerekir. Kolay uygulanması ve basit olmasının yanı sıra maliyeti de düşük bir testtir. Oosit fonksiyonunda kontrol, parakrin ve endokrin faktörlerin birbiri ile kontrollü bir şekilde çalışmasıyla oluşur. Oosit gelişimini sağlayan ve bu gelişimin devamını sağlayan temel faktörler FSH ve LH olmakla beraber bunlara ek olarak, interkolin A, inhibin, aktivin, growth faktörler, steroidler, oosit maturasyon inhibitörü gibi lokal faktörlerde çeşitli mekanizmalarla etki oluşturur.<sup>152</sup>

Serum FSH düzeyleri siklus içinde oluşan variabiliteleri nedeniyle bakılması için optimum günler olarak siklusun 2-5 günleri arası yani erken foliküler faz dönemi olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda siklusun 3. Günü FSH düzeyleri, FSH/LH oranları ile yardımcı üreme teknikleri gebelik sonuçları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Siklusun 3. günü FSH düzeylerindeki artışla korele olarak toplanan oosit sayı ve kalitesinde azalma olmakla beraber gebelik elde etme ve canlı doğum oranında da azalma olmuştur.<sup>153 154</sup>

FSH seviyelerinde belirgin bir şekilde değişkenlik olduğundan ilk seçenek olarak test tekrarı rutinde yapılmaktadır. Tekrar edilen test sonucu da aynı düzeyde geliyorsa eğer sonuçlarla alakalı kötü prognostik değer olarak görülebilir.<sup>155</sup>

Bir başka over rezervi değerlendirilmesiyle ilgili test bazal serum östradiol ölçümüdür. Testin dezavantajı ise tek başına anlamlı sonuçlar elde edilemeyişidir.<sup>156</sup> Bazal FSH ile kombine edildiğinde anlamlı olabilmektedir. Eğer bakılan testlerde FSH normal ancak östrodiol yüksek ise, ovulasyon sitümülasyon sonucu kötü prognostik değere sahip olup başarı gebelik etme şansı düşüktür.<sup>157</sup> Bazal FSH ve bazal östradiol seviyeleri birlikte yüksek ise bu risk daha da artmaktadır.<sup>57</sup>

Over rezervini değerlendirilmesi için kullanılan bir diğer ve duyarlı test klomifen sitrat uyarılma testidir. Testin genel prensibi olarak siklusun 5-9. günlerinde 100 mg/ gün klomifen sitrat verilmesi sonrasında siklusun 3. gününde FSH ve östradiol bakılması ve sonrasında adet 10. gününde FSH düzeyleri bakılması basamaklarına dayanır.<sup>57</sup> Azalmış over rezervi olan kadınları saptamada tek başına bazal FSH ve östradiol

düzeylerinden çok bariz olarak artmış 10. gün FSH düzeyi daha anlamlıdır.<sup>158 159</sup> Sonuç olarak klomifen ile uyarılmış FSH değerleri, bazal FSH' dan daha anlamlıdır.<sup>160</sup>

İnhibin B ise antral foliküllerden foliküler fazda granüloza hücreleri tarafından salınmaktadır. Bu nedenle büyümekte olan over rezervinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Ancak siklus durumuna göre çabuk etkilendiğinden güvenilir bir test değildir.

Antimüllerian hormon preantral ve küçük antral foliküllerden sentezlendiğinden, düzeyleri gonodotropin etkinliğinden bağımsız olduğu için az değişkenlik gösteren bir testtir. Küçük antral foliküller granüloza hücrelerinden zengin ve kanlanması fazla olduğundan daha AMH sentezi daha fazladır.<sup>161</sup> Sonuçta antral folikül sayısı ile AMH düzeyleri doğru orantılıdır.<sup>162</sup>

Düşük AMH seviyeleri gebelik elde edilmesi ve canlı gebelik elde edilmesinde olumsuz sonuçlar elde edilmesiyle koreledir.<sup>163</sup> Azalmış over rezervi riski az olan hastalarda 2.5-2.7 ng/dl değerleri klinik olarak anlamlı bulunmuştur. Gelecekte umut verici bir test olan AMH için tek dezavantajı gebeliği öngörmedeki yetersizliğidir.<sup>57</sup>

Antral folikül sayısı over rezervinin dolaylı ama yararlı olan bir testidir. Transvajinal USG ile 2-10 mm boyutlarındaki antral foliküllerin ölçümüne dayanır.<sup>164</sup> Reprodüktif çağın sonlarına doğru azalan folikül sayısı ile beraber over rezervinin tahminine kadar geniş bir spektrumu vardır. Düşük antral folikül sayısı olan hastalarda stimülasyona cevap over rezervi tahmininde anlamlıdır.<sup>57</sup>

Keza over hacmine bakarak da over rezervi hakkında fikir elde edinilebilir. Bilindiği üzere menopozal dönemle birlikte over rezervi azaldığı gibi hacminde de azalmalar olur. Her hastada hacimleri değişken olmakla beraber bazı hastalıklarda da özellikle endometrioma ve polikistik over sendromunda da boyutları artığından optimum bir aralık belirlenememiştir.<sup>165</sup> Hacim ölçümleri ile genellikle toplanan folikül sayısı korelasyon gösterir. Ancak bu durum gebelik ile benzer ilişkisi bulunamamıştır. Genel olarak over hacminin infertil hastada kullanımı sınırlıdır.<sup>57</sup>

## 2.2.4 İn Vitro Fertilizasyon

Yardımcı üreme teknikleri oositlerin vücut dışarısında manipulasyonlarını içeren tekniklerdir. Bunların en yaygın ve ilk olanı in vitro fertilizasyondur. IVF temel olarak overlerin ekzojen olarak verilen gonadotropin ile stimulasyonu sonrasında oositlerin toplanması ile başlar. Ardından toplanan oositler laboratuvar ortamında fertilize edilir. Oluşan embriyolarda transservikal olarak transfer edilmesidir.<sup>166</sup>

ABD ve Avrupa ülkelerinde canlı doğumların yaklaşık %1-3 ü IVF ile elde edilen gebelikler sonucunda oluşur. İlk IVF canlı doğumundan 30 yıl geçen süreç içerisinde, yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmeler meydana gelmiştir; bunlar ejakulat ile (ICSI), mikrocerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu veya testiküler sperm ekstraksiyonları son olarak da preimplantasyon tanı ve embriyo tutunma tekniğini içermektedir.<sup>57</sup>

Tubal infertilite	Azalmış over rezervi
Endometriozis	Diğer nedenler
Erkek faktör	
Ovulasyon bozukluğu	
Açıklanamayan infertilite	

Genel olarak tubal faktör infertilite için tasarlanmış olsada IVF, birçok altta yatan hastalıkları aşabilecek bir tedavi biçimidir.

Yardımcı üreme tekniklerine başvuran hastaların yaklaşık %9 u tubal tıkanıklık hastalarıdır. Distal ve proksimal olmak üzere ikiye ayrılan tubal faktör infertilite de temel olarak şiddetli ve geçiş olmayan tubalardan söz edilmektedir. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi olmasına rağmen gebelik elde etmekte IVF daha başarılıdır. Şiddetli distal tubal obstrüksiyonda, cerahi ile düzeltilemeyen distal obstuksiyonda ve tubal sterilite operasyonu sonrasında yeniden gebelik isteminde IVF başarılı bir yöntemdir.<sup>43 57</sup>

Hidrosalpenks varlığında tubanın eğer uterin kaviteye açılımı mevcut ise IVF başarısını olumsuz etkilemektedir. Bunun nedeni olarak implantasyonu engellenmesi, embriyo ve endometrial dokuyu tahrip etmesi olarak düşünülmüştür. Burada hidrosalpenks olan

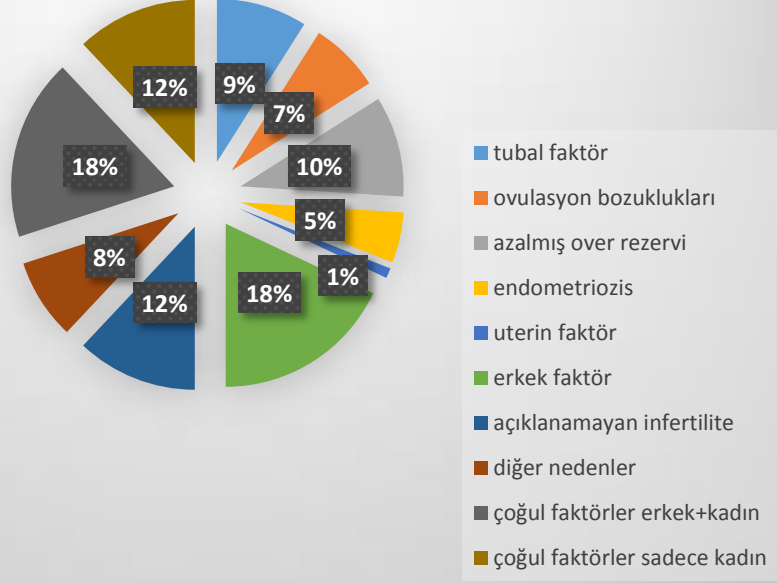
tubanın laparoskopik veya laparotomik olarak alınması IVF başarısı için önem arz eder.<sup>167</sup>  
168

Bir başka önem arz eden infertil kadınlardaki endometriozis varlığıdır. Yardımcı üreme tekniği kullanılan hastalarda % 5 civarında endometriozis varlığı söz konusudur.<sup>169</sup> IVF tedavisi ile tubaların anatomik bozukluğuna yol açan endometriozis etkin olarak aşılmaktadır. Uygun oosit seçimi ve azalmış endokrin cevabı olan infertil kadınlarda bu durum daha komplike bir hal alır.<sup>170</sup> Burada komplike ileri evre endometriozisli hastalarda iki tedavi seçeneği cerrahi ve İVF önem arz eder. En önemli nokta ise cerrahi tedavi seçeneği tercih edilecek hasta grubunun iyi belirlenmesi ve dikkatli bir cerrahi tedavi uygulanmasıdır. Cerrahi sonrası fazla alınan over dokusu veya kanlanmanın bozulması sonucunda mevcut olan over rezervi azalabilmektedir.<sup>171</sup>

Ovulasyon bozukluğuna neden olabilecek hastalıklar önemli bir infertilite nedenidir. Bu hastalıklar polikistik over sendromu, hiperprolaktinemi, tiroid hastalıkları, ve hipogonadotropik hipogonadizm akla gelir. Burda ovulasyon indüksiyonu ile bu sorunlar aşılabılır. Tek dez avantajı ise ovaryan hiperstimulasyon sendromudur. Yardımcı üreme tekniğine başvuran hasta gruplarının %7 sinde ovulasyon bozukluğu saptanır.<sup>169</sup>

Açıklanamayan infertilite hastalarında ise tedavi sırası değişkenlik göstermektedir. Bazı merkezlerde IVF ilk seçenekken, bazı merkezlerde ise diğer yardımcı üreme teknikleri ilk sırada yer almaktadır. Yardımcı üreme tekniklerinin %12 lik kısmını kapsayan açıklanamayan infertilite hastalarında fertilizasyon bozukluğunun ana nedenlerden biri olması nedeniyle IVF daha ön planda tedavi seçeneği olarak yer alır.<sup>57</sup>

**tablo 3: yardımcı üreme tekniklerinin nedenleri**



Over rezerv bozukluklarının % 10 gibi önemli oranı yardımcı üreme tekniklerinden fayda görmektedir. Burada yaşa bağlı veya erken over yetmezliği olan hastalar nedeniyle kesin sonuca gidebilmek için yardımcı üreme tekniklerden IVF ön plana çıkar. <sup>169</sup> Diğer IVF endikasyonları ise kanser veya diğer medikal hastalıklarda acil fertilizasyon gerektiren durumlar, konjenital anomali veya histerektomi sonrası uterusun yokluğu nedeniyle taşıyıcı anne kullanılacak hastalar, genetik hastalıklar nedeniyle preimplantasyon tanı gerektiren durumlar ve oosit kriyopreservasyon gerektiren durumlar şeklinde sıralanabilir. <sup>57</sup>

Tüm bunların ışığında İVF planlanan hastayı değerlendirilmek için belli istenecek tetkikler mevcuttur. Bunlar over kapasitesi testleri, spermiyogram, enfeksiyöz hastalık taraması, uterusun değerlendirilmesi için transvajinal ultrasonografi ve histerosalpingografidir. <sup>57</sup> İVF tedavisi sonrasında canlı doğum olasılığı hemen hemen her grupta artmaktadır. Uygun hasta grubunun seçimi ve hastalığın primer nedeninin tahmini en önemli basamaktır. <sup>43 57</sup>

<b>Tablo 4: Tanıya göre canlı doğum oranları, 2007 <sup>57</sup></b>	
<i>İnfertilite Tanı Grubu</i>	<i>Canlı doğum/ siklus</i>
Ovulasyon bozuklukları	%37.3
Erkek Faktör	%35.8
Endometriozis	%34.3
Açıklanamayan infertilite	%31.8
Tubal faktör	%30.7
Çoğul faktörlerde kadın ve erkek	%27.5
Uterin faktör	%26.9
Çoğul faktör, sadece kadın	%23.4
Azalmış over rezervi	%15.3

## 2.3 Sigara

Sigara; “Nicotina Tabacum” adı verilen bir tür tütün bitkisinin yapraklarının kurutulması ile elde edilir. Sigara içimi sırasında tütün yapraklarının yanması ile çok sayıda yanma ürünü ortama çıkmaktadır. Sigaranın dumanı içerisinde yaklaşık olarak 4700 ün üzerinde bileşen mevcuttur. Sigara dumanının alkaloid içeriğinin en az %95’ inde nikotin bulunmaktadır.<sup>172</sup> Bu bileşenlerin çoğu aktif farmakolojik olup çoğu toksik, mutajenik ve karsinojeniktir. 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.<sup>1 2 3</sup> Dünya genelinde yetişkin yaş grubunda erkeklerin yaklaşık yarısı, nüfusun da altıda biri sigara kullanmaktadır. Türkiye tütün üreten bir ülkedir ve dünyanın toplam tütün üretiminin %1,7’sini karşılamaktadır.<sup>173</sup>

Arsenik	Nikotin
Diklorodifenil trikloroethan	Aseton
Toluen	Bütan gazı
Radon	Metanol
Siyanid	Polonyum
Dibenzakridin	Naftalin
Amonyak	Propilen Glikol
Kadmiyum	Karbon monoksit

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. Sigaranın infertilite nedeni olabileceği uzun zamandır tartışılmaktadır.<sup>4</sup>

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, morbidite ve mortalitenin önlenemez majör nedenleri arasında sayılmaktadır. Sigara içme prevalansının tüm dünyada, özellikle üreme



çağındaki kadınlarda arttığı, ABD ve Avrupa'da bu yaş grubundaki kadınların 1/3'ünün sigara içicileri olduğu bildirilmektedir.<sup>7</sup>

### 2.3.1. Sigara Dumanı, Katran Fazı ve Gaz Fazı

Sigara inhalasyon yoluyla alınan bir maddedir. Burada başlıca inhale edilen dumana ana duman, bekleme esnasında çevredeki havaya karışan dumana, yan duman denilmektedir. Çevresel tütün dumanı ise ana duman ve yan dumanın birleşmesiyle oluşmaktadır. Çevresel tütün dumanının içeriğinde %85 oranında yan duman, %15 oranında ise ana duman bulunmaktadır. Düşünülenin aksine yan dumanda ana dumana göre daha yüksek konsantrasyonda bileşenler bulunmaktadır. Ancak ortam havasında daha büyük volüm içerisinde dilüe oldukları bilinmektedir.<sup>174</sup>

Sigara, aktif olarak içen kişinin sağlığını olumsuz etkileri olduğu bilinen bir gerçektir. Aynı ortamda bulunan diğer bireylere de birçok olumsuz etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Bu durum pasif içicilik olarak tanımlanmaktadır. İnhalasyon ile alınan yan duman, sigara içenler tarafından inhale edilen ana dumanda bulunan tüm karsinojenleri içermektedir ve filtre görevi gören sigara filtresinden geçmediğinden 100 katı fazla karsinojen ağırlığı bulunmaktadır. Pasif içicilerde de aterojenik lipoproteinlerin arttığı, antiaterojenik lipoproteinlerin azaldığı ve koroner arter hastalığına bağlı ölüm oranının yüksek olduğu saptanmıştır.<sup>175 176</sup> Nitrozaminler yan dumanda ana akım dumanına göre 10-200 kat daha yüksektir.<sup>172</sup>

**Tablo 6: Sigaradaki karsinojenik ve toksik ajanlar**

<b>Bilinen Karsinojenler</b>	<b>Olası karsinojenler</b>	<b>Toksik ajanlar</b>
2-Naftilamin	Formaldehid	Karbonmonoksit
4-Aminobifenil	Hidrazin	Amonyak
Benzen	Anilin	Nitrojen peroksit
Nikel	Kadmiyum	Akrolein
Polonyum 210	N-nitrozodietilamin	

Nikotin, sigaranın içinde bulunan tütünün yanmasının distilasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Damlacıklar tarzında nikotin ihtiva eden katran (TAR) akciğere çekilerek

küçük hava yollarında ve alveollerde depolanır. Tütün dumanı küçük hava yollarına ve alveollere ulaştığında hızlı bir biçimde absorbe olur. Uzun süre sigara içenlerde nikotinin yarılanma ömrü yaklaşık 20-24 saat civarındadır. Daha sigara içimi sırasında nikotinin absorpsiyon ile birlikte kan düzeyi hızlıca yükselmekte ve tepe noktaya ulaşmaktadır.<sup>177</sup>

Katran fazı kompleks ama aynı zamanda stabil bir karışımdır. Sigara dumanı 0.1 mm'den büyük çaplı partiküllerin %99.9' unu tutan "standart glass-fiber" filtresinden geçtiğinde filtrede tutulan kısmı katran fazı olarak tanımlanır. Katran fazı, kinon ve polisiklik aromatik hidrokarbon radikalleri gibi stabil radikallerin yanı sıra pek çok organik bileşiği içerir. Sigaranın katran fazındaki toksisitesi bulunan kinon/hidrokinon radikalleri oksijeni indirgeyerek süperoksit anyonu (O<sub>2</sub>-), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil radikali (OH) oluşumu ile oluşur.<sup>178</sup>

Sigaranın gaz fazı ise standart grass-fiber filtrenin içinden geçebilen kısmını ifade eder. Sigara dumanı gaz fazı katran fazına göre daha labildir. Sigaranın yanması nedeniyle oluşan karbon ve oksijen merkezli serbest radikallerinin konsantrasyonlarının yüksek olduğu bir içeriktir. Bu radikallerin ömürleri çok kısadır. Gaz fazının diğer önemli birleşeni ise azot monoksit (NO). Bu madde radikal oluşumuna sebep olmaktadır ve gaz fazında yüksek oranlarda bulunur.

### 2.3.2 Sigaranın İnfertilite Üzerine Etkileri

İnfertilitenin çevresel nedenlerinden biride sigaradır. Fertilite multiple komponentlerden oluşur ve herhangi bir çevresel faktörden kolaylıkla etkilenmektedir. Literatürde sigaranın fertilitayı etkilediğine dair kanıtlar mevcuttur.<sup>43 57</sup> Bazı çalışmalarda ise net bir etkisi gösterilememiştir.

Sigara kullanan kadınlarda, fertilizasyon oranının ve gebelik oranlarının düştüğünü bildiren çalışmalar bildirilmiştir. Aynı zamanda sigaranın kadınlarda erken menopoza ve ovaryan rezervin genç yaşlarda azalmasına neden olduğu görülmüştür.<sup>179 180</sup> Pasif sigara içiciliğinin olduğu kadınlarda da fertilizasyon oranlarının da sigara içenlerde görülen değerler kadar yüksek olduğunu bildirilmiştir.<sup>181</sup>

Sigara kullananlarda, kullanmayanlara göre konsepsiyona kadar olan sürenin uzadığı, fertilitenin düştüğü ve infertilite oranlarının arttığı görülmüştür. 12 ayın üzerinde konsepsiyon gecikmesi yaşayan kadınların oranı, sigara içenlerde %16.4 iken, sigara

içmeyenlerde %10.3 olarak ifade edilmiştir.<sup>182</sup> Sigara içen kadınlarda gelişen oosit sayısının etkilendiği gösterilmiştir. Oosit tüketimi üzerine yaş ve sigara etkileri belirgindir.<sup>183</sup> Sigara dumanındaki kimyasallar reproduktif fonksiyonları bozmakta ve follüküler yetmezliği hızlandırmaktadır. Bu kadınlarda FSH düzeyleri yüksek bulunmuştur.  
181

Sigara tubal fonksiyonları da bozmaktadır. Özellikle tubalarda mukozal silier aktiviteyi bozarak tubal faktör infertiliteye neden olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması bu hasta grubunda fazla olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda sigara içen bayanlarda pelvik inflamatuvar hastalık için risk faktörü olduğunu ve tubal fonksiyonları bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir.<sup>183</sup>

Sigaranın IVF’de fertilizasyon oranını düşürdüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur. Yine aynı çalışmada oosit sayısını azalttığı, gebelik oranlarını etkilediği ve düşük oranlarını arttırdığını bildirilmiştir.<sup>184</sup> Sigara içen kadınların gebe kalmak için içmeyenlere göre yaklaşık 2 kat fazla IVF siklusuna ve daha yüksek dozlarda gonadotropine ihtiyaç duydukları gösterilmiştir.<sup>185</sup>

Sonuçta, kadınlardaki sigara içme alışkanlığının over rezervlerinin düşürdüğünü ve erken yaşlardaki ovaryan stimulasyonuna karşı yetersiz cevap vermelerine yol açtığı gösterilmiştir.

## 2.4 Melatonin

Melatonin, başlıca pineal bezden sentezlenip salgılanan endojen bir hormondur. Pineal beze ek olarak over, lens, kemik iliği hücreleri, böbrek, adrenal bezler, timus, tiroid, plasenta dokularında, mast hücreleri gibi nöroendokrin karakterde olmayan hücrelerde ve eozinofilik lökositlerde, safra kanalı ve gastrointestinal sistemden de salgılanmaktadır.<sup>186</sup> Son yıllarda özellikle diffüz nöroendokrin sistemin bir parçası olarak kabul edilen APUD (Amine Precursor Uptake Deamin) hücrelerinde ve gastrointestinal kanaldaki enterokromaffin hücrelerinde de melatonin sentezi olduğu tespit edilmiştir.<sup>187</sup>

Melatonin, organizmada cinsel gelişimin kontrolü, immün yanıtın oluşturulması, yaşlanma, uyku ve ısı düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik olayda rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatoninin güçlü bir antioksidan olduğu ve serbest radikaller aracılığı ile meydana gelen oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir.  
188 32

Pineal bezin esas hormonu olan melatonin, triptofan aminoasitinden epifiz bezinde sentezlenir. Melatonin triptofan N-asetiltransferaz (NAT) enzimi ile serotonine dönüştürülür. Serotonin ise bir diğer pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz aracılığıyla melatonine dönüştürülür. Melatonin büyük kısmı karaciğerde olmak üzere böbrekte de metabolize olur. Melatonin ana metaboliti 6-hidroksimelatonin sülfatıdır (6-HMS). Melatonin 232 molekül ağırlığına sahip N-asetil-5-metoksitriptamindir. Melatonin sentezinin düzenlenmesi karanlık ortamda olmaktadır, bir diğer deyişle primer olarak gece saatlerinde olmaktadır. Melatonin plazma düzeyleri gün içerisinde değişkenlik göstermektedir. Melatonin saat 20.00-23.00 arası yükselmekte, saat 01.00-05.00 arası en yüksek değerlere ulaşır. İnsanlarda ekzojen olarak alınan melatoninin yarı ömrü yaklaşık olarak 20-60 dakikadır, yani kısadır.<sup>188</sup>

Melatonin yağ çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücelere rahatça girebilir. Bu nedenle melatonin etkileri sadece membranda olmamaktadır. Aynı zamanda sulu ortamda kısmen çözünmesi nedeniyle intrasellüler ortamda da etkilerinin oluşmasını sağlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar melatoninin çekirdekte yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının bulunduğunu göstermiştir. Bu bulgulara bağlı olarak melatonin etkilerinin tiroid ve steroid hormonlara benzer şekilde çekirdekteki

moleküler olaylarla olabileceği düşünülmüştür.<sup>189</sup> Melatonin hidrofilik özelliği olması nedeniyle kan-beyin bariyerini kolayca geçmektedir. Tüm subselüler kompartmanlara hızla diffüze olabilmektedir. Melatoninin serbest radikal bağlanma özelliği olduğundan yaşa bağımlı dejeneratif olayları engellemede yararlı olabileceği düşünülmektedir.<sup>190 191</sup> Anneden fetüse ve süt yoluyla yeni doğana geçebilir.<sup>192</sup>

Fizyolojik şartlarda yaşlanma ile sağlam hücrelerde apoptozis artmaktadır. Pineal bezden melatonin salgılanması azalmasına sekonder olduğu düşünülmektedir. Eksojen olarak verilen melatonin sayesinde apoptozisin inhibe olduğu ve yaşa bağlı sekonder hasarlı ve disfonksiyonel hücelere koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Yapılan son çalışmalar endojen antioksidan maddelerden en güçlüsünün melatonin olduğunu göstermiştir.<sup>190</sup> Tüm antioksidanlar ele alındığında (mannitol, glutatyon, vitamin E, C vb.) melatoninin en güçlü serbest radikal toplayıcılığı özelliği mevcuttur.<sup>191</sup> Özellikle yaşlanmaya bağlı immün yetersizliklerde immün yanıtı güçlendirici etkisi vardır. Pineal bezin, tümör büyümesini inhibe edici bir özelliği mevcuttur. Pineal bezin antikanser etkisi büyük oranda melatonine bağlanmıştır. Pinealektomi yapılmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada artan oksidatif hasar, dolaşımdaki azalmış melatonine bağlanmıştır.<sup>191</sup>

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Farmakoloji, Histoloji ve Embriyoloji, Biyokimya Anabilim Dallarının ortaklaşa yapmayı planladığı bir hayvan çalışmasıdır.

Çalışmamız 72 adet dişi Wistar-Albino sıçan üzerinde prospektif, randomize, deneysel bir çalışma olarak planlanmıştır. Sıçanlar 6 gruba randomize edilecektir:

**Grup I-** Oda havasına maruz kalacak kontrol grubu (n=12)

**Grup II-** Kronik olarak sigara dumanına maruz kalacak çalışma grubu (n=12)

**Grup III-** Oda havası+10 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

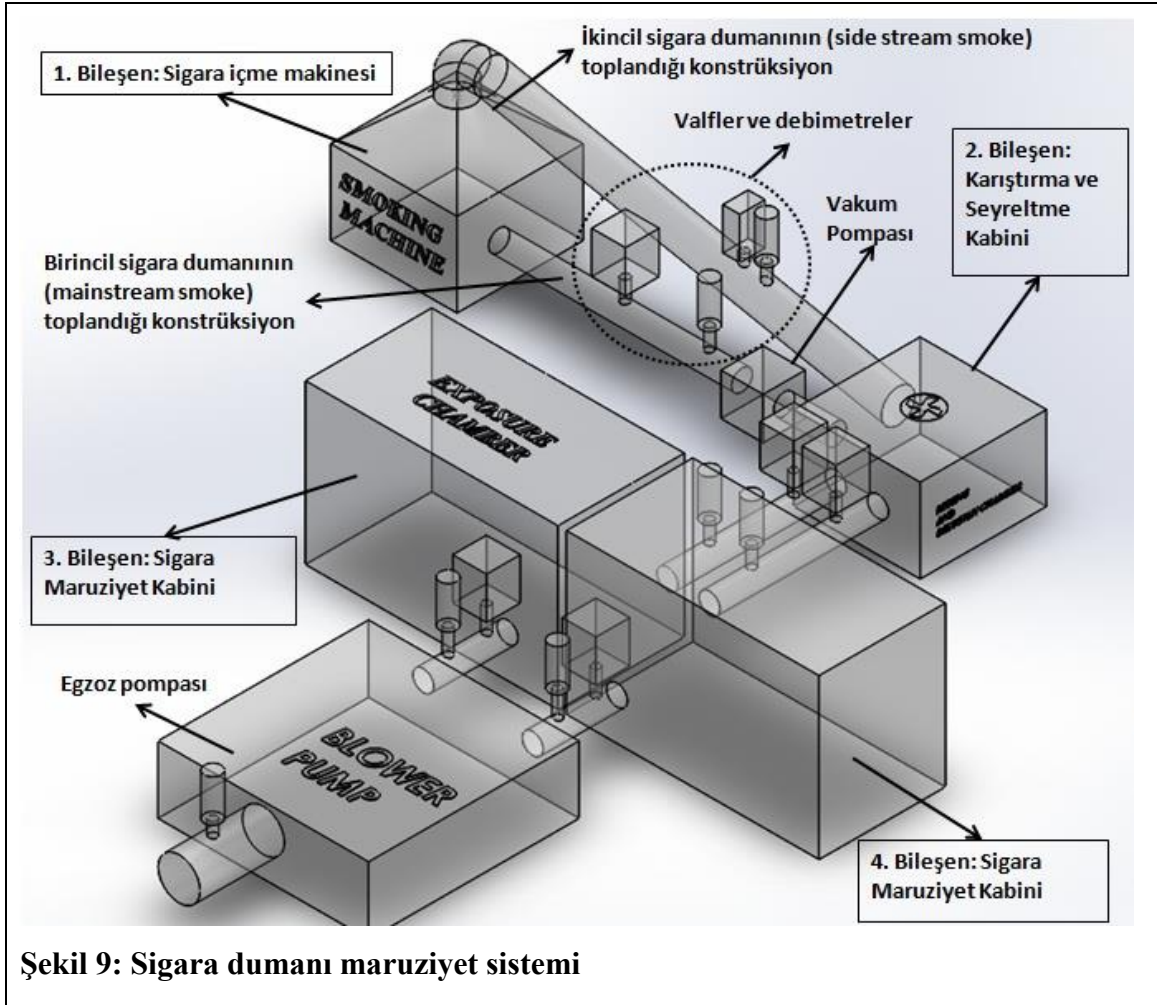
**Grup IV-** Oda havası+20 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

**Grup V-** Sigara dumanına maruziyet +10 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

**Grup VI-** Sigara dumanına maruziyet+20 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

Sigaraya maruz kalacak gruplarda, sigara maruziyet cihazı kullanılarak günde 2 kez 1'er saat süre ile günde toplam 10 adet Marlboro marka sigara kullanılacak şekilde (9.7 mg tar, 0.85 mg nikotin, 11.7 partiküllü materyal) toplam 45 gün süre ile sıçanların sigaraya maruz kalması sağlandı. Makinadaki her bir sigaraya maruz kalma siklusu, siklus başına 2 saniyelik 1 sigara puffı, bunu takip eden 28 saniyelik çekme süresi ile toplam 30 saniyelik bir süreden oluştu. Her bir sigara içme siklusunu 30 saniyelik taze hava puffı takip ettikten sonra akabinde sigara puffı siklusu yeniden başlatıldı. Oda havası alması planlanan gruplarda, oda havası aynı makineyle verildi. Melatonin uygulaması ise günde 1 kez ışıklar kapatılmadan 2 saat önce 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında subkütan enjeksiyon olarak yapıldı. Melatonin enjeksiyonu, 45 günlük sigara maruziyetinin son 15 günü gerçekleştirildi. 45 günlük sürenin sonunda, anestezi uygulanmış sıçanların kalbinden direkt kan numunesi alınarak oksidatif hasar parametrelerinin düzeylerinin ölçümü için Biyokimya Anabilim Dalı'na teslim edildi. Daha sonra servikal dislokasyonla sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen ooforektomi materyallerinden biri %10 formaldehit ile fikse edilerek Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na, diğer over ise dokuda oksidatif hasar parametrelerinin düzeylerinin belirlenmesi için Biyokimya Anabilim Dalı'na teslim edildi.

Çalışmamızda, deneysel çalışmalar için özel olarak tasarlanan sigara dumanı maruziyet sistemi (Smoke exposure system) kullanıldı.



Sigara maruziyet sisteminde, sigara makinasının amacı maruziyet kabinleri için ihtiyaç duyulan birincil ve ikincil sigara dumanının kontrollü bir şekilde üretilmesinin sağlanmasıdır. Bu bileşende ISO 3308:2012 (Routine analytical cigarette smoking machine – definitions and standard conditions) standardı ve FTC (Federal Trade Commission) metoduna uygun bir şekilde sigara yakılmakta ve sigara dumanları toplanmaktadır. ISO3308:2012, FTC metodu ve literatürde konu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde sigara maruziyet sistemleri için birincil sigara dumanının 2 lt/dk'lık hava akışı sağlayacak bir vakum ile sigaranın filtreli bölümünde çekilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu vakum işleminin dakikada bir kez 2 saniye süresince (puff time) gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Diğer bir ifade ile sigaradan 60 saniyede bir 2 saniye süresince (puff time) 2 lt/dk bir hava

debisi ile birincil sigara dumanının vakumlanarak toplanması gerekmektedir. Sigaranın filtre bölümünde 2 lt/dk'lık debideki bir vakum sigaradan yaklaşık olarak 1.05 LPM (litre/dakika) bir debi ile birincil dumanın çekilmesine olanak vermektedir.

## **HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANALİM DALI TARAFINDAN GERÇEKLEŞTİRİLEN ANALİZLER:**

### **Histolojik Uygulamalar**

Mikroskopik incelemeler için alınan over doku örnekleri %4'lük paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Elde edilen dokular çesme suyunda yıkandıktan sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafine gömüldü (Tablo 7).

**Tablo 7:** Histolojik Doku Takip Serileri

<u>Sıra No</u>	<u>Kullanılan Madde</u>	<u>Kimyasal Bekletilme Süresi</u>
1	%70 Etanol I	24 saat
3	%90 Etanol I	24 saat
5	%96 Etanol I	24 saat
7	%100 Etanol I	16 saat
8	%100 Etanol II	2 saat
9	Toluol çalkalama	1-2 dakika
10	Toluol I	15 dakika
12	Toluol + Yumuşak Parafin	45 dakika
13	Yumuşak Parafin	1 saat
14	Yumuşak Parafin + Sert Parafin	1.5 saat
15	Sert Parafin	3 saat
16	Bloklama	



## Kesitlerin Alınması ve Hematoksilen-Eozin Boyanması

Her bloktan 20 µm trim aralığı ile 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her lam üzerinde 1 kesit olacak şekilde ve kesitin alınma sırasına göre lamalar numaralandırıldı. Her bloktan alınan 4 µm kalınlığındaki seri kesitlerden oluşan lamalar etüvde bir gece 37 °C’de bekletildi. Daha sonra 60 °C’de 1 saat daha bekletilerek diğer aşamalar gerçekleştirildi. Son olarak ışık mikroskopunda inceleme için Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı (Tablo 8).

**Tablo 8.** Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi Basamaklarına Ait Uygulama Prosedürü

KİMYASAL MADDE	UYGULAMA SÜRESİ (dk)
<b>Ksilol I</b>	<b>20</b>
<b>Ksilol II</b>	<b>20</b>
<b>%100 Alkol I</b>	<b>5</b>
<b>%100 Alkol II</b>	<b>5</b>
<b>% 90 Alkol I</b>	<b>5</b>
<b>% 90 Alkol II</b>	<b>5</b>
<b>% 80 Alkol I</b>	<b>5</b>
<b>% 80 Alkol II</b>	<b>5</b>
<b>% 70 Alkol I</b>	<b>5</b>
<b>% 70 Alkol II</b>	<b>5</b>
<b>Distile Su</b>	<b>10</b>
<b>Hematoksilen</b>	<b>5</b>
<b>Akan Çeşme Suyunda Yıkama</b>	<b>10</b>
<b>Asit alkol</b>	<b>1-2 kez daldırıp çıkarma</b>
<b>Akan Çeşme Suyunda Yıkama</b>	<b>5</b>
<b>Eozin</b>	<b>3</b>
<b>Akan Çeşme Suyunda Yıkama</b>	<b>10</b>
<b>% 70 Alkol</b>	<b>5</b>
<b>% 80 Alkol</b>	<b>5</b>
<b>% 90 Alkol</b>	<b>5</b>
<b>% 100 Alkol</b>	<b>5</b>
<b>Ksilol I</b>	<b>20</b>
<b>Ksilol II</b>	<b>20</b>
<b>Lamların Entellanla Kapatılması</b>	

Bu işlemlerden geçirilerek boyanan doku kesitleri Olympus BX50 araştırma mikroskobu ile değerlendirildi.

### **İmmunohistokimyasal Yöntem**

Elde edilen parafin bloklardan 20 µm trim aralığı ile 4 µm kalınlığında seri kesitler poly-L-lysine ile kaplı lamlar üzerine yerleştirildi. Her lam üzerinde 1 kesit olacak şekilde ve kesitin alınma sırasına göre lamlar numaralandırıldı. Daha sonra lamlar immunohistokimyasal olarak boyandı. İmmunohistokimyasal boyama "Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi" kullanılarak gerçekleştirildi. Primer antikor olarak Anti-caspase 3 (abcam, dilusyon oranı: 1/500) kullanıldı (Tablo 9).

**Tablo 9:** Genel İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Sıra	Yapılan İşlem	İşlem Süresi
1	Deparafinizasyon (37 °C'de etüvde bekletme)	1 gece
2	Deparafinizasyon (60 °C'de etüvde bekletme)	1 saat
3	Ksilol I	10 dakika
4	Ksilol II	10 dakika
5	%100 Alkol	5 dakika
6	%90 Alkol	5 dakika
7	%80 Alkol	5 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika
9	Distile suda bekletme	5 dakika
10	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'de bekletme (pH: 7.4)	5 dakika
11	Sitrat içerisinde antijen retrieval işleminin (antijen iyileştirmesi) uygulanması– mikrodalga fırında	20 dakika
12	%3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanması	10 dakika
13	PBS'de bekletme (pH: 7.4)	3x5 dakika
14	Protein blocking solüsyonu uygulanması	10 dakika
15	Primer antikorda inkübasyon –oda ısısında	2 saat
16	PBS'de bekletme (pH: 7.4)	3x5 dakika
17	Sekonder antikor uygulanması	15 dakika
18	PBS'de bekletme (pH: 7.4)	3x5 dakika
19	Streptavidin peroksidaz uygulanması	20 dakika
20	PBS'de (pH: 7.4)	3x5 dakika
21	DAB Kromojen	5 dakika
22	Distile su	5 dakika
23	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	45 saniye
24	Akarsuda yıkama	2-3 dakika
25	%70 Alkol	5 dakika
26	%80 Alkol	5 dakika
27	%90 Alkol	5 dakika
28	%100 Alkol	5 dakika
29	Ksilol-I	10 dakika
30	Ksilol-II	10 dakika
31	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Bu işlemlerden geçirilerek boyanan doku kesitleri Olympus BX50 araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak hücre sitoplazmalarında gözlenen Anti-caspase 3 boyanmasının şiddeti 0'dan +5'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi (Tablo 10).

**Tablo 10:** İmmünohistokimyasal Boyanma Yoğunluğunun Derecelendirilmesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+ 1	Minimal
+ 2	Az
+ 3	Orta
+ 4	Çok
+ 5	Şiddetli

### Anti-Caspase 3 İmmünohistokimyasal Uygulaması

Elde edilen parafin bloklardan 20 µm trim aralığı ile 4 µm kalınlığında seri kesitler poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Her lam üzerinde 1 kesit olacak şekilde ve kesitin alınma sırasına göre lamalar numaralandırıldı. Kesitler etüvde bir gece 37 °C'de bekletildi. Daha sonra 60 °C'de 1 saat daha bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alınan kesitler, membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan % 0.3' lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edildi. 3 kez 5'er dakika hazırlanmış olan PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) (abcam) ile yıkanan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponla (abcam, pH: 6) mikrodalga fırında 700 Watt'ta 20 dakika inkübe edildi. Oda ısısında 20 dk. soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokuların etrafı PAP-Pen ile çevrilerek, endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 10 dakika %3'lük hidrojen peroksidaz (abcam) solüsyonunda bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından Horseradish Peroxidase (HRP) Kit (abcam) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere

devam edildi. Protein bloklama solüsyonu (abcam) damlatılarak 10 dk. bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra, PBS, % 3'lük Triton X-100 ve BSA (Bovine serum albumin) ile hazırlanan buffer one solüsyonu ile 1:500 oranında sulandırılarak hazırlanan **Anti-caspase 3 (abcam, )** primer antikoruyla kesitler oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi 15 dakika, biyotinlenmiş sekonder antikor 15 dakika ve tekrar PBS ile yıkamadan sonra streptavidin peroksidaz 20 dakika uygulandı. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 5 dakika kromojen olarak DAB (3,3'-*Diaminobenzidine* ) (abcam) damlatıldı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 45 saniye Mayer's Hematoksilen solüsyonu (abcam) ile muamele edildi. Daha sonra kesitler akan çeşme suyu altında 3-4 dakika yıkandı. Artan derecelerdeki alkol serisinden geçirilerek (%70-%80-%90-%100), ksilolde 20 dk. bekletildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solüsyon (abcam) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

### **TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling] Yöntemi**

Bu çalışmada, apoptozis sonucu gelişen DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlamak amacıyla "In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" kullanıldı (Roche, Cat. No. 11684795910). Bu amaçla, elde edilen parafin bloklardan 20 µm trim aralığı ile 4 µm kalınlığında seri kesitler poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Her lam üzerinde 1 kesit olacak şekilde ve kesitin alınma sırasına göre lamalar numaralandırıldı. Kesitler etüvde bir gece 37 °C'de bekletildi. Daha sonra 60 °C'de 1 saat daha bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra çift-distile suda 5 dakika bekletilen kesitler, PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) (abcam) içerisinde 5 dakika bekletildi. Daha sonra dokuların etrafı PAP-Pen ile çevrilerek, membran permeabilizasyonu için PBS içerisinde 20µg/ml olacak şekilde dilue edilen Proteinaz-K (abcam, pH 7.4) solüsyonunda 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) (abcam) içerisinde 2 kez 5'er dakika yıkandı. Daha sonra işaretleme aşamasına geçildi. Her 10 kesit için TUNEL reaksiyon karışımı elde etmek amacıyla, 450µl **vial 2** (Label solution: nucleotide mixture in reaction buffer)'nin içerisine 50 µl **vial**

**1** (Enzyme solution: terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus [*EC* 2.7.7.31], recombinant in *E. Coli*, in storage buffer) eklenerek vorteksle karıştırıldı. Bu karışım Her bir dokuya, hazırlanan TUNEL reaksiyon karışımından 50 µl damlatılarak 37 °C’de 60 dakika nemli ve karanlık bir ortamda inkübasyon uygulandı. Dokular PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) (abcam) içerisinde 3 kez 5'er dakika yıkandı. Dokuların üzerine kapatma medyumunu dökülerek üzerine lamel kapatıldı (Tablo 11).

**Tablo 11:** TUNEL Yöntemi Uygulama Prosedürü (Floresan)

Sıra	Yapılan İşlem	İşlem Süresi
1	Deparafinizasyon (37 °C'de etüvde bekletme)	1 gece
2	Deparafinizasyon (60 °C'de etüvde bekletme)	1 saat
3	Ksilol I	10 dakika
4	Ksilol II	10 dakika
5	%100 Alkol	5 dakika
6	%90 Alkol	5 dakika
7	%80 Alkol	5 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika
9	Çift-distile suda bekletme	5 dakika
10	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'da bekletme (pH: 7.4)	5 dakika
11	Proteinaz-K (20µg/ml) uygulanması- 37 °C'de	15 dakika
12	PBS'de bekletme (pH: 7.4)	2x5 dakika
13	TUNEL reaksiyon karışımında inkübasyon- 37 °C'de	60 dakika
14	PBS'de bekletme (pH: 7.4)	3x5 dakika
15	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Hazırlanan preparatlar, 515- 565 nm aralığındaki (yeşil) dalga boyunda floresan mikroskop altında incelendi.

**HİSTOLOJİK İNCELEME:** İlk fiksasyonu takiben elde edilen over dokularının ışık mikroskopu altında incelenmesi yapıldı.

**OVER FOLLİKÜLÜ SAYIMI:** Overin orta 1/3'ünden alınan kesitlerin over follüküllerinin varlığı açısından incelenmesi, primordial ve büyüyen follüküllerin sayımı gerçekleştirildi.

**İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEME:** Apoptozis tespiti için anticaspase-3 primer antikoru kullanılarak immunhistokimyasal analiz yapıldı.

**İMMUNOFLORESANS:** DNA HASARININ tespiti için in situ terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-Nick-End (TUNEL) immunofloresan boyaması kullanıldı.

**APOPTOTİK İNDEKS:** Her bir slaytta en az 500 hücre sayılarak, apoptotik nükleer morfolojiye sahip hücreler saptanarak, bu hücrelerin tüm hücreler içindeki % oranı apoptotik indeks olarak hesaplandı.

**İMMUNHİSTOKİMYASAL SKORLAMA (HSCORE):** Pozitif olarak boyanan epitelyal hücrelerin %'lerinin toplamının boyama yoğunluğu ile çarpılması ile elde edilen bir immunhistokimyasal skorun tespit edildi.

**HSCORE:ΣPi (I+1) I: Boyanma yoğunluğu (0=Ekspresyon yok, 1=Hafif, 2=Orta, 3=Yoğun), Pi: Her bir yoğunlukta boyanmış hücrelerin %'si**

## **BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI TARAFINDAN GERÇEKLEŞTİRİLEN ANALİZLER:**

### **OKSİDATİF DENGE PARAMETRELERİNİN (LİPİD PEROKSİDASYON ÜRÜNLERİ) ÖLÇÜMÜ:**

Deney sonunda kalpten alınan kan örneklerinde ve over dokusunda, Malondialdehyde (MDA), Glutathione Peroxidase (GPx) düzeyleri ile Superoksit Dismutaz (SOD) ve katalaz aktiviteleri analiz edildi.

**Doku homojenizasyonu:** Sıçan over dokularında MDA, SOD, GPx, katalaz ve protein tayini için dokular tartılarak üzerine 1/10 (ağırlık/volüm) oranında PBS (0,1 M / pH 7,4) eklenip doku homojenizatörü ile homojenize edildi.<sup>193</sup> Homojenatlar 5 dakika süre ile 5000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantları ayrılacak ve eppendorflara alınarak -40°C de analiz edilecek zamana kadar saklandı.

Serum örnekleri elde edebilmek için antikoagülanlı tüpe alınan kan örnekleri, 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar -40 C'de analiz öncesine kadar saklandı.

**Doku protein tayini:** Total protein tayini Lowry modifiye metoduyla yapıldı.<sup>194</sup> Analiz edilecek parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak verildi.

**Doku ve serumda; MDA ve CAT ölçümleri** ELISA yöntemiyle Elabsience (2016, Wuhan/China) marka ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın (Elabsience Biotechnology Co. Ltd.) belirtmiş olduğu şekilde çalışıldı.

**Doku ve serumda; GPX ve SOD ölçümleri** ELISA yöntemiyle SUNRED (2016, Shangai/China) marka ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın (Sunred biotechnology Company) belirtmiş olduğu şekilde çalışıldı.

## **KULLANILAN CİHAZLAR**

1. IKA T18 Digital ULTRA TURRAX homojenizatör
2. Alisei Quality System Seac Radim Company analyser (Italy/Rome)-ELISA READER
3. UVmini-1240 UV-VIS Spectrophotometer- SHIMADZU
4. AND Company- Hassas terazi
5. Uğur derin dondurucu- Derin dondurucu
6. Eppendorf, Otomatik pipetler



Bu hayvan çalışmasının sonunda, sigaraya maruz kalınmasına bağlı olarak oksidatif hasar ve apoptozis mekanizmaları üzerinden meydana gelmesi beklenen over dokusu ve rezervi üzerindeki olumsuz etkilere karşı, kuvvetli bir antioksidan olarak bilinen Melatoninin koruyucu etkisinin olup olmadığı ortaya koyulacaktır.

### **ARAŞTIRMA VERİLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ**

Çalışmanın verileri araştırmacı tarafından SPSS 20.0 veri tabanına aktarılmış ve analizler yapılmıştır. Herbir gruptaki rat sayısına bakıldı. Herbir grubun her bir parametre için normal dağılıma uygunluğuna Shapiro Wilks testi ile bakılmıştır. Herbir gruptaki rat sayısı parametrik test yapmaya yeterli olmadığından, bu grupların herbir parametre için karşılaştırılmasında non parametrik test olan Kruskal-Wallis testi uygulandı. Herbir parametre için fark tespit edildi. Her bir parametre için farkın hangi gruplar arasında olduğunun tespiti için yine nonparametrik bir test olan Mann-whitney U testi kullanıldı. Yapılmış olan bütün analizlerde anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamız 72 adet dişi Wistar-Albino sıçan üzerinde prospektif, randomize, deneysel bir çalışma olarak planlanmıştır. Grup II ve grup III'te olan birer sıçan öldüğü için çalışma dışı bırakılmıştır. Grup I, IV, V, VI 12 şer rat, grup II ve III te 11 sıçan olmak üzere 70 sıçanla çalışma tamamlanmıştır. Grup açıklamaları aşağıda gösterilmiştir;

**Grup I-** Oda havasına maruz kalacak kontrol grubu (n=12)

**Grup II-** Kronik olarak sigara dumanına maruz kalacak çalışma grubu (n=11)

**Grup III-** Oda havası+10 mg/kg Melatonin grubu (n=11)

**Grup IV-** Oda havası+20 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

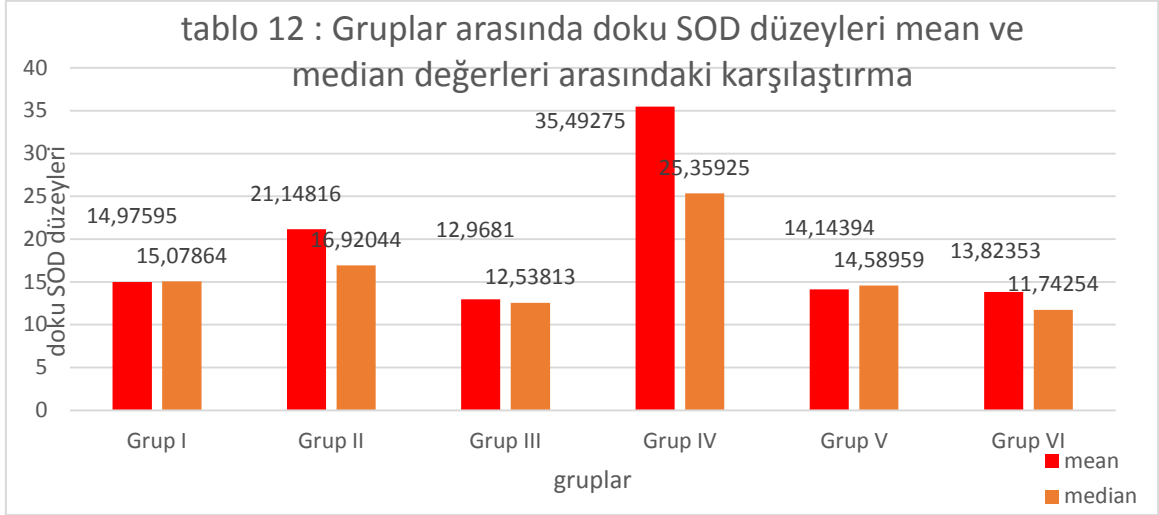
**Grup V-** Sigara dumanına maruziyet +10 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

**Grup VI-** Sigara dumanına maruziyet+20 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

#### **Biyokimyasal Bulgular**

Çalışma planında 6 gruba ayrılan sıçanlarda çalışılan biyokimyasal parametreler Malondialdehyde (MDA), Glutathione Peroxidase (GPx) düzeyleri ile Superoksit Dismutaz (SOD) ve katalaz aktiviteleri herbiri dokuda ve serumda ayrı ayrı değerlendirildi. Doku parametreleri kendi arasında, serum parametreleri kendi arasında incelendi.

Bakılan doku SOD aktivitelerinde kontrol grubu (grup I) ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir (15,07864 vs. 16,92044,  $p=0,538$ ). Yine grup I ile grup III karşılaştırıldığında da oda havasında alınan 10mg/ kg melatoninin SOD aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı bir etki etmediği gözlenmiştir (15,07864 vs. 12,53813,  $p=0,386$ ). Keza kontrol grubu ve Grup IV karşılaştırıldığında, oda havasında alınan 20 mg/kg melatonin alınması SOD aktivitesini anlamlı bir şekilde artırmaktadır (15,07864 vs. 25,35925,  $p=0,006$ ). Kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 10mg/kg ( grup V) ve melatonin 20mg / kg ( grup VI) uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında yine anlamlı bir istatistiksel bulguya rastlanmadı (15,07864 vs. 14,58959,  $p=1$  ve 15,07864 vs. 11,74254,  $p=0,729$ ).



Sadece sigara içen (grup II) ve grup III karşılaştırıldığında SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak fark gözlenmedi (16,92044 vs. 12,53813,  $p=0,140$ ). Grup II ve Grup IV karşılaştırıldığında, oda havasında 20mg melatonin verilen sıçanlarda sadece sigara içen sıçanlara göre SOD aktiviteleri anlamlı olarak artmıştır (16,92044 vs. 25,35925,  $p=0,014$ ). Ancak sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile melatonin uygulanan gruplar arasında (grup V ve VI) SOD aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (16,92044 vs. 14,58959,  $p=0,533$  ve 16,92044 vs. 11,74254,  $p=0,538$ ).

Doku SOD düzeyleri (ng/ gram protein)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	14,97595	21,14816	12,96810	35,49275	14,14394	13,82353
Median değeri	15,07864	16,92044	12,53813	25,35925	14,58959	11,74254
Standard sapma	8,00683	21,60764	5,52569	24,17118	4,089203	6,96601
Min. Değeri	3,96841	6,50649	5,82029	10,96220	7,25930	3,24808
Max Değeri	30,10509	84,59484	25,61805	82,7165	20,62742	24,60014

**Tablo 13:** Gruplardaki doku SOD düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

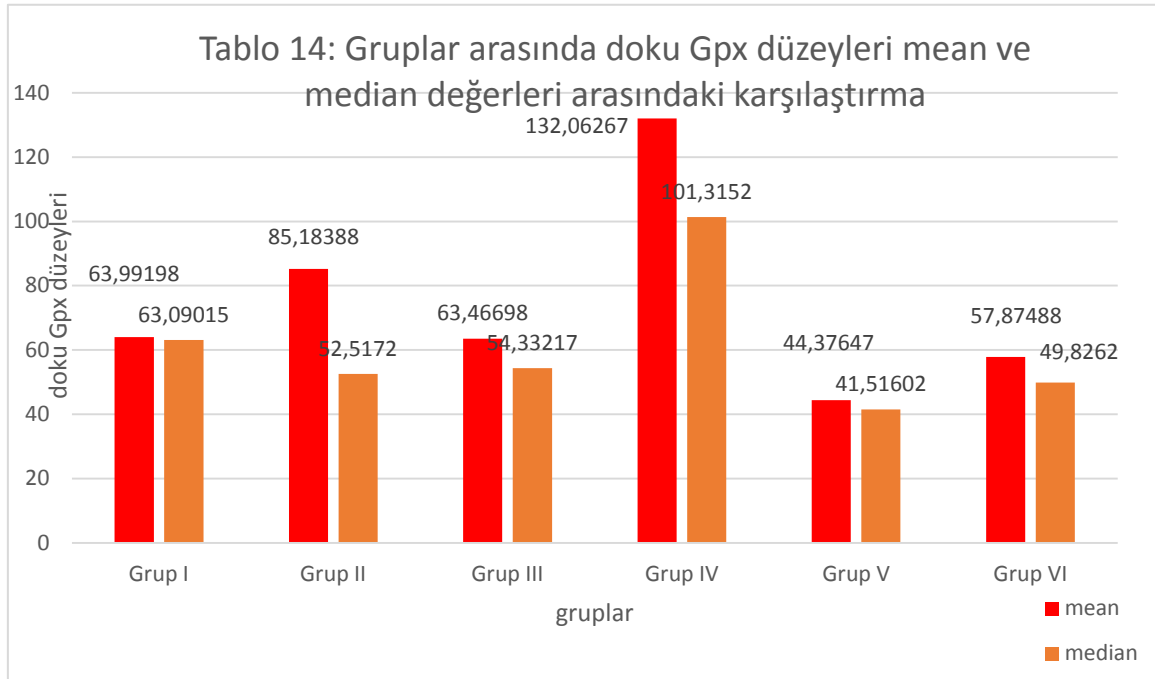
Oda havasında melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg ana iki grup karşılaştırıldığında ise (grup III ve IV), oda havası 20mg/kg melatonin alan grupta SOD aktivitelerinde anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir (12,53813 vs. 25,35925,  $p=0,001$ ). Ancak oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların(grupIII) SOD aktivileri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg uygulanan gruplar (grup V ve VI) karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (12,53813 vs. 14,58959,  $p=0,424$  ve 12,53813 vs. 11,74254,  $p=0,729$ ).

Bunun yanında oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/ kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup V) arasında yapılan değerlendirmede, oda havasında 20mg/ kg melatonin uygulanan grupta SOD aktivitesinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (25,35925 vs. 14,58959,  $p=0,001$ ). Oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup VI) karşılaştırıldığında da yine oda havasında 20mg/ kg melatonin uygulanan grupta SOD aktivitesinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (25,35925 vs. 11,74254,  $p=0,004$ ).

Ancak SOD aktivitelerinde son olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda melatonin uygulanan iki grup arasında (grup V ve VI) anlamlı bir fark bulunamadı (14,58959 vs. 11,74254,  $p=0,854$ ).

Bakılan doku Gpx düzeylerinde kontrol grubu (grup I) ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir (63,09015 vs. 52,5172,  $p =0,758$ ). Yine kontrol grubu ile oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan grup (grup III) karşılaştırıldığında da oda havasında alınan 10mg/ kg melatoninin Gpx düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir etki etmediği gözlenmiştir (63,09015 vs. 54,33217,  $p = 1$  ). Keza kontrol grubu ve Grup IV karşılaştırıldığında, oda havasında alınan 20 mg/kg melatonin alınması Gpx düzeyleri anlamlı bir şekilde artırmaktadır (63,09015 vs. 101,3152,  $p=0,007$ ). Kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 10mg/kg ( grup V) ve melatonin 20mg / kg ( grup VI) uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında yine anlamlı bir istatistiksel bulguya rastlanmadı (63,09015 vs. 41,51602,  $p=0,124$  ve 63,09015 vs. 49,8262,  $p=0,773$ ).

Sadece sigara içen (grup II) ve grup III karşılaştırıldığında Gpx düzeyleri istatistiksel olarak fark gözlenmedi (52,5172 vs. 54,33217, p= 1). Grup II ve Grup IV karşılaştırıldığında, oda havasında 20mg melatonin verilen sıçanlarda, sadece sigara içen sıçanlara göre Gpx düzeyleri anlamlı olarak artmıştır (54,33217 vs. 101,3152, p=0,023). Ancak sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile melatonin uygulanan gruplar arasında (grup V ve VI) Gpx düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (54,33217 vs. 41,51602 p =0,053 ve 54,33217 vs 49,8262, p=0,424).



Oda havasında melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg ana iki grup karşılaştırıldığında ise (grup III ve IV), oda havası 20mg/kg melatonin alan grupta Gpx düzeyleri anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir (54,33217 vs. 101,3152, p=0,012). Ancak oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grupIII) Gpx düzeyleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg uygulanan gruplar (grup V ve VI) arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (54,33217 vs. 41,51602, p=0,097 ve 54,33217 vs. 49,8262, p=0,644).

Bunun yanında oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/ kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup V) arasında yapılan değerlendirmede, oda havasında 20mg/ kg melatonin uygulanan grupta Gpx düzeyleri anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (101,3152 vs. 41,51602, p=0,001). Oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup IV) ile sigara dumanına maruz

kalan ve 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup VI) karşılaştırıldığında da yine oda havasında 20mg/ kg melatonin uygulanan grupta Gpx düzeylerinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (101,3152 vs. 49,8262, p=0,007).

Ancak Gpx düzeylerinde son olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda melatonin uygulanan iki grup arasında (grup V ve VI) anlamlı bir fark bulunamadı (41,51602 vs. 49,8262, p=0,295) .

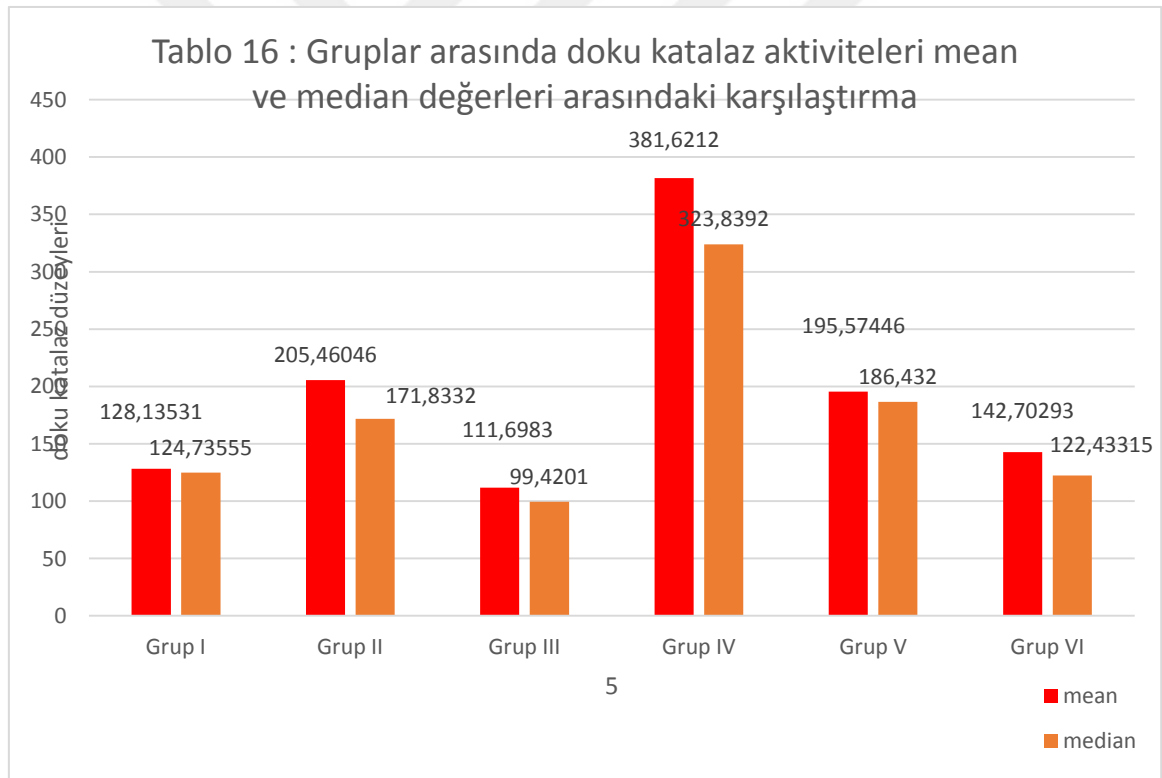
Doku Gpx düzeyleri (ng/ gram protein)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean Değeri	63,99198	85,18388	63,46698	132,06267	44,37647	57,87488
Median değeri	63,09015	52,5172	54,33217	101,3152	41,51602	49,8262
Standard sapma	32,95450	89,47022	33,58606	75,46994	17,61039	30,36831
Min. Değeri	23,1414	28,44594	5,32658	44,46225	25,1448	9,36090
Max Değeri	138,1277	348,9537	126,6626	290,7947	84,55745	111,535

**Tablo 15:** Gruplardaki doku Gpx düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Bakılan doku katalaz aktivitelerinde kontrol grubu (grup I) ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir (124,73555 vs. 171,8332, p =0,074). Yine kontrol grubu ile oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan grup (grup III) karşılaştırıldığında da oda havasında alınan 10mg/ kg melatoninin katalaz aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki etmediği gözlenmiştir (124,73555 vs. 99,4201, p = 0,453 ). Keza kontrol grubu ve Grup IV karşılaştırıldığında, oda havasında alınan 20 mg/kg melatonin alınması katalaz aktivitesini anlamlı bir şekilde artırmaktadır (124,73555 vs. 323,8592, p=0,001). Kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 10mg/kg uygulananlarda, sigara içen melatonin 10mg/kg uygulanan sıçanların katalaz aktivitesi belirgin olarak artmıştır (124,73555 vs. 186,432, p=0,027). Kontrol grubu ile

sigara içen sıçanlarda melatonin 20mg / kg ( grup VI) uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında ise katalaz aktiviteleri arasında istatistiksel bulguya rastlanmadı (124,73555 vs. 122,43315, p=0,817).

Sadece sigara içen (grup II) ve oda havasında 10 mg/kg melatonin uygulanan (grup III) karşılaştırıldığında, katalaz aktivitelerinin sadece sigara içenlerde arttığı gözlenmiştir (171,8332 vs. 99,4201, p= 0,014). Fakat Grup II ve Grup IV karşılaştırıldığında ise, oda havasında 20mg melatonin verilen sıçanlarda, sadece sigara içen sıçanlara göre katalaz aktivitelerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür (171,8332 vs. 323,8592, p=0,003) . Sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile melatonin uygulanan gruplar arasında (grup V ve VI) katalaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (171,8332 vs. 186,432, p =0,922 ve 171,8332 vs. 122,43315, p=0,140).



Oda havasında melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg ana iki grup karşılaştırıldığında ise (grup III ve IV), oda havası 20mg/kg melatonin alan grupta katalaz aktivitelerinin anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir (99,4201 vs. 323,8592, p=0,001) . Ancak oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grupIII) katalaz aktiviteleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 10mg/kg uygulanan grup (grup V) arasında, sigara dumanına

maruz kalan ve melatoninin 10mg/kg uygulanan grup katalaz aktivitesi anlamlı bir artış gözlenmiştir (99,4201 vs. 186,432,  $p=0,005$ ). Ancak aynı fark oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grupIII) katalaz aktiviteleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatoninin 20mg/kg uygulanan grup (grup VI) arasında gözlenmemiştir (99,4201 vs. 122,43315,  $p=0,326$ ).

Bunun yanında oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup V) arasında yapılan değerlendirmede, oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan grupta katalaz aktiviteleri anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (323,8592 vs. 186,432,  $p=0,004$ ). Oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup VI) karşılaştırıldığında da yine oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan grupta katalaz aktivitelerinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (323,8592 vs. 122,43315,  $p=0,001$ ).

Doku katalaz düzeyleri (ng/ gram protein)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	128,13531	205,46064	111,6983	381,62120	195,57446	142,70293
Median değeri	124,73555	171,8332	99,4201	323,8592	186,432	122,43315
Standard sapma	61,10768	116,82908	53,81971	214,09241	58,14409	83,25030
Min. Değeri	36,53949	86,84908	28,12997	102,80704	119,8368	35,46531
Max Değeri	223,59160	503,46450	207,7273	813,4397	291,4478	332,48550

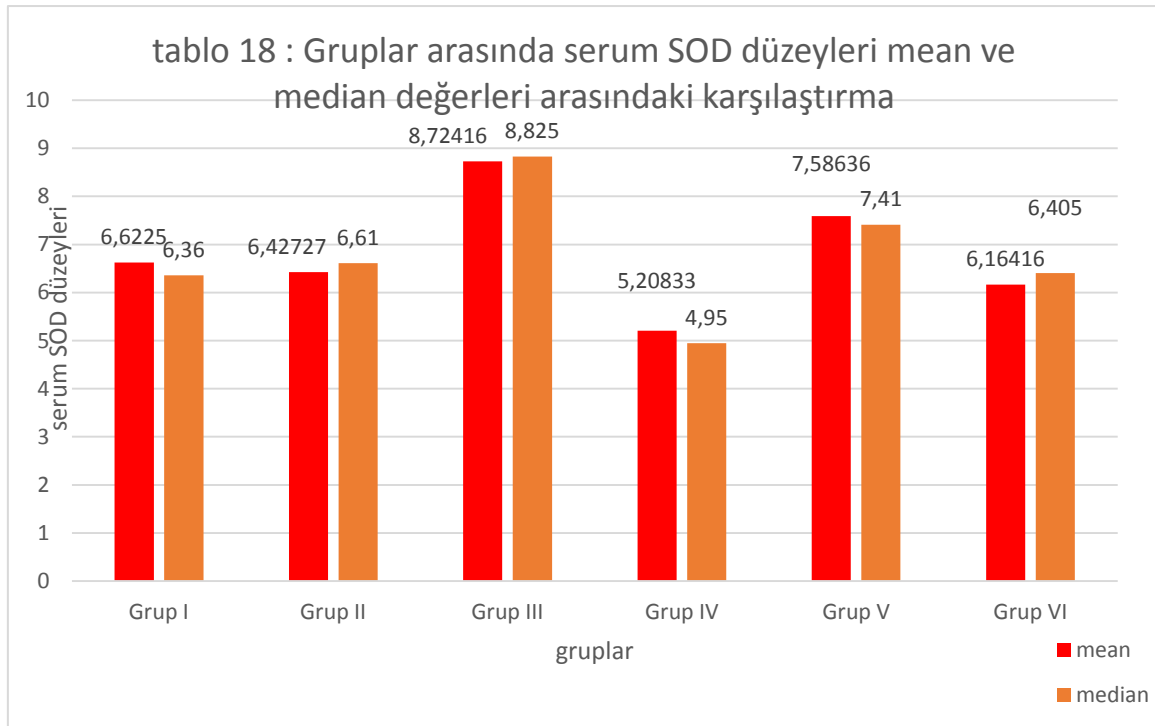
**Tablo 17 :** Gruplardaki doku katalaz düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Ancak katalaz aktivitelerinde son olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda melatonin uygulanan iki grup arasında (grup V ve VI) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (186,432 vs. 122,43315,  $p=0,065$ ) ancak sigara içen ve 10 mg/kg melatonin uygulanan sıçanlarda katalaz aktivitelerinin diğer gruba göre arttığı görülmektedir.



Doku düzeyinde gruplar arasında MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark gözlenmemiştir. Bu durumun nedeni sigara maruziyetinin süresinin yeteri kadar uzun olmadığından olabileceği düşünülmüştür. Ancak serum MDA düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel farklar gözlenmiştir.

Bakılan sıçan kanındaki serum SOD aktivitelerinde kontrol grubu (grup I) ile grup II karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir (6,36 vs. 6,61,  $p=0,559$ ). Yine grup I ile grup III karşılaştırıldığında da oda havasında alınan 10mg/ kg melatoninin serum SOD aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir (6,36 vs. 8,825,  $p = 0,002$ ). Ancak kontrol grubu ve Grup IV karşılaştırıldığında, oda havasında alınan 20 mg/kg melatonin alınması serum SOD aktivitesini anlamlı bir şekilde değiştirmedeği görülmüştür (6,36 vs. 4,95,  $p=0,193$ ). Kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 10mg/kg ( grup V) ve melatonin 20mg / kg ( grup VI) uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında yine anlamlı bir istatistiksel bulguya rastlanmadı (6,36 vs. 7,41,  $p=0,60$  ve 6,36 vs. 6,405,  $p=0,729$ ) . Ancak sigara içen ve 10mg/kg melatonin kullanan sıçanların kontrol grubu SOD aktivite düzeylerine göre arttığı gözlenmiştir.



Sadece sigara içen (grup II) ile oda havasında 10mg/kg kullanılan (grup III) sıçanlar karşılaştırıldığında, oda havasında 10mg/kg kullanılan (grup III) sıçanlarda serum SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak arttığı gözlenmiştir (6,61 vs. 8,825, p= 0,001). Grup II ve Grup IV karşılaştırıldığında, sadece sigara içen sıçanlarda serum SOD aktiviteleri anlamlı olarak artmıştır (6,61 vs. 4,95, p=0.019). Ancak sadece sigara içen sıçanlar (grup II) ile sigaraya maruz kalan ve 10mg/kg melatonin uygulanan gruplar arasında (grup V) karşılaştırma yapıldığında serum SOD aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Sigara içen 10mg/kg melatonin içen sıçanlarda serum SOD aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir (6,61 vs. 7,41, p =0,039). Ancak grup II ve VI arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (6,61 vs. 6,405, p=0,805).

Oda havasında melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg ana iki grup karşılaştırıldığında ise (grup III ve IV), oda havası 10mg/kg melatonin alan grupta serum SOD aktivitelerinde anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir (8,825 vs. 4,95, p=0,001). Oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grup III) serum SOD aktiviteleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 20mg/kg uygulanan grup (VI) arasında, oda havasında melatonin uygulanan grupta (grup III) anlamlı bir artış gözlenmiştir (8,825 vs. 6,405, p=0,001). Ancak oda havası ve 10mg/kg melatonin alan grup (grup III) ile sigaraya maruz kalan 10 mg/ kg (grup V) melatonin uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla beraber, oda havası altında 10mg/kg melatonin alan grubun serum SOD değerleri göreceli olarak artmıştır (8,825 vs 7,41, p=0,065).

Serum SOD düzeyleri (ng/ ml)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	6,6225	6,42727	8,72416	5,20833	7,58636	6,16416
Median değeri	6,36	6,61	8,825	4,95	7,41	6,405
Standard sapma	2,93802	1,07537	1,16268	1,19140	1,37505	1,63448
Min. Değeri	3,79	5,03	6,55	3,07	5,64	3,3
Max Değeri	15,02	8,27	10,52	7,08	10,21	8,57

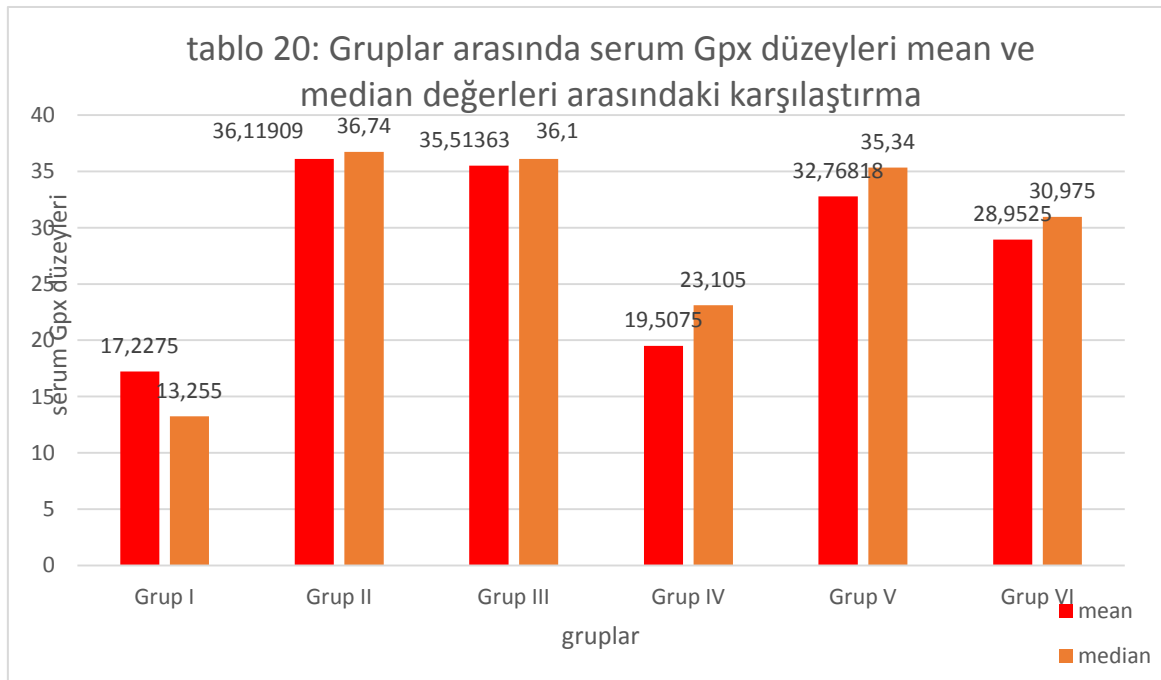
**Tablo 19:** Gruplardaki serum SOD düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Bunun yanında oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/ kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup V) arasında yapılan değerlendirmede, sigara dumanına maruz kalan 10mg/ kg melatonin uygulanan grupta serum SOD aktivitesinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (4,95 vs. 7,41, p=0,001). Oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup VI) karşılaştırıldığında da yine sigara dumanına maruz kalan 20mg/ kg melatonin uygulanan grupta serum SOD aktivitesinin göreceli olarak arttığı gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (4,95 vs. 6,405, p=0,083).

Ancak serum SOD aktivitelerinde son olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda melatonin uygulanan iki grup arasında (grup V ve VI) anlamlı istatistiksel olarak bir fark bulunamadı. (7,41 vs. 6,405, p=0,090) ancak melatonin 10mg/kg kullanan grubun (grup V) göreceli olarak serum SOD değerleri arttığı gözlenmiştir.

Bakılan serum Gpx düzeylerinde kontrol grubu (grup I) ile grup II karşılaştırıldığında, sigara içen grupta serum Gpx değeri istatistiksel olarak artmıştır (13,255 vs. 36,74, p=0,001). Yine kontrol grubu ile oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan grup (grup

III) karşılaştırıldığında da oda havasında alınan 10mg/ kg melatoninin serum Gpx düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir etki ettiği gözlenmiştir (13,255 vs. 36,1, p =0,001). Keza kontrol grubu ve Grup IV karşılaştırıldığında anlamlı bir istatistiksel değişken gözlenmemiştir (13,255 vs. 23,105, p=0,664). Ancak kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 10mg/kg ( grup V) ve melatonin 20mg / kg ( grup VI) uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında serum Gpx düzeyleri sigara dumanına maruz kalan ve melatonin alan gruplarda anlamlı olarak artış gözlenmiştir (13,255 vs. 35,34, p=0,007 ve 13,255 vs. 30,975, p=0,019).



Sadece sigara içen (grup II) ve grup III karşılaştırıldığında serum Gpx düzeyleri istatistiksel olarak fark gözlenmedi (36,74 vs. 36,1, p= 0,622). Grup II ve Grup IV karşılaştırıldığında sadece sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda serum Gpx düzeyleri anlamlı olarak artmıştır (36,74 vs. 23,105, p=0,001). Ancak sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile melatonin uygulanan gruplar arasında (grup V ve VI) serum Gpx düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (36,74 vs 35,34, p =0,412 ve 36,74 vs. 30,975, p=0,056). Ancak sigaraya maruz kalan ve 20mg melatonin kullanan grupta (grup VI) göreceli olarak serum Gpx düzeyi artmıştır.

Oda havasında melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg ana iki grup karşılaştırıldığında ise (grup III ve IV), oda havası 10mg/kg melatonin alan grupta serum Gpx düzeyleri anlamlı bir

şekilde artış gözlenmiştir (36,1 vs. 23,105, p=0,001). Ancak oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grupIII) serum Gpx düzeyleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg uygulanan gruplar (grup V ve VI) arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (36,1 vs. 35,34, p=0,490 ve 36,1 vs. 35,34, p=0,065).

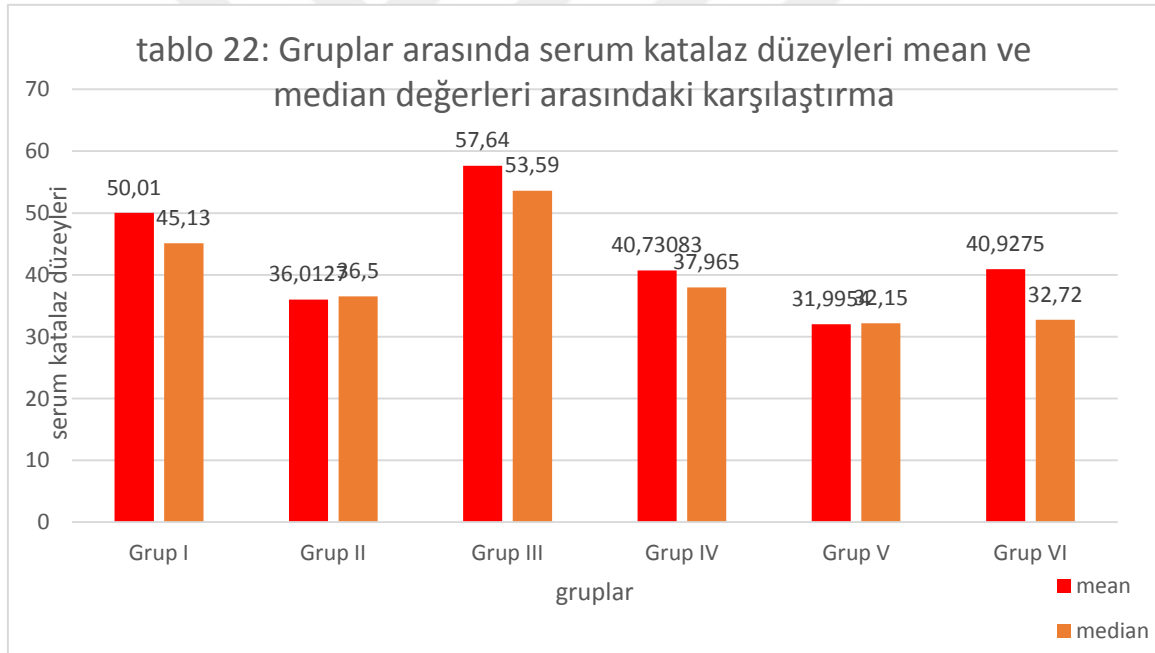
Serum Gpx düzeyleri (ng/ ml)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	17,2275	36,11909	35,51363	19,5075	32,76818	28,9525
Median değeri	13,255	36,74	36,1	23,105	35,34	30,975
Standard sapma	11,95277	5,37276	7,68946	8,79898	8,70335	9,91053
Min. Değeri	5,69	30,21	16,27	6,63	15,40	11,08
Max Değeri	37,01	48,83	44,14	29,49	44,35	42,13

**Tablo 21:** Gruplardaki serum Gpx düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Bunun yanında oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/ kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup V) arasında yapılan değerlendirmede, sigara dumanına maruz kalan 10mg/ kg melatonin uygulanan grupta serum Gpx düzeyleri anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (23,105 vs. 35,34, p=0,003). Oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup VI) karşılaştırıldığında da yine sigara dumanına maruz kalan 20mg/ kg melatonin uygulanan grupta serum Gpx düzeylerinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (23,105 vs. 30,975, p=0,009).

Ancak serum Gpx düzeylerinde son olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda melatonin uygulanan iki grup arasında (grup V ve VI) anlamlı bir fark bulunamadı (35,34 vs. 30,975, p=0,356).

Bakılan serum katalaz aktivitelerinde kontrol grubu (grup I) ile grup II karşılaştırıldığında, kontrol grubunda sadece sigara içen sıçanlara göre katalaz aktivitesinin artmış olduğu gözlenmiştir (45,13 vs. 36,5,  $p=0,015$ ). Yine kontrol grubu ile oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan grup (grup III) karşılaştırıldığında da serum katalaz aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki etmediği gözlenmiştir (45,13 vs. 53,59,  $p = 0,140$ ). Kontrol grubu ve Grup IV karşılaştırıldığında, serum Gpx düzeyleri arasında anlamlı fark gözlenmedi (45,13 vs. 37,965,  $p=0,140$ ). Kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 10mg/kg (grup V) uygulananlarda, kontrol grubundaki sıçanların serum katalaz aktivitesi belirgin olarak artmıştır(45,13 vs. 32,15,  $p=0,017$ ). Kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 20mg / kg ( grup VI) uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında ise serum katalaz aktiviteleri arasında istatistiksel bulguya rastlanmadı (45,13 vs. 32,72,  $p=0,137$ ).



Sadece sigara içen (grup II) ve oda havasında 10 mg/kg melatonin uygulanan (grup III) karşılaştırıldığında, serum katalaz aktivitelerinin oda havasında 10mg/kg melatonin alan grupta arttığı gözlenmiştir(36,5 vs. 53,59,  $p= 0,001$ ). Fakat Grup II ve Grup IV karşılaştırıldığında ise, serum katalaz aktivitelerinin anlamlı olarak değişmediği gözlenmiştir (36,5 vs. 37,965,  $p=0,424$ ). Sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile melatonin uygulanan gruplar arasında (grup V ve VI) serum katalaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (36,5 vs. 32,15,  $p=0,412$  ve 36,5 vs. 32,72,  $p=0,869$ ).

Serum katalaz düzeyleri (pikogram/ ml)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	50,01	36,01272	57,64	40,73083	31,99545	40,9275
Median değeri	45,13	36,5	53,59	37,965	32,15	32,72
Standard sapma	18,59915	8,24426	15,59197	13,65616	11,8091	20,54221
Min. Değeri	27,21	22,88	33,69	19,44	15,7	20,79
Max Değeri	96,79	55,9	86,93	68,45	50,38	79,79

**Tablo 23:** Gruplardaki serum katalaz düzeyleri (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Oda havasında melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg ana iki grup karşılaştırıldığında ise (grup III ve IV), oda havası 10mg/kg melatonin alan grupta serum katalaz aktivitelerinin anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir (53,59 vs. 37,965,  $p=0,012$ ). Aynı zamanda oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grupIII) serum katalaz aktiviteleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 10mg/kg uygulanan grup (grup V) arasında, oda havasında melatonin 10mg/kg uygulanan grup katalaz aktivitesi anlamlı bir artış gözlenmiştir (53,59 vs. 32,15,  $p=0,001$ ). Aynı fark oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grupIII) katalaz aktiviteleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 20mg/kg uygulanan grup (grup VI) karşılaştırıldığında, oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan grupta artış gözlenmiştir (53,59 vs. 32,72,  $p=0,039$ ).

Bunun yanında oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/ kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup V) arasında yapılan değerlendirmede, anlamlı bir fark gözlenmemiştir (37,965 vs. 32,15,  $p=0,157$ ). Oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup VI) karşılaştırıldığında da serum katalaz aktivitesinde anlamlı olarak istatistiksel fark gözlenmemiştir (37,965 vs. 32,72,  $p=0,001$ ).

Ancak katalaz aktivitelerinde son olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda melatonin uygulanan iki grup arasında (grup V ve VI) serum katalaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (32,15 vs. 32,72,  $p=0,457$ ).

doku MDA düzeyleri (ng/ gram protein)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	3,57937	4,04965	3,36626	4,02931	3,72047	3,18428
Median değeri	3,29035	3,76364	2,74128	4,20941	3,3007	2,78068
Standard sapma	1,77218	0,84196	1,49601	0,51196	1,58034	1,57122
Min. Değeri	1,29997	3,12337	2,00155	3,06464	1,62459	0,75745
Max Değeri	5,96747	5,59563	6,22979	4,43528	7,17375	5,54255

**Tablo 24:** Gruplardaki doku MDA (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Bakılan serum MDA düzeylerinde kontrol grubu (grup I) ile grup II karşılaştırıldığında, sigara içen grupta serum MDA değeri istatistiksel olarak artmıştır (5,72174 vs. 8,25299,  $p=0,002$ ). Yine kontrol grubu ile oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan grup (grup III) karşılaştırıldığında da serum MDA düzeyleri arasında anlamlı bir etki ettiği gözlenmemiştir (5,72174 vs. 5,89875,  $p=0,931$ ). Keza kontrol grubu ve Grup IV karşılaştırıldığında anlamlı bir istatistiksel değişken gözlenmemiştir (5,72174 vs. 5,36772,  $p=0,436$ ). Aynı zamanda kontrol grubu ile sigara içen sıçanlarda melatonin 10mg/kg ( grup V) ve melatonin 20mg / kg ( grup VI) uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında serum MDA düzeyleri sigara dumanına maruz kalan ve melatonin alan gruplarda göreceli olarak artış gözlenmiştir, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (5,72174 vs. 7,29713,  $p=0,085$  ve 5,72174 vs. 6,92541,  $p=0,064$ ).



Serum MDA düzeyleri (ng/ ml)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	5,82205	8,63597	5,96071	5,57719	7,08472	6,95196
Median değeri	5,72174	8,25299	5,89875	5,36772	7,29713	6,92541
Standard sapma	1,28198	2,53814	1,2408730	1,56166	1,78427	1,57725
Min. Değeri	3,01350	5,84566	4,53578	3,43832	4,35877	3,96935
Max Değeri	8,21759	13,38628	9,13804	9,13804	9,45666	8,71322

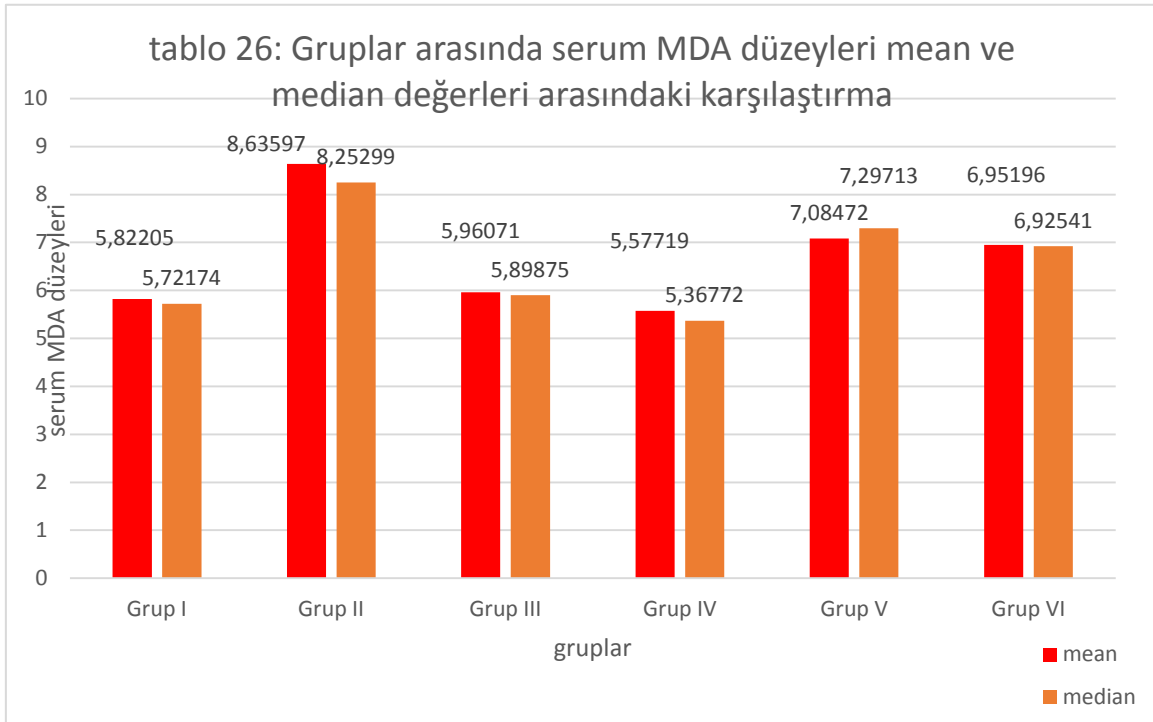
**Tablo 25:** Gruplardaki serum MDA (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Sadece sigara içen (grup II) ve grup III karşılaştırıldığında serum MDA düzeyleri istatistiksel olarak sadece sigara içen grupta anlamlı artış gözlemlendi (8,25299 vs. 5,89875,  $p=0,003$ ). Grup II ve Grup IV karşılaştırıldığında sadece sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda serum MDA düzeyleri anlamlı olarak artmıştır (8,25299 vs. 5,36772,  $p=0,002$ ). Ancak sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile melatonin uygulanan gruplar arasında (grup V ve VI) serum MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (8,25299 vs. 7,29713,  $p=0,250$  ve 8,25299 vs. 6,92541,  $p=0,116$ ).

Oda havasında melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg ana iki grup karşılaştırıldığında ise (grup III ve IV) gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi (5,89875 vs. 5,36772,  $p=0,370$ ). Aynı oda havasında 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanların (grup III) serum MDA düzeyleri ile sigara dumanına maruz kalan ve melatonin 10mg/kg ve 20mg/kg uygulanan gruplar, (grup V ve VI) arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (5,89875 vs. 7,29713,  $p=0,085$  ve 5,89875 vs. 8,25299,  $p=0,094$ ). Ancak sigara içen gruplarda serum MDA düzeyleri göreceli olarak artmıştır.

Bunun yanında oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup V) arasında

yapılan değerlendirmede, sigara dumanına maruz kalan 10mg/ kg melatonin uygulanan grupta serum MDA düzeyleri göreceli olarak artığı gözlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlandırılmadı (5,36772 vs. 7,29713, p=0,052). Ancak oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar ( grup IV) ile sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin uygulanan sıçanlar (grup VI) karşılaştırıldığında da sigara dumanına maruz kalan 20mg/ kg melatonin uygulanan grupta serum MDA düzeylerinin anlamlı olarak artığı gözlenmiştir (5,36772 vs. 8,25299, p=0,046).



Ancak serum MDA düzeylerinde son olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda melatonin uygulanan iki grup arasında (grup V ve VI) anlamlı bir fark bulunamadı (7,29713 vs. 8,25299, p=0,712).

## **Histolojik Bulgular**

Çalışmamız 72 adet dişi Wistar-Albino sıçan üzerinde prospektif, randomize, deneysel bir çalışma olarak planlanmıştır. Grup II ve grup III te olan birer sıçan öldüğü için çalışma dışı bırakılmıştır. Grup I, IV, V, VI 12 şer rat, grup II ve III te 11 sıçan olmak üzere 70 sıçanla çalışma tamamlanmıştır. Grup açıklamaları aşağıda gösterilmiştir;

**Grup I-** Oda havasına maruz kalacak kontrol grubu (n=12)

**Grup II-** Kronik olarak sigara dumanına maruz kalacak çalışma grubu (n=11)

**Grup III-** Oda havası+10 mg/kg Melatonin grubu (n=11)

**Grup IV-** Oda havası+20 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

**Grup V-** Sigara dumanına maruziyet +10 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

**Grup VI-** Sigara dumanına maruziyet+20 mg/kg Melatonin grubu (n=12)

Gruplara ait over örneklerinin H&E boyaması ile değerlendirilmesinde elde edilen folikül sayıları ve foliküler yapı değerlendirilmesinde gruplar tablo 27 ve tablo 28' de gösterilmiştir.

Gruplardan elde edilen Histolojik follikül sayıları Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldığında her gruptaki kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen parametreler (mean değer, median değer, st. Sapma, minimum ve max. Değerler) tablo 29, 30,31 ve 32 de gösterilmiştir.

**Tablo 27: Gruplara göre folikül sayıları ve foliküler yapı değerlendirilmesi (oda havası, oda havasında 10mg/kg melatonin uygulana ve oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan gruplar)**

<b>GRUP</b>	<b>Primordial Follkül</b>	<b>Primer Follikül</b>	<b>Sekonder Follikül</b>	<b>Matür Follikül</b>
G1-1	17	14	7	3
G1-2	7	11	4	3
G1-3	9	9	1	Ø
G1-4	11	13	8	1
G1-5	15	5	9	2
G1-6	8	10	5	5
G1-7	10	6	8	4
<b>GRUP</b>	<b>Primordial Follkül</b>	<b>Primer Follikül</b>	<b>Sekonder Follikül</b>	<b>Matür Follikül</b>
G3-1	6	7	5	2
G3-2	8	7	7	1
G2-3	12	8	5	1
G3-4	9	4	2	Ø
G3-5	11	9	4	3
G3-6	9	3	6	Ø
G3-7	8	5	2	4
<b>GRUP</b>	<b>Primordial Follkül</b>	<b>Primer Follikül</b>	<b>Sekonder Follikül</b>	<b>Matür Follikül</b>
G4-1	13	11	7	3
G4-2	9	5	5	Ø
G4-3	10	8	6	Ø
G4-4	14	12	8	2
G4-5	8	6	2	3
G4-6	11	9	4	2
G4-7	9	6	5	4

<b>GRUP</b>	<b>Primordial Follkül</b>	<b>Primer Follkül</b>	<b>Sekonder Follkül</b>	<b>Matür Follkül</b>
G2-1	5	4	2	1
G2-2	2	4	3	Ø
G2-3	2	2	5	Ø
G2-4	4	5	2	1
G2-5	7	3	1	2
G2-6	5	6	4	1
G2-7	3	5	1	2
<b>GRUP</b>	<b>Primordial Follkül</b>	<b>Primer Follkül</b>	<b>Sekonder Follkül</b>	<b>Matür Follkül</b>
G5-1	10	8	8	Ø
G5-2	6	7	4	1
G5-3	6	4	7	3
G5-4	9	2	2	Ø
G5-5	5	5	3	3
G5-6	8	2	1	2
G5-7	7	11	1	Ø
<b>GRUP</b>	<b>Primordial Follkül</b>	<b>Primer Follkül</b>	<b>Sekonder Follkül</b>	<b>Matür Follkül</b>
G6-1	14	7	6	3
G6-2	12	7	4	1
G6-3	7	9	4	3
G6-4	6	10	7	1
G6-5	13	4	5	Ø
G6-6	10	6	3	2
G6-7	7	8	5	2

**Tablo 28: Gruplara göre folikül sayıları ve foliküler yapı değerlendirilmesi (sigara, sigaraya maruz kalan sıçanlarda 10mg/kg melatonin uygulana ve sigaraya maruz kalan sıçanlarda 20mg/kg melatonin uygulanan gruplar)**

Primordial folikül sayıları	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	11	4	9	10,57	7,29	9,86
Median değeri	10	4	9	10	7	10
Standard sapma	3,697	1,826	2	2,225	1,799	3,237
Min. Değeri	7	2	6	8	5	6
Max Değeri	17	7	12	14	10	14

**Tablo 29:** Gruplardaki Primordial folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan değerler değerlendirildi. Sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile diğer gruplar arasında primordial foliküller arasında anlamlı fark gözlemlendi. Grup II ile kontrol grubu (grup I) karşılaştırıldığında sigara içen grupta primordial folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlemlendi (4 vs. 10, p=0,002). Yine sadece sigara içen grup ( grup II) ile oda havasında melatonin 10mg/kg kullanılan hastalarda ( grup III), sadece sigara grupta primordial folikül sayıları yine anlamlı olarak azdır (4 vs. 9, p=0,003). Aynı zamanda sigara içen grup ile oda havasında 20mg/kg melatonin (grup IV) uygulanan grup karşılaştırıldığında primordial folikül sayıları yine anlamlı olarak sadece sigara içen grupta az izlendi (4 vs. 10, p=0,002). Keza sadece sigara içen grup ile sigara dumanına maruz kalıp 10mg/ kg ( grup V) ve 20mg/kg ( grup VI) melatonin kullananlar karşılaştırıldığında, sadece sigara içen gruptaki sıçanlarda folikül sayıları anlamlı bir şekilde az olduğu gözlemlendi (4 vs. 7, p=0,010 ve 4 vs. 10, p=0,004).

Kontrol grubu ( grup I) ile sigara dumanına maruz kalan gruplar karşılaştırıldığında ise, melatonin doza bağlı etkinliği değerlendirilmesi açısından anlamlı sonuçlara varılmıştır. Sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/kg melatonin kullanan grupta ( grup V) kontrol grubuna göre primordial folikül sayıları anlamlı olarak az izlendi (7 vs. 10, p=0,034).

Sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin kullananlarda ( grup VI) ise kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( 10 vs. 10, p=0,521).

Ayrıca oda havasında 10mg/kg melatonin kullanan grup ( grup III) ile sigara dumanına maruz kalan 10mg/kg alan grup karşılaştırıldığında ( grup IV), sigara dumanına maruz kalan grupta primordial folikül sayıları yine anlamlı olarak az bulunmuştur (7 vs. 10, p=0,017).

Primer folikül sayıları	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	9,71	4,14	6,14	8,14	5,57	7,29
Median değeri	10	4	7	8	5	7
Standard sapma	3,352	1,345	2,193	2,673	3,309	1,976
Min. Değeri	5	2	3	5	2	4
Max Değeri	14	6	9	12	11	10

**Tablo 30:** Gruplardaki Primer folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile diğer gruplar arasında primer foliküller arasında anlamlı fark gözlemlendi. Grup II ile kontrol grubu ( grup I) karşılaştırıldığında sigara içen grupta primer folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlemlendi (4 vs. 10, p=0,005). Yine sadece sigara içen grup ( grup II) ile oda havasında melatonin 10mg/kg kullanılan sıçanlar ( grup III) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değer olmamasına rağmen, sadece sigara grupta primer folikül sayıları yine göreceli olarak azdır (4 vs. 7, p=0,093). Aynı zamanda sigara içen grup ile oda havasında 20mg/kg ( grup IV) melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında primordial folikül sayıları yine anlamlı olarak sadece sigara içen grupta az izlendi (4 vs. 8, p=0,006). Keza sadece sigara içen grup ile sigara dumanına maruz kalıp 20mg/kg melatonin kullananlar karşılaştırıldığında ( grup VI), sadece sigara içen gruptaki sıçanlarda folikül sayıları anlamlı bir şekilde az olduğu

gözlendi (4 vs. 7,  $p=0,004$ ). Ancak önemli olarak sadece sigara içen grup ile, sigara dumanına maruz kalıp 10mg/kg melatonin uygulanan grup ( grup V ) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (4 vs. 5,  $p=0,476$ )

Kontrol grubu ( grup I) ile sigara dumanına maruz kalan gruplar karşılaştırıldığında ise, melatonin doza bağlı etkinliği değerlendirilmesi açısından anlamlı sonuçlara varılmıştır. Sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/kg melatonin kullanan grupta ( grup V) kontrol grubuna göre primordial folikül sayıları anlamlı olarak az izlendi (10 vs. 5,  $p=0,047$ ). Sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin kullananlarda ( grup VI) ise kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( 10 vs. 7,  $p=0,158$ ).

Sekonder folikül sayıları	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	6	2,57	4,43	5,29	3,71	4,86
Median değeri	7	2	5	5	3	5
Standard sapma	2,828	1,512	1,902	1,976	2,812	1,345
Min. Değeri	1	1	2	2	1	3
Max Değeri	9	5	7	8	8	7

**Tablo 31:** Gruplardaki Sekonder folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Sadece sigara içen sıçanlar ( grup II) ile diğer gruplar arasında sekonder foliküller arasında anlamlı fark gözlendi. Grup II ile kontrol grubu (grup I) karşılaştırıldığında sigara içen grupta sekonder folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlendi (2 vs. 5,  $p=0,033$ ). Yine sadece sigara içen grup ( grup II) ile oda havasında melatonin 10mg/kg kullanılan hastalarda ( grup III), sekonder folikül sayıları istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, sadece sigara grupta göreceli olarak azdır (2 vs. 5,  $p=0,069$ ). Aynı zamanda sigara içen grup ile oda havasında 20mg/kg melatonin (grup IV) uygulanan grup karşılaştırıldığında sekonder folikül sayıları yine anlamlı olarak sadece sigara içen



grupta az izlendi (2 vs. 5,  $p=0,020$ ). Keza sadece sigara içen grup ile sigara dumanına maruz kalıp 20mg/kg ( grup VI) melatonin kullananlar karşılaştırıldığında, sadece sigara içen gruptaki sıçanlarda folikül sayıları anlamlı bir şekilde az olduğu gözlemlendi (2 vs. 5,  $p=0,020$ ). Ancak önemli olarak sadece sigara içen grup ile, sigara dumanına maruz kalıp 10mg/kg melatonin uygulanan grup ( grup V ) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (2 vs. 3,  $p=0,558$ ).

Kontrol grubu ( grup I) ile sigara dumanına maruz kalan gruplar karşılaştırıldığında ise, melatonin doza bağlı etkinliği değerlendirilmesi açısından anlamlı sonuçlara varılmıştır. Sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/kg melatonin kullanan grupta ( grup V) kontrol grubuna göre primordial folikül sayıları göreceli olarak az izlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (7 vs. 3,  $p=0,137$ ). Sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin kullananlarda ( grup VI) ise kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( 7 vs.5 ,  $p=0,245$ ).

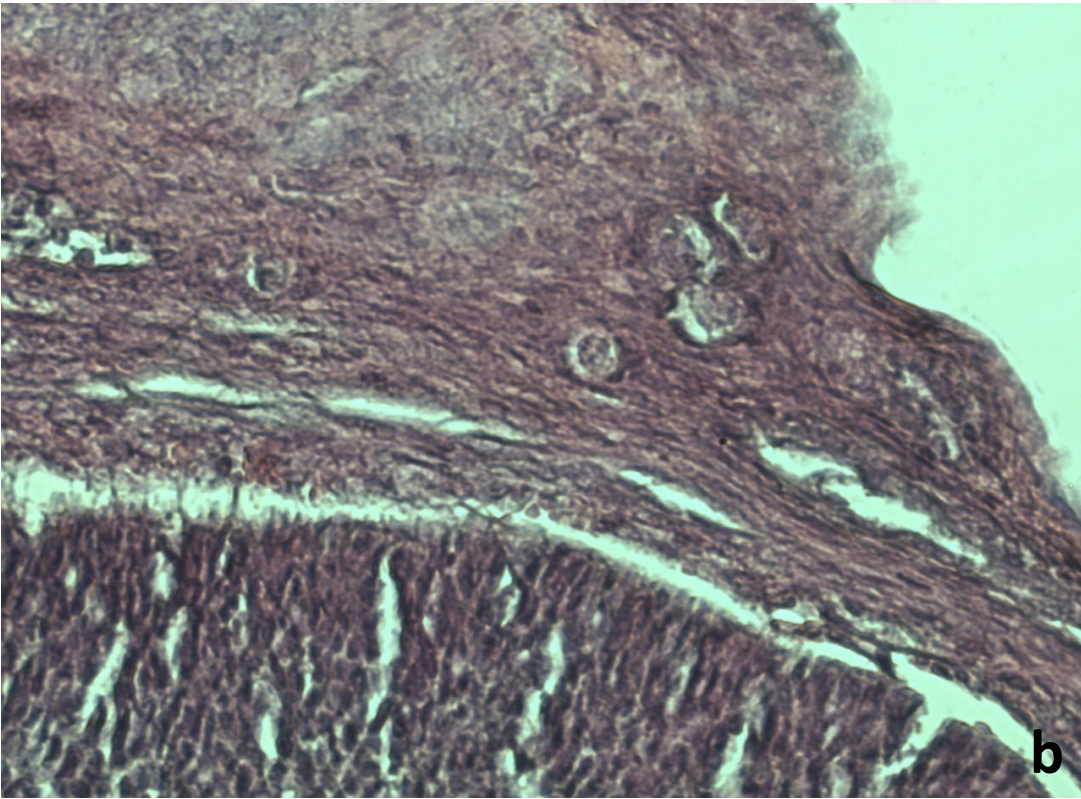
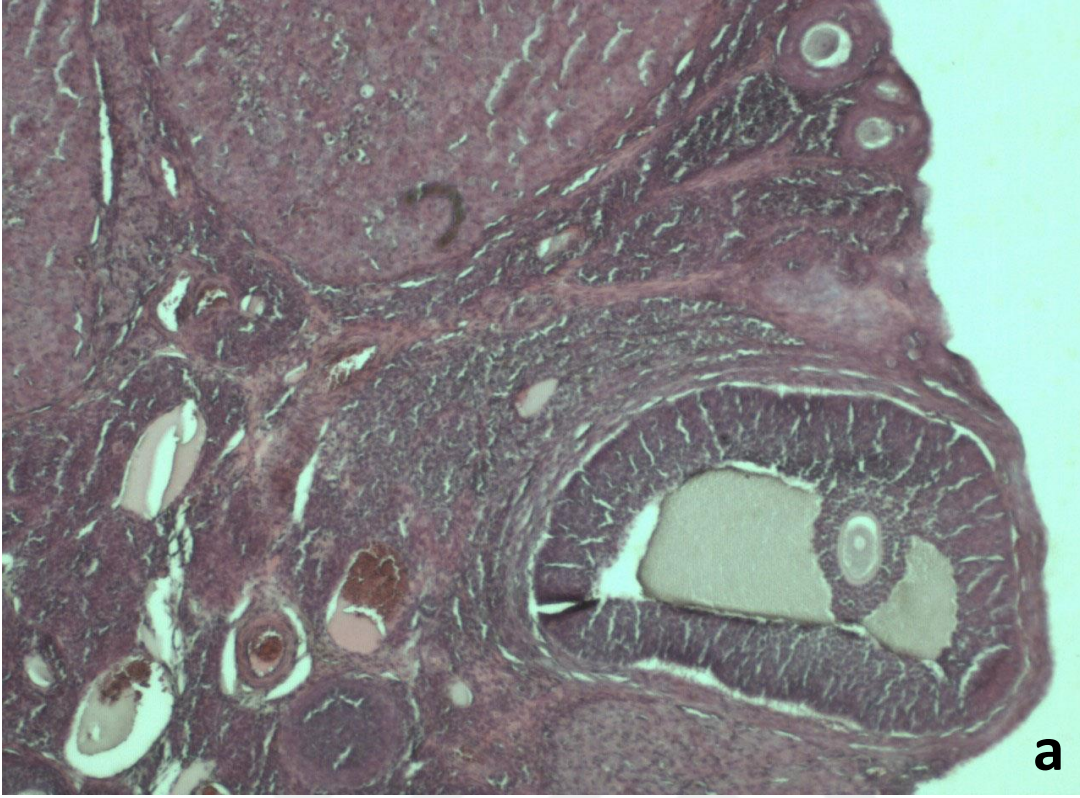
Matür folikül sayıları	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Mean değeri	2,57	1	1,57	2	1,29	1,71
Median değeri	3	1	1	2	1	2
Standard sapma	1,718	0,816	1,512	1,528	1,38	1,113
Min. Değeri	0	0	0	0	0	0
Max Değeri	5	2	4	4	3	3

**Tablo 32:** Gruplardaki matür folikül sayıları (mean değer, median değer, minimum ve maksimum değer, standart sapma)

Sadece sigara içen grup ( Grup II) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında sigara içen grupta matür folikül sayısının göreceli olarak düştüğü gözlemlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı gözükmedi (3 vs. 1, p=0,068). Yine sadece sigara içen grup ile oda havasında melatonin 10mg/kg kullanılan hastalarda, anlamlı fark gözlenmedi (1 vs. 1, p=0,550). Aynı zamanda sigara içen grup ile oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında matür folikül sayıları yine anlamlı fark gözlenmedi (1 vs. 2, p=0,168). Keza sadece sigara içen grup ile sigara dumanına maruz kalıp 10mg/ kg ve 20mg/kg melatonin kullananlar karşılaştırıldığında, anlamlı fark gözlenmedi (1 vs. 1, p=0,790 ve 1 vs. 2, p=0,206).

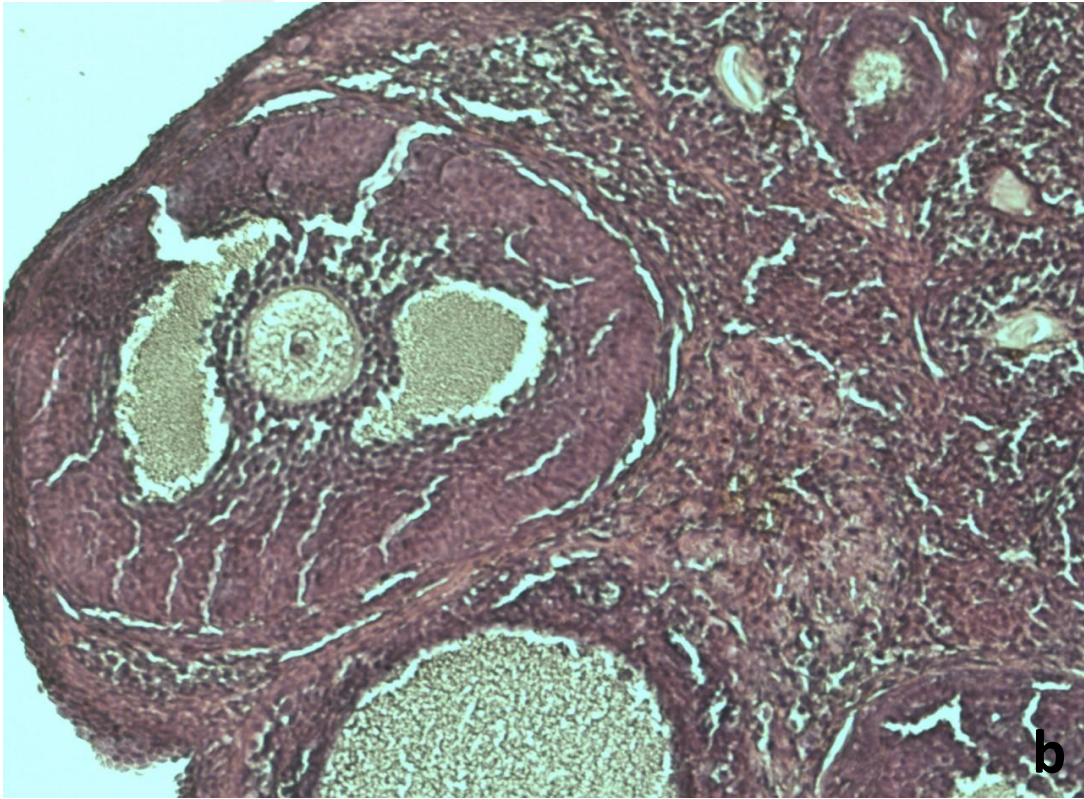
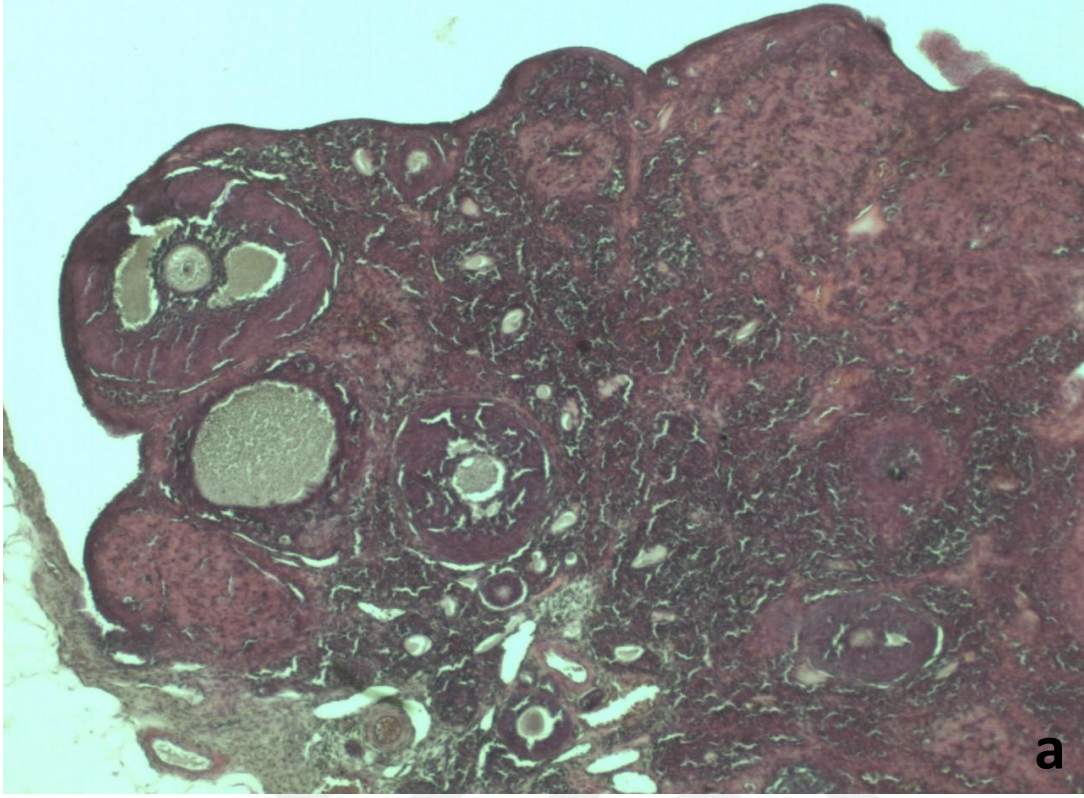
Kontrol grubu ile sigara dumanına maruz kalan gruplar karşılaştırıldığında ise, melatonin doza bağlı etkinliği değerlendirilmesi açısından anlamlı sonuçlara varılmıştır. Sigara dumanına maruz kalan ve 10mg/kg melatonin kullanan grupta kontrol grubuna göre matür folikül sayıları göreceli olarak az izlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı izlenmedi (3 vs. 1, p=0,150). Sigara dumanına maruz kalan ve 20mg/kg melatonin kullananlarda ise kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( 3 vs. 2, p=0,296).

Hematoksilen-eozin boyaması ile tüm gruplardaki genel ovaryum yapısı, stroma ve follikül görüntüleri şekil 11-16'da gösterilmiştir.



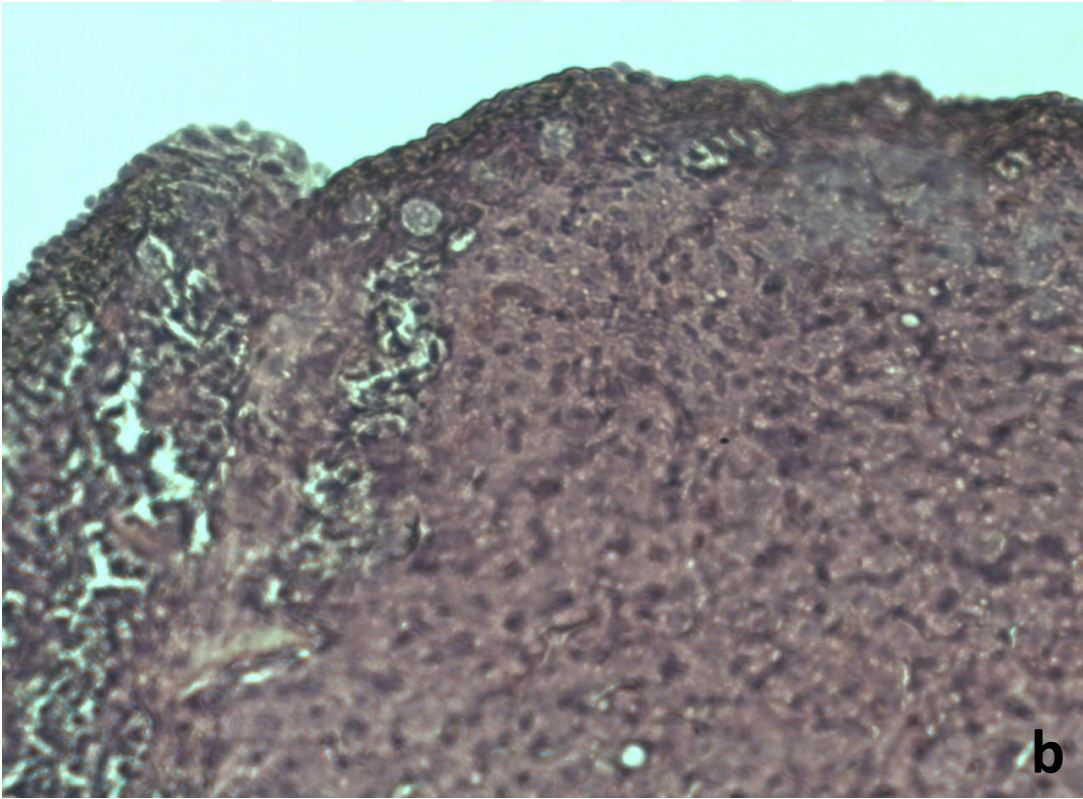
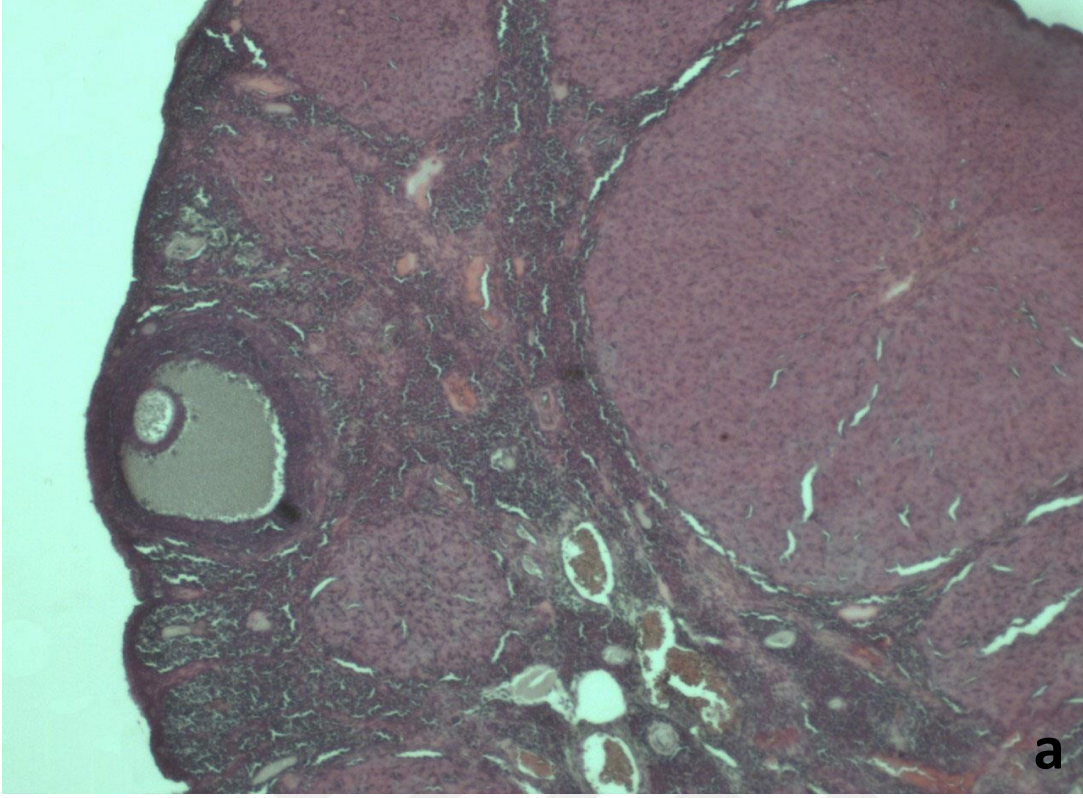
**Şekil 11: a:** Kontrol grubu (grup I) Hematoksilen-Eozin boyaması 4x, **b:** 20x





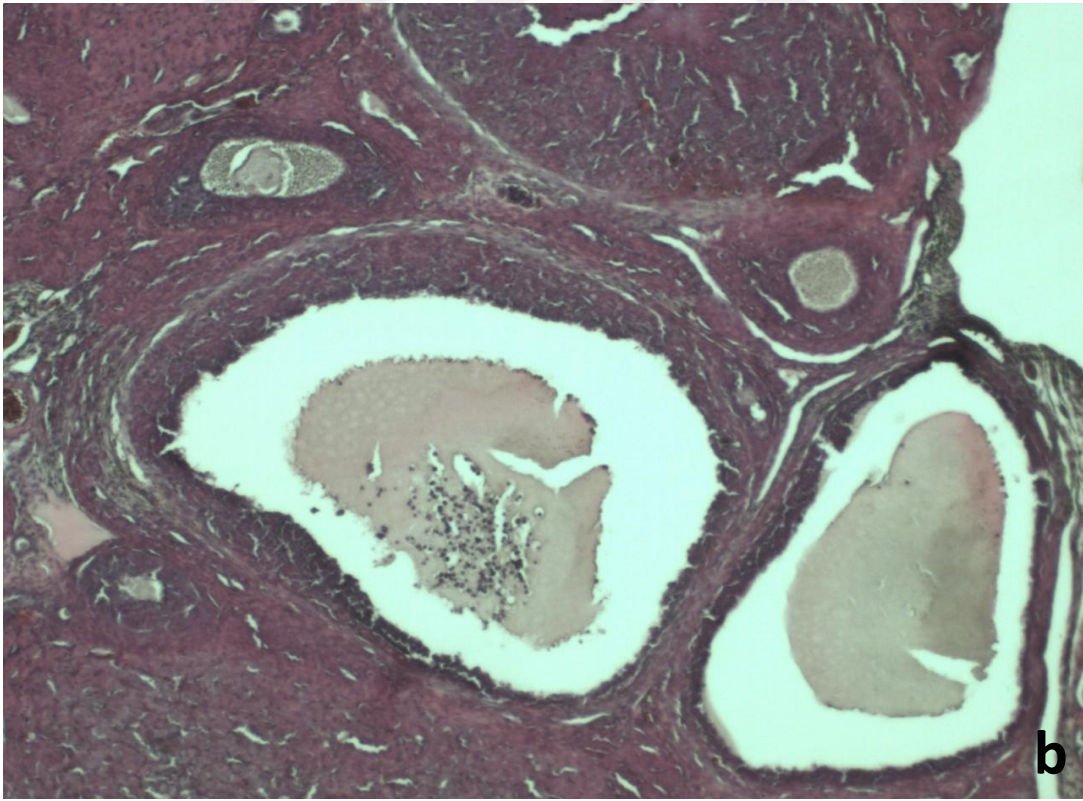
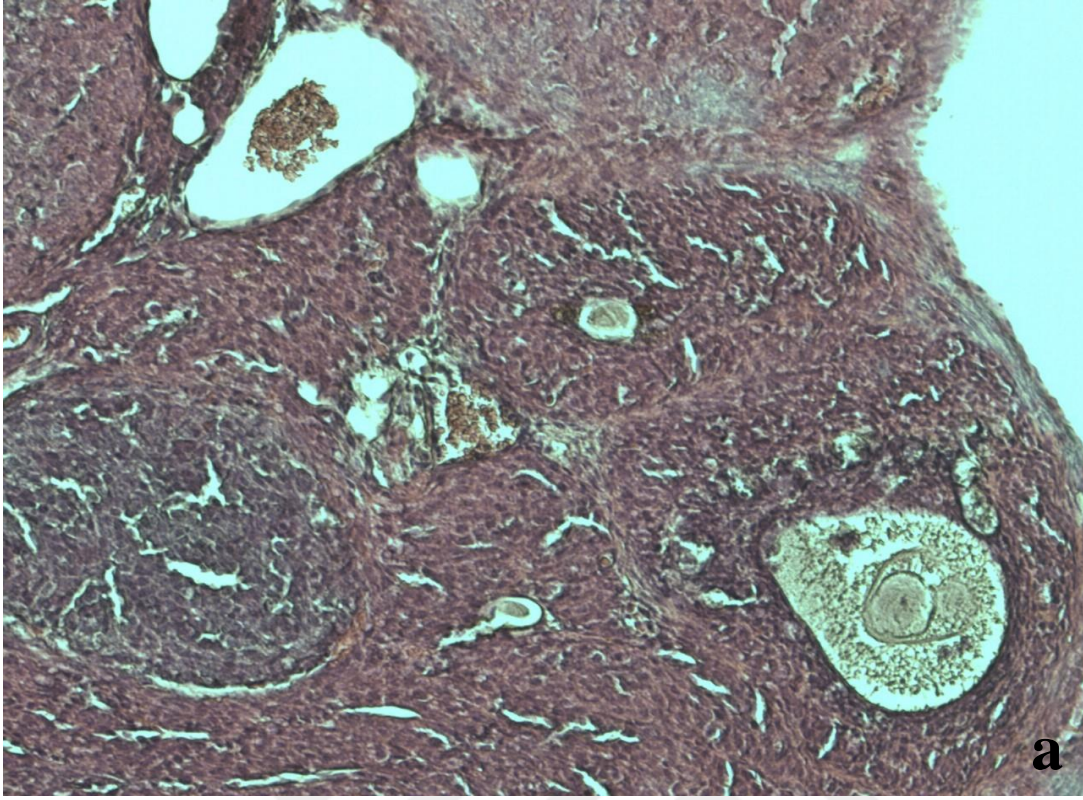
**Şekil 12: a:** Sadece sigara dumanına maruz kalan grup (grup II) Hematoksilen-Eozin boyaması 4x, **b:** 10x





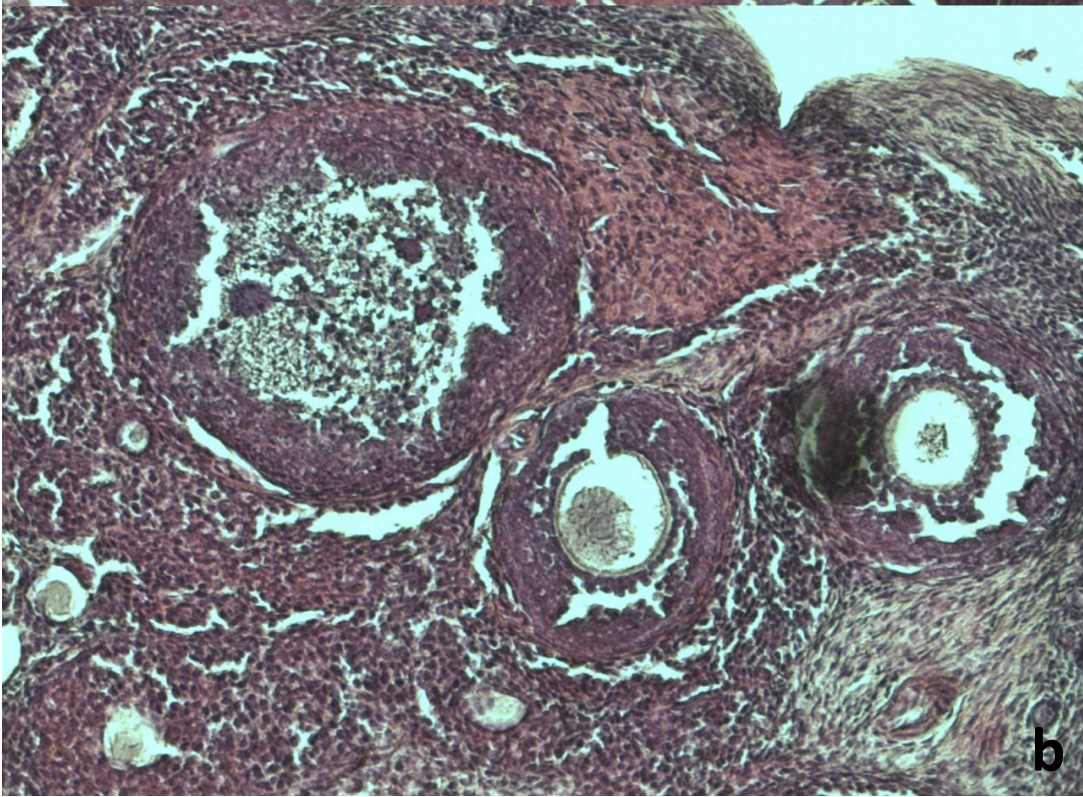
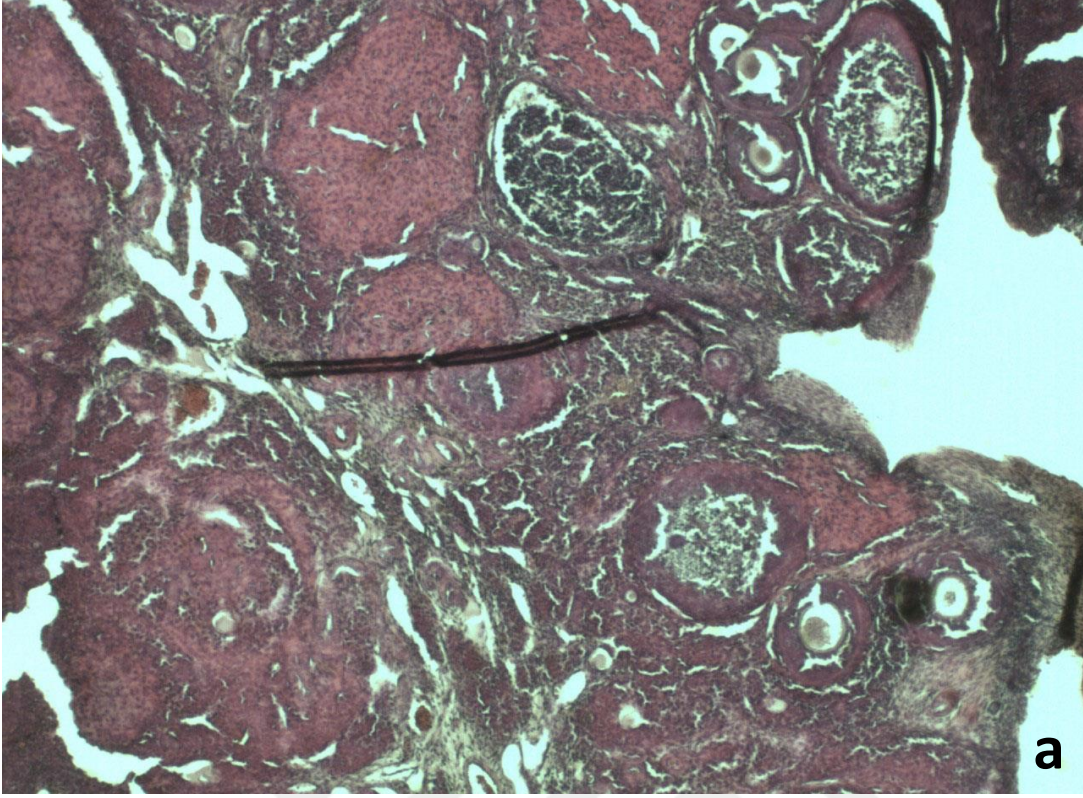
**Şekil 13: a:** Oda havasında 10 mg melatonin uygulanan grup (grup III) Hematoksilen-Eozin boyaması 4x, **b:** 20x





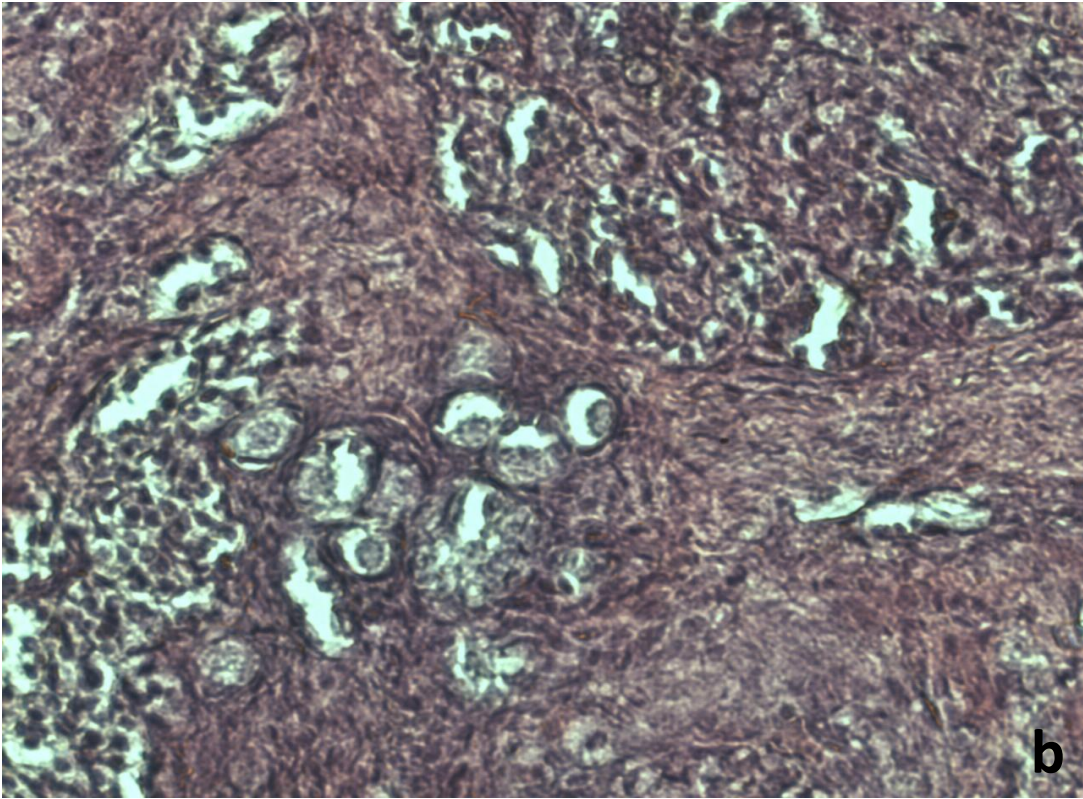
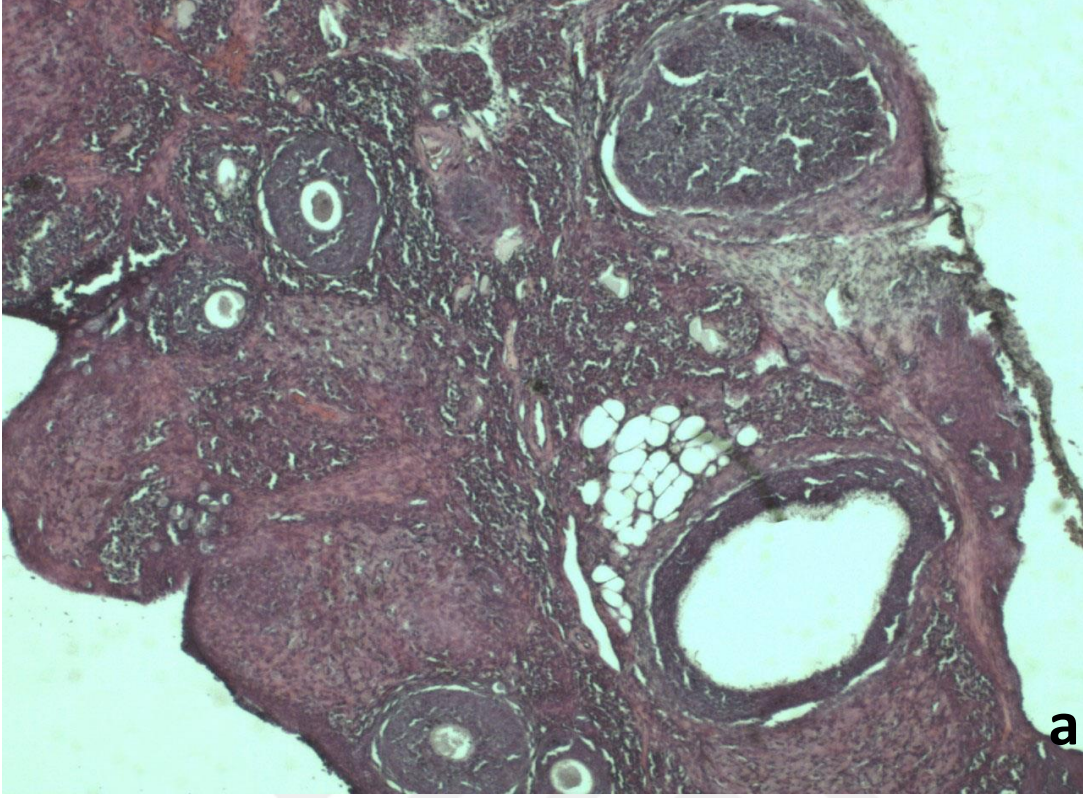
**Şekil 14: a:** Oda havasında 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) Hematoksilen-Eozin boyaması 4x, **b:** 10x





**Şekil 15: a:** Sigara dumanına maruz kalan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup V) Hematoksilen-Eozin boyaması 4x, **b:** 20x





**Şekil 16: a:** Sigara dumanına maruz kalan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup VI) Hematoksilen-Eozin boyaması 4x, **b:** 20x



Anti-caspase 3 ile yapılan immunohistokimyasal çalışma sonucu grupların değerlendirilmesinde, ayrı ayrı apoptotik index ve H score değerlerine bakıldı. Gruplara göre bulgular tablo 33 ve 34 de gösterilmiştir.

<b>Tablo 33: Gruplara göre apoptotik indeks (oda havasında)</b>				
<b>GRUP</b>	<b>Apoptotik Oran</b>	<b>Boyanma Yeri</b>	<b>Boyanma Şiddeti</b>	<b>Apoptotik İndex</b>
G1-1	5/ 500	(sekonder follükül)	+1	% 1
G1-2	8/ 500	(sekonder follükül)	+2	
G1-3	4/ 500	(matür follükül)	+1	
G1-4	∅			
G1-5	3/ 500	(matür follükül)	+1	
G1-6	∅			
G1-7	5/ 500	(sekonder follükül)	+1	
<b>GRUP</b>	<b>Apoptotik Oran</b>	<b>Boyanma Yeri</b>	<b>Boyanma Şiddeti</b>	<b>Apoptotik İndex</b>
G3-1	13/ 500	(sekonder/ matür follükül)	+3	% 2
G3-2	7/ 500	(matür follükül)	+2	
G3-3	10/ 500	(sekonder follükül)	+2	
G3-4	9/ 500	(sekonder follükül)	+1	
G3-5	∅			
G3-6	15/ 500	(sekonder/ matür follükül)	+1	
G3-7	6/ 500	(sekonder follükül)	+1	
<b>GRUP</b>	<b>Apoptotik Oran</b>	<b>Boyanma Yeri</b>	<b>Boyanma Şiddeti</b>	<b>Apoptotik İndex</b>
G4-1	5/ 500	(sekonder follükül)	+1	% 0,6
G4-2	∅			
G4-3	∅			
G4-4	6/ 500	(matür follükül)	+2	
G4-5	1/ 500	(sekonder follükül)	+1	
G4-6	3/ 500	(sekonder follükül)	+1	
G4-7	5/ 500	(matür follükül)	+2	

GRUP	Apoptotik Oran	Boyanma Yeri	Boyanma Şiddeti	Apoptotik İndex
G2-1	17/ 500	(sekonder follikül)	+1	% 3,4
G2-2	19/ 500	(matür follikül)	+2	
G2-3	16/ 500	(sekonder follikül)	+1	
G2-4	21/ 500	(sekonder follikül)	+2	
G2-5	15/ 500	(matür follikül)	+1	
G2-6	17/ 500	(sekonder follikül)	+3	
G2-7	14/ 500	(sekonder follikül)	+1	
GRUP	Apoptotik Oran	Boyanma Yeri	Boyanma Şiddeti	Apoptotik İndex
G5-1	∅			% 1,63
G5-2	11/ 500	(sekonder follikül)	+1	
G5-3	3/ 500	(matür follikül)	+1	
G5-4	7/ 500	(sekonder follikül)	+1	
G5-5	5/ 500	(matür follikül)	+1	
G5-6	9/ 500	(sekonder follikül)	+1	
G5-7	14/ 500	(sekonder follikül)	+2	
GRUP	Apoptotik Oran	Boyanma Yeri	Boyanma Şiddeti	Apoptotik İndex
G6-1	3/ 500	(sekonder follikül)	+1	% 1,13
G6-2	2/ 500	(sekonder follikül)	+1	
G6-3	6/ 500	(sekonder follikül)	+1	
G6-4	3/ 500	(matür follikül)	+1	
G6-5	∅			
G6-6	10/ 500	(sekonder follikül)	+2	
G6-7	13/ 500	(sekonder follikül)	+2	

**Tablo 34:** Gruplara göre apoptotik indeks (sigara dumanına maruz kalanlarda)

Yapılan immunohistokimyasal çalışmalar sonucunda H-score ve gruplara göre dağılımları hesaplanmıştır. H score hesaplanırken aşağıdaki şu formül uygulanmıştır;

$$\text{H-Score} = [1 \times (\% \text{ hücre } +1) + 2 \times (\% \text{ hücre } +2) + 3 \times (\% \text{ hücre } +3)].$$

Bakılan apoptotik index skorlamasında tablo 34 de görüldüğü üzere sadece sigara içen sıçanlarda belirgin bir şekilde apoptotik indekslerin artışı gözlenmektedir.

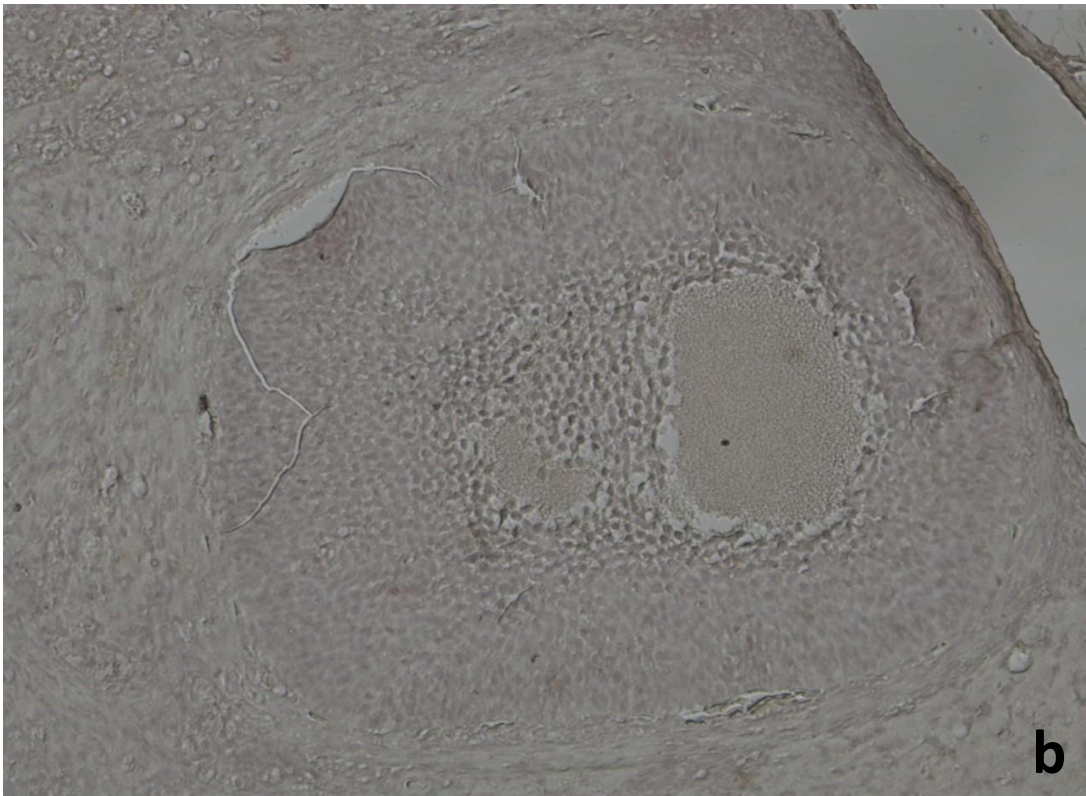
<b>GRUP</b>	<b>H-SCORE</b>
<b>Oda havası</b>	
G1	4,05
G3	13,2
G4	2,8
<b>Sigara dumanına maruz kalanlar</b>	
G2	21,3
G5	7
G6	5,3

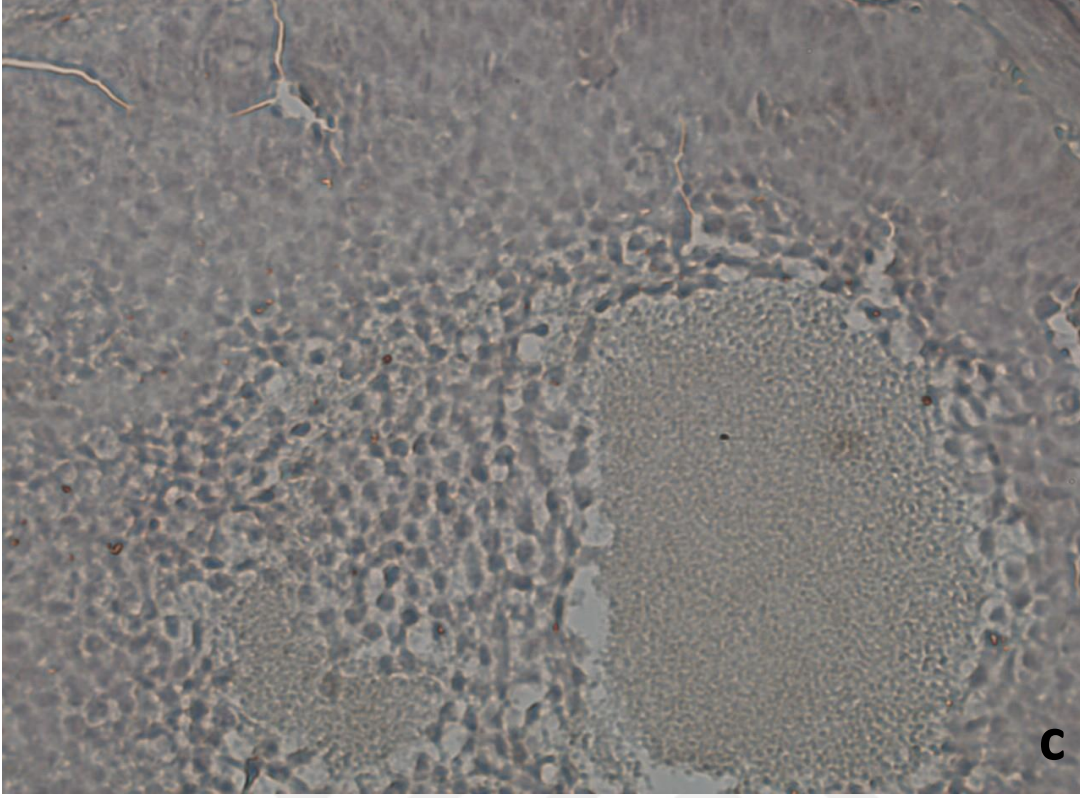
**Tablo 35: gruplara göre H-score dağılımı**

Gruplar arasında yapılan H- score dağılımı tablo 35 de gösterilmektedir. Buna göre sadece sigara içen gruplarda H- score belirgin bir şekilde artmış olarak gözlenmektedir (H score 21,3). Sigara dumanına maruz kalan ve melatonin uygulanan gruplarda (grup V ve VI) ise H score da belirgin bir düşüş izlenmektedir. (21,3 vs. 7 ve 5,3)

Anti-caspase 3 ile immünohistokimyasal uygulama yapılan gruplarda izlenen hücrelerin boyanması ve boyanma şiddetleri şekil 17-22’de gösterilmiştir.

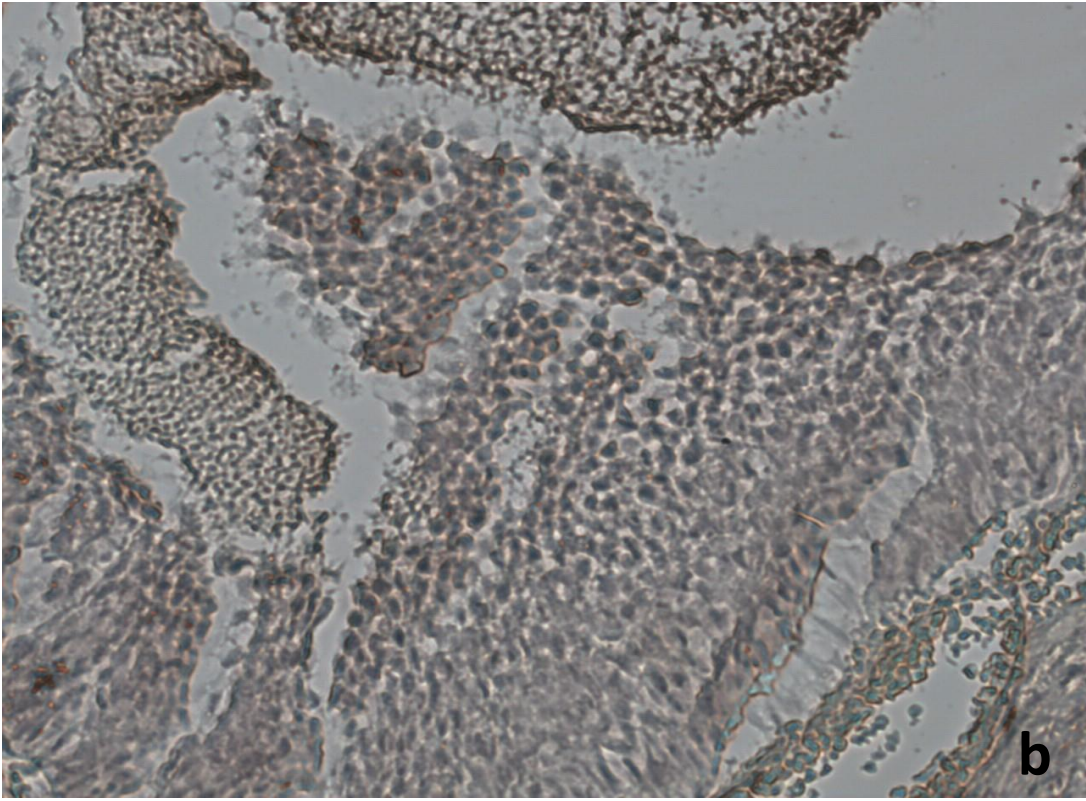
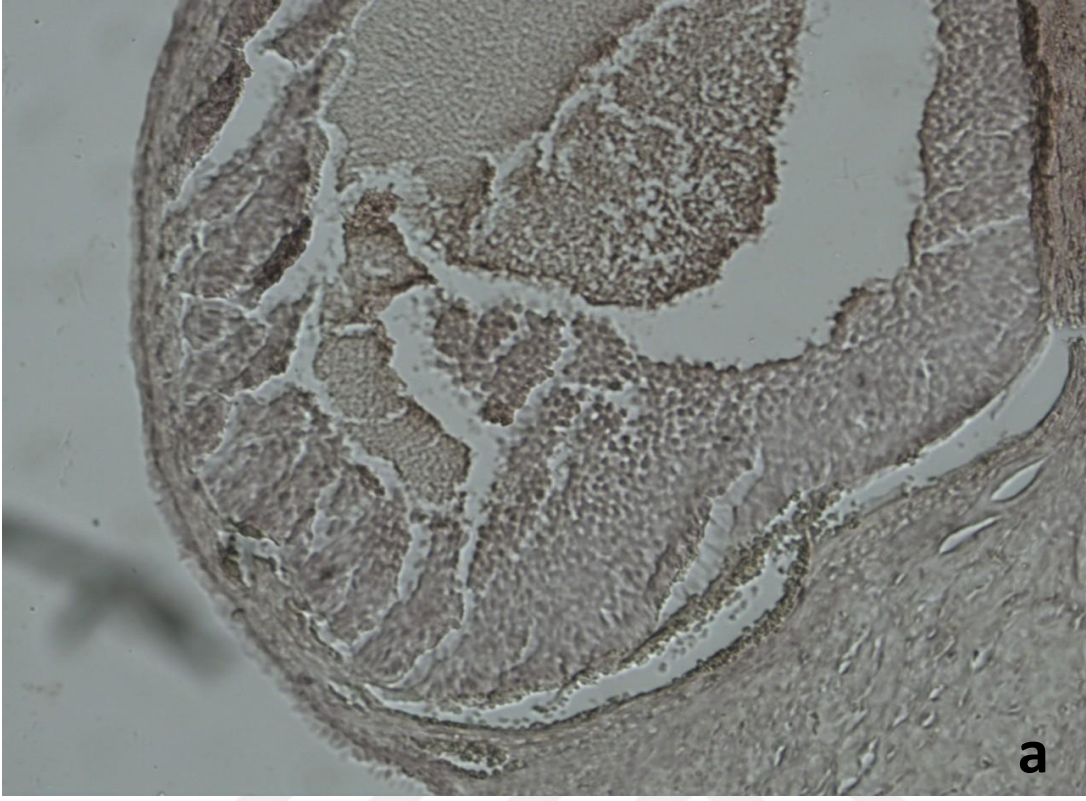
Sadece sigara dumanına maruz kalan grupta (grup II) anti-caspase 3 ile yapılan immünohistokimyasal uygulama sonucunda boyanan hücreler çok sayıda ve yoğun bir şekilde görülürken, sigara uygulanan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grupta (grup IV) boyanan hücrelerin belirgin bir şekilde az olarak görüldüğü ve yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Sigara uygulanan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grupta (grup V) ise boyanan hücrelerin sigara dumanına maruz kalan gruba (grup II) kıyasla daha az olduğu ancak sigara uygulanan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) kadar etkili olmadığı görülmüştür.





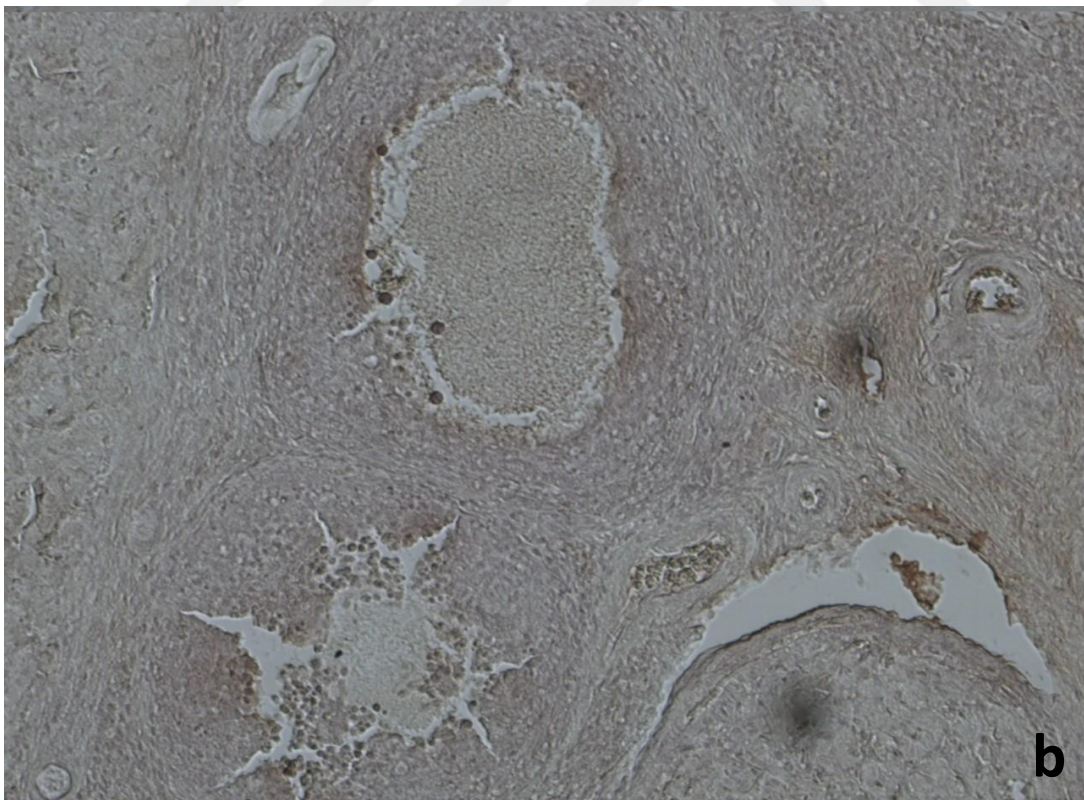
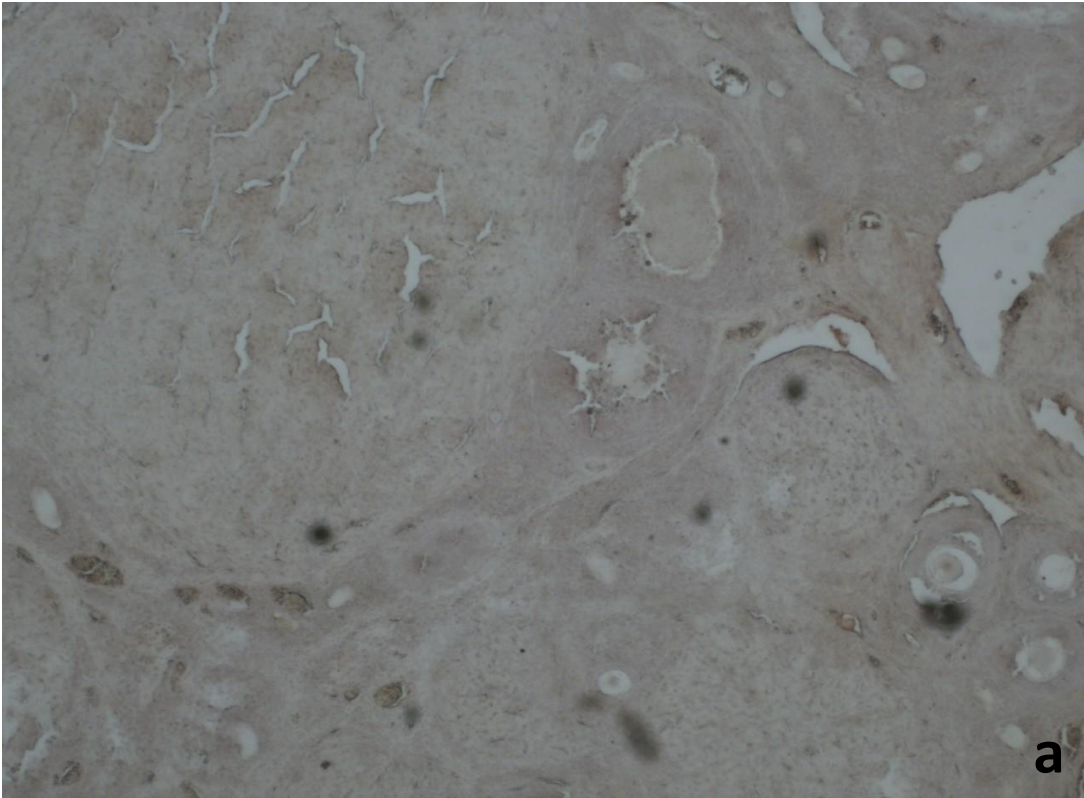
**Şekil 17: a:** Oda havasında 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması 4x, **b:** 10x, **c:** 20x

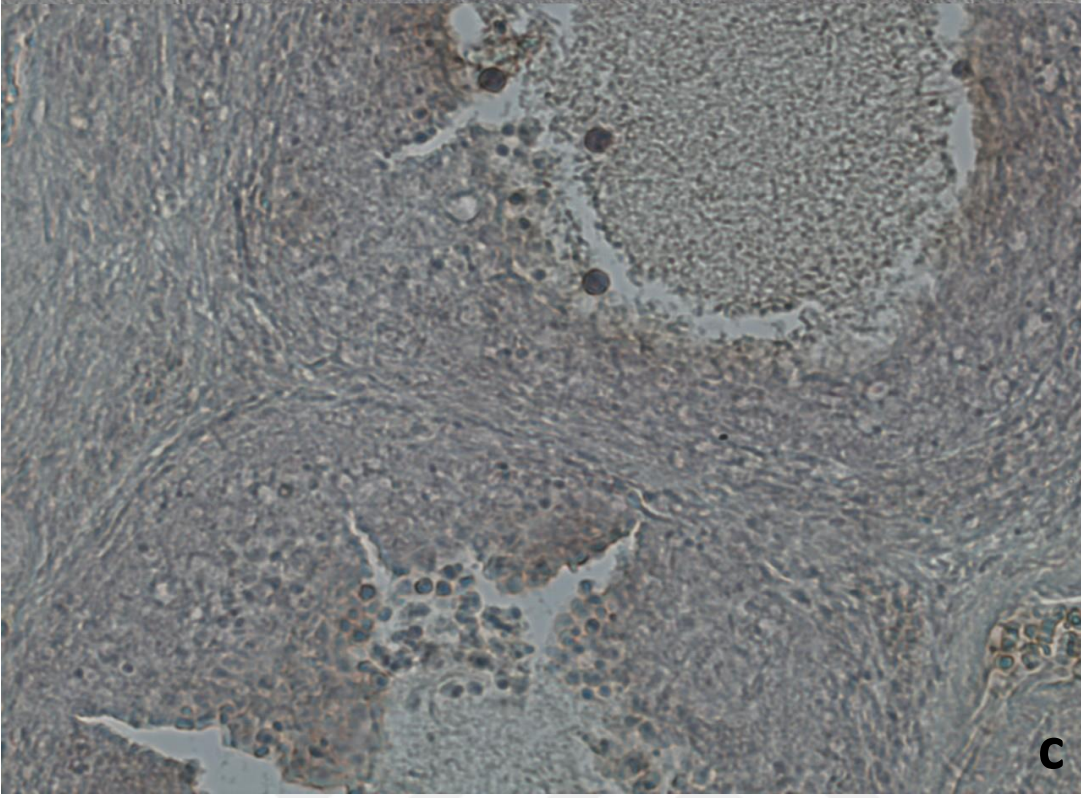




**Şekil 18: a:** Kontrol grubu (grup I) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması 4x,  
**b:** 20x

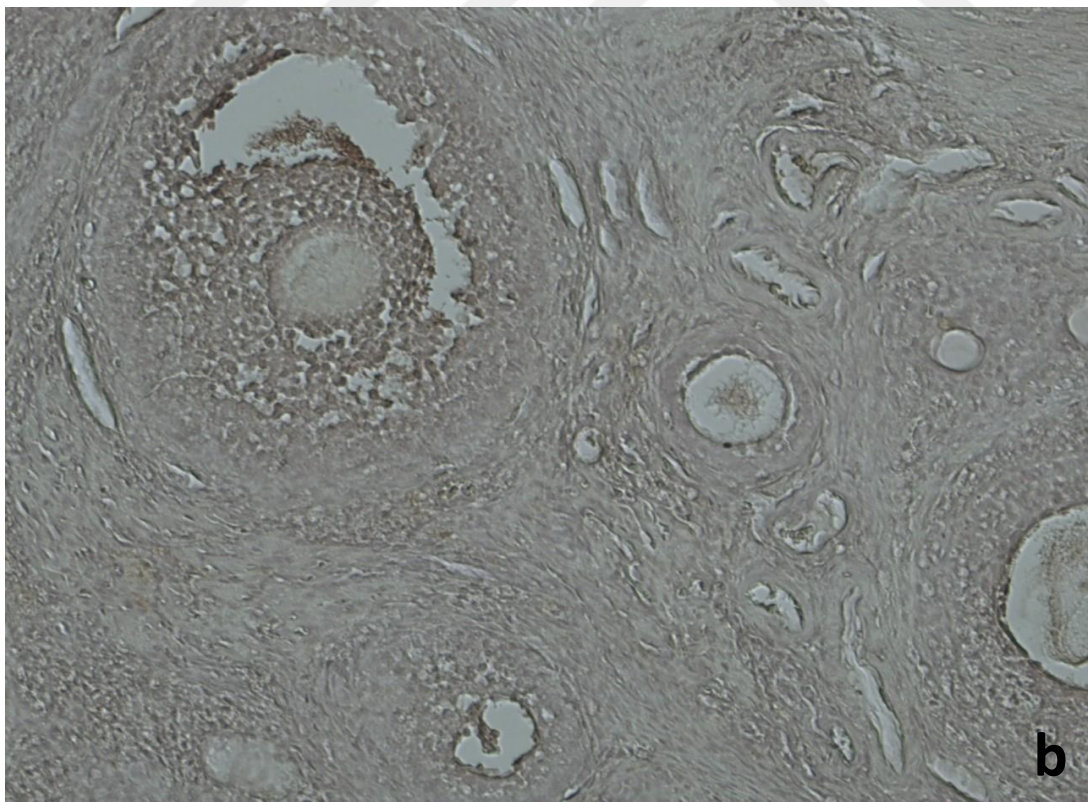
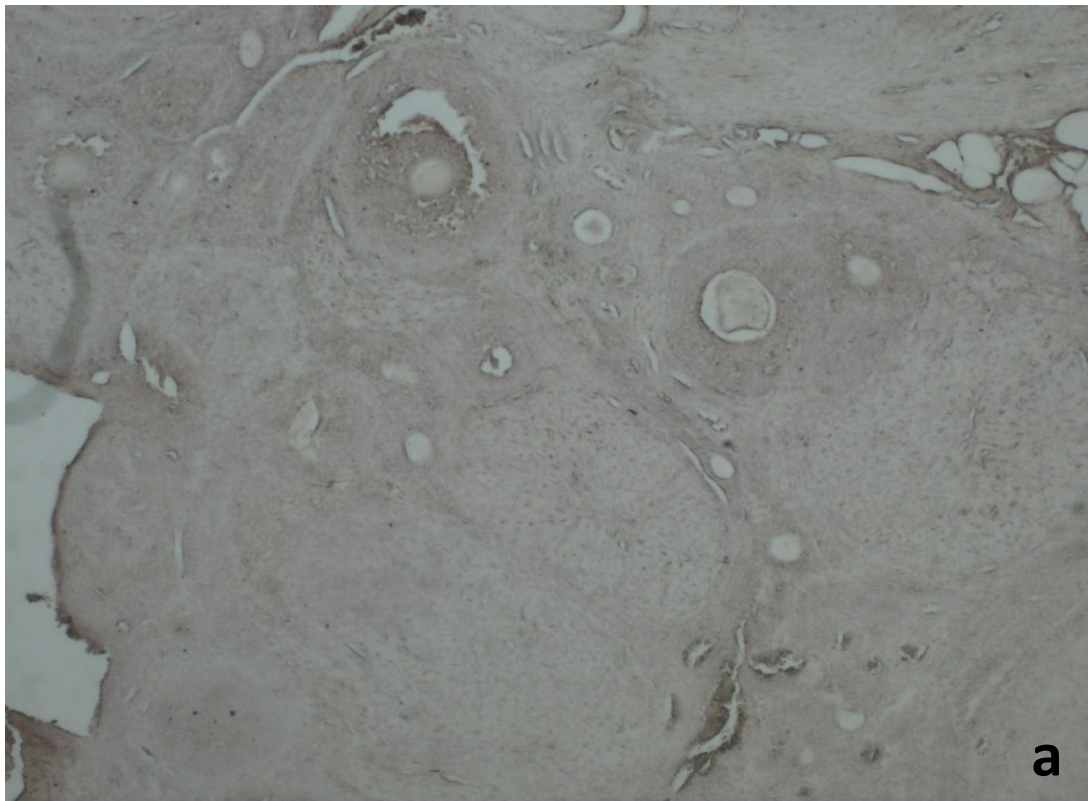


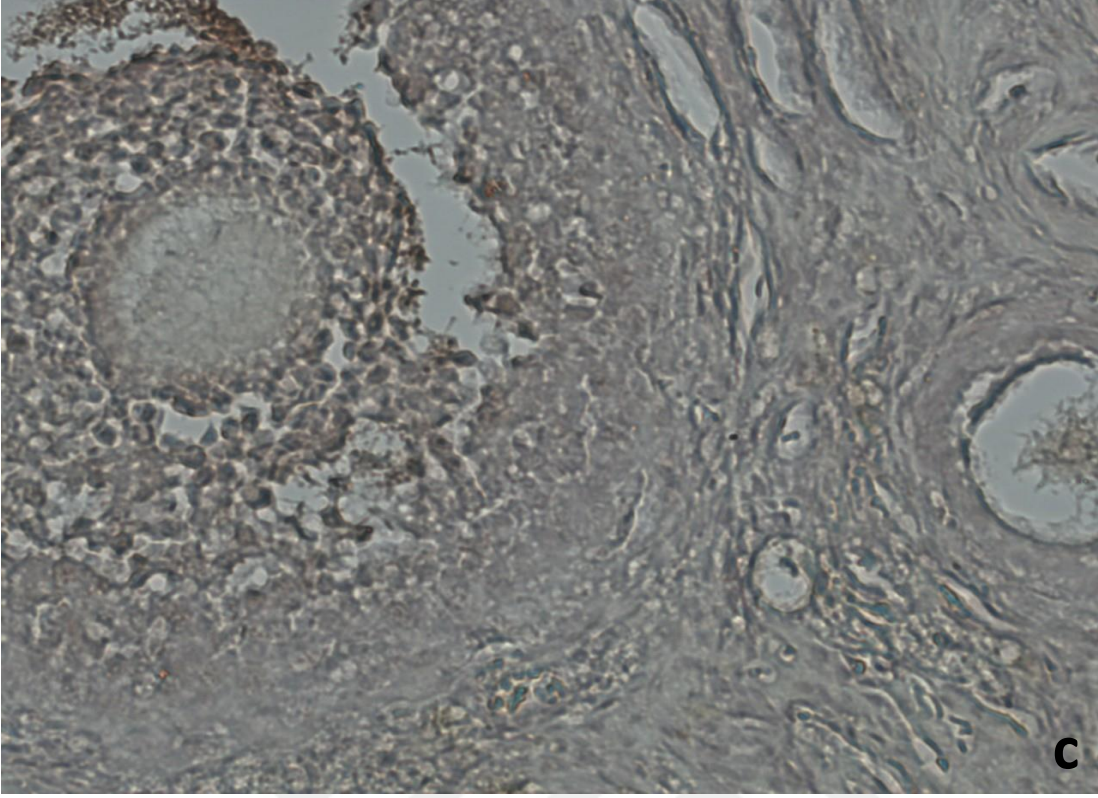




**Şekil 19: a:** Sigara dumanına maruz kalan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup VI) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması 4x, **b:** 10x, **c:** 20x

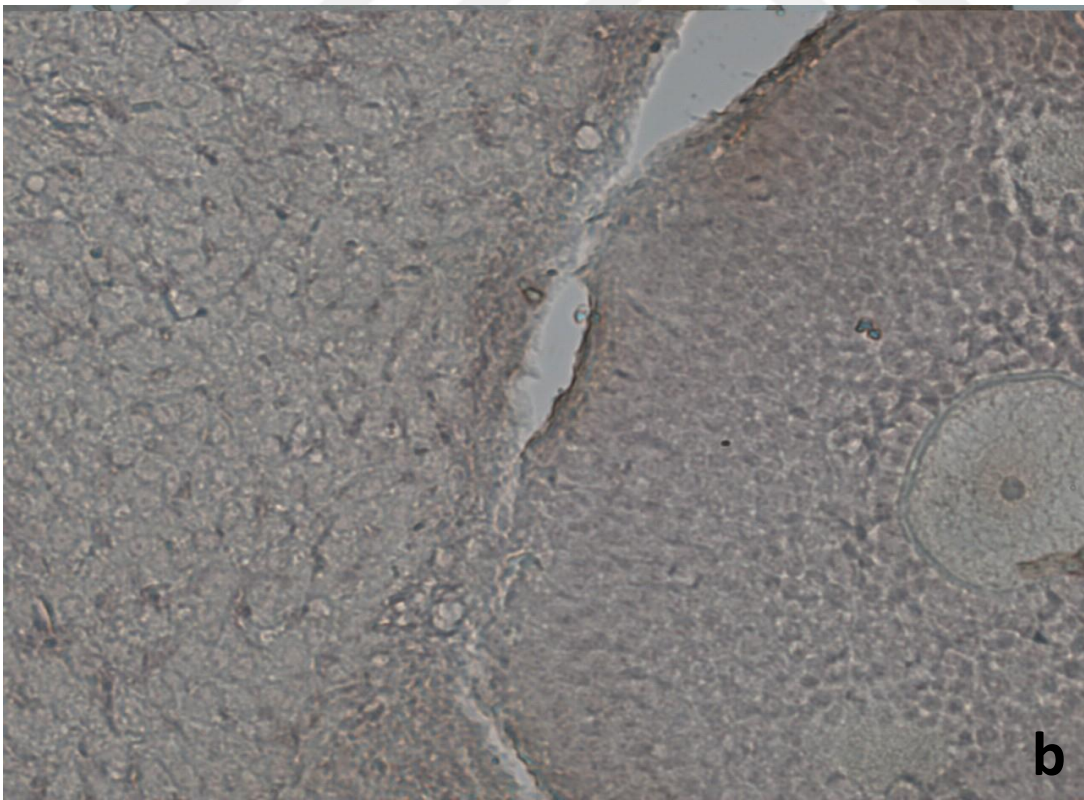


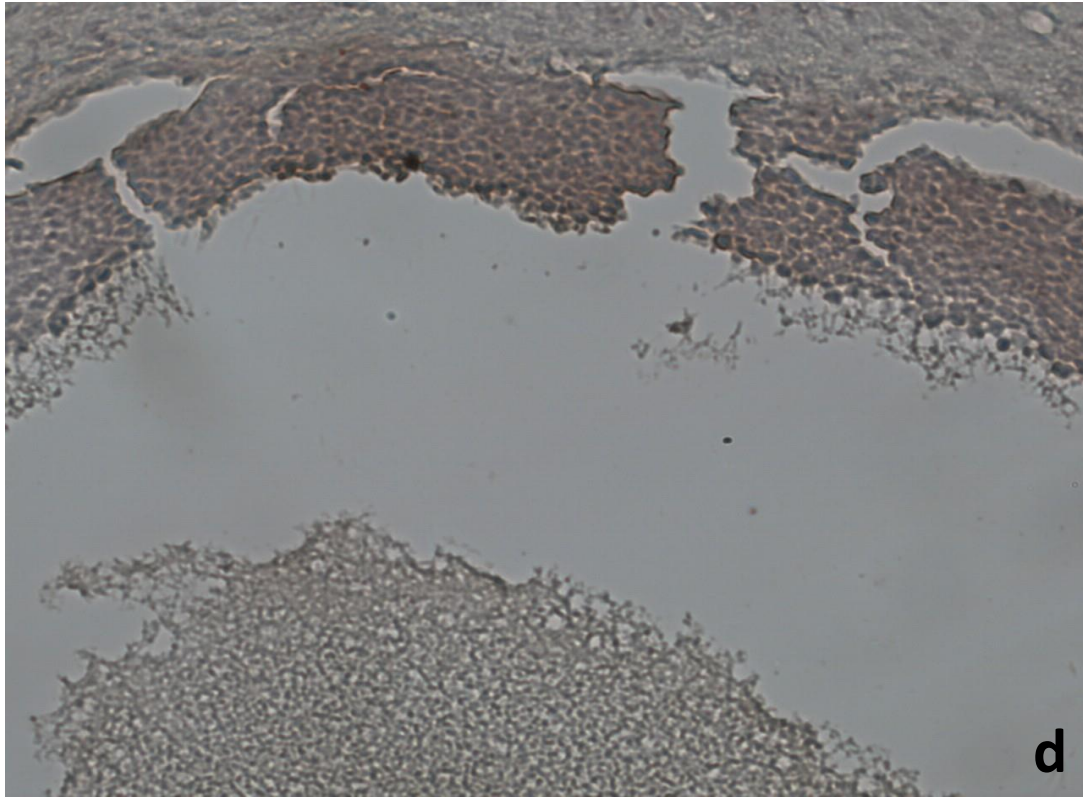
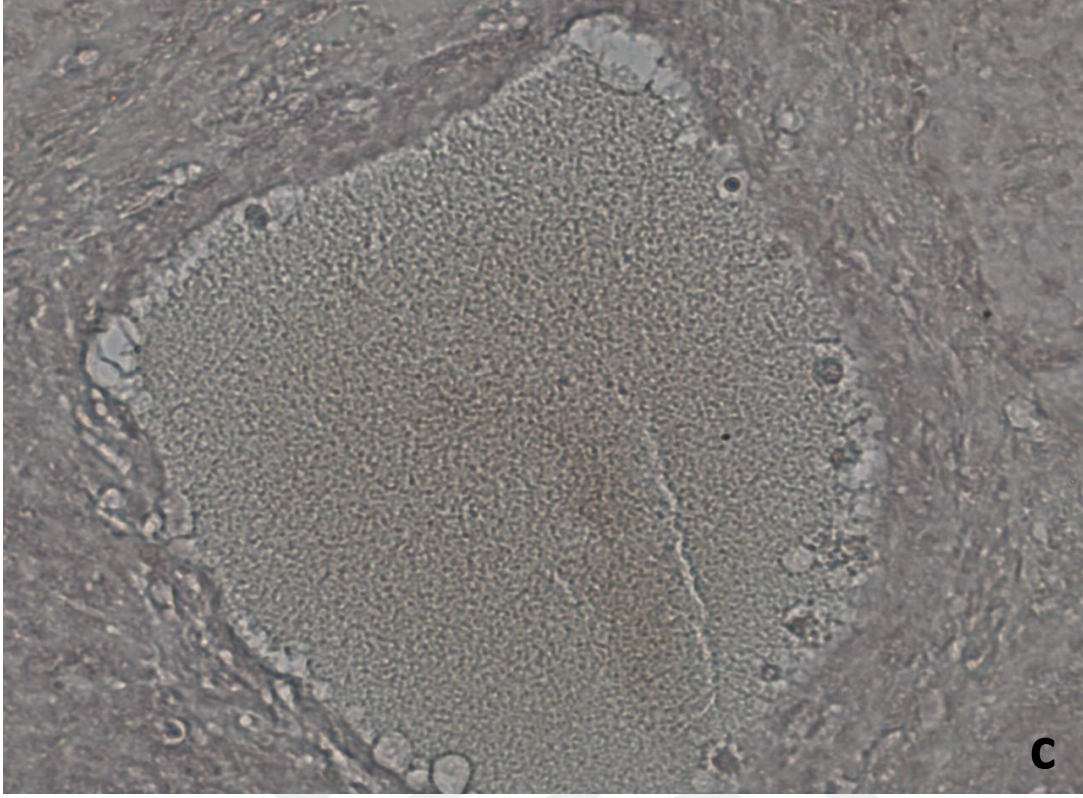




**Şekil 20: a:** Oda havasında 10 mg melatonin uygulanan grup (grup III) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması 4x, **b:** 10x, **c:** 20x

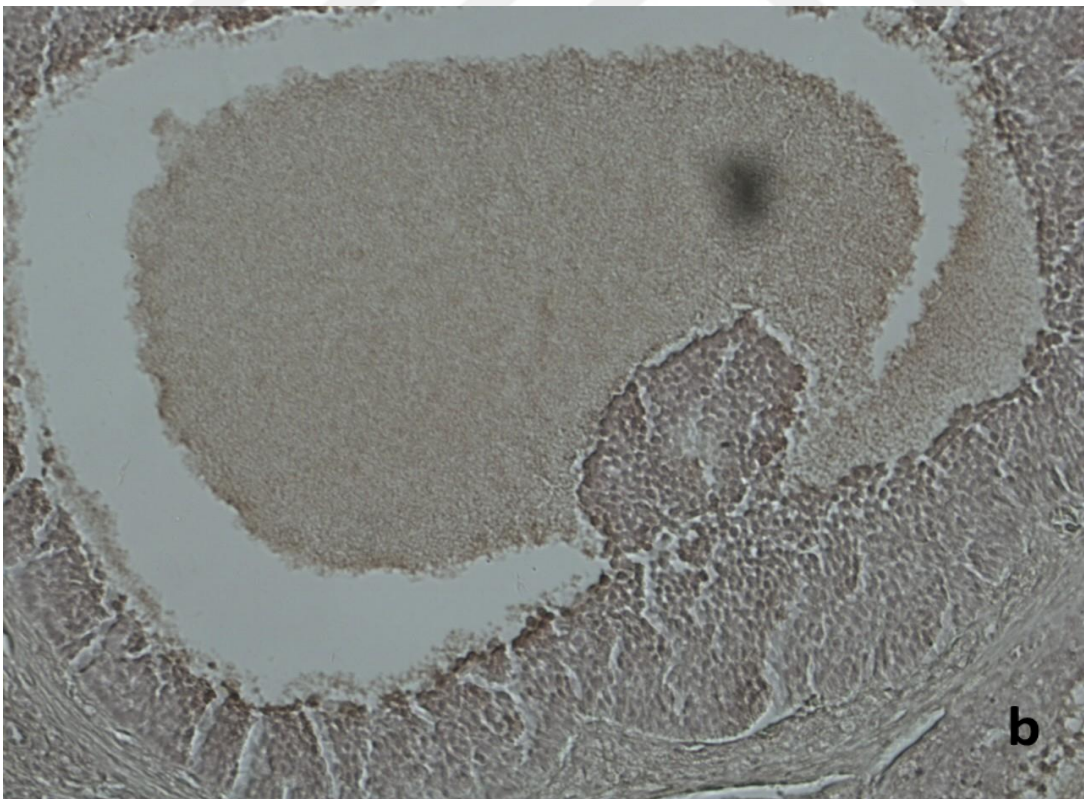
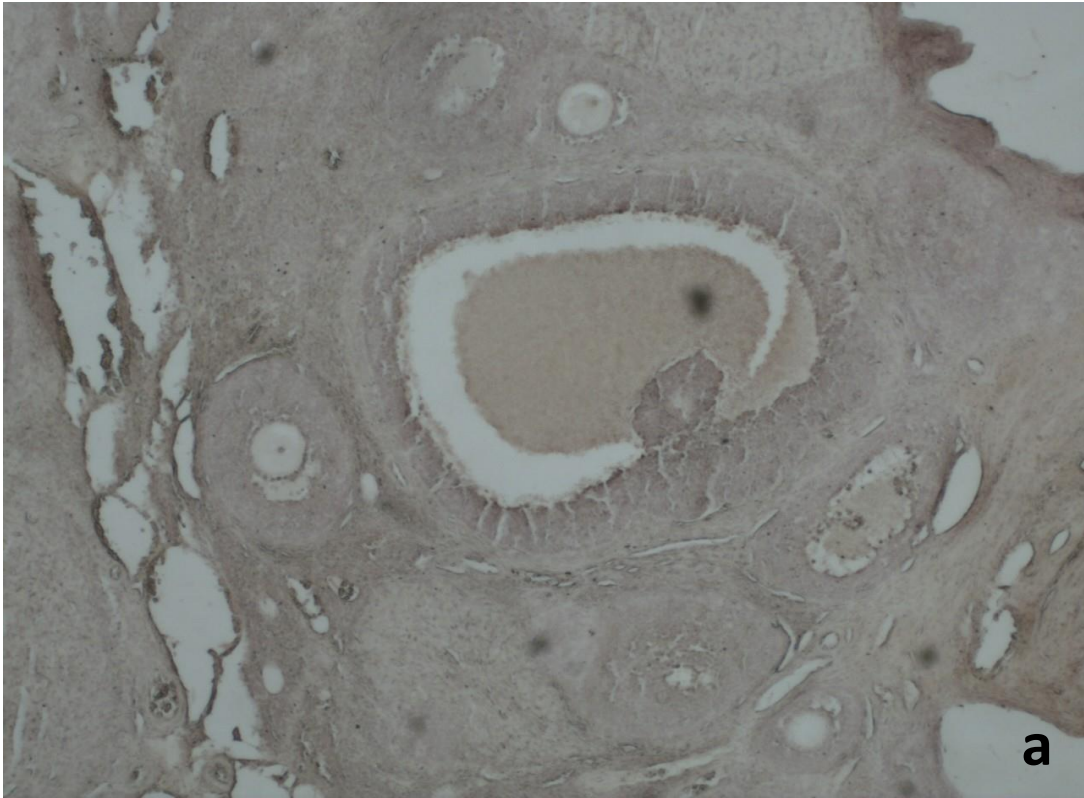


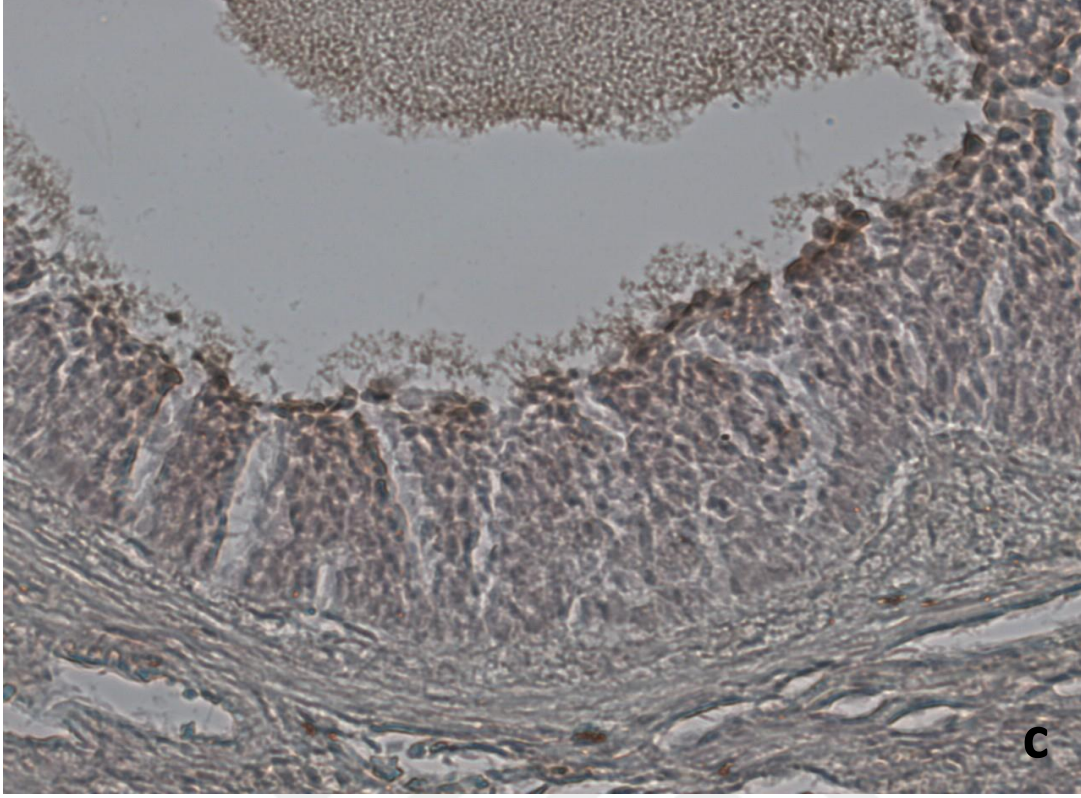




**Şekil 21:** a: Sigara dumanına maruz kalan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup V) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması 4x, b: 10x, c: 20x, d: 40x



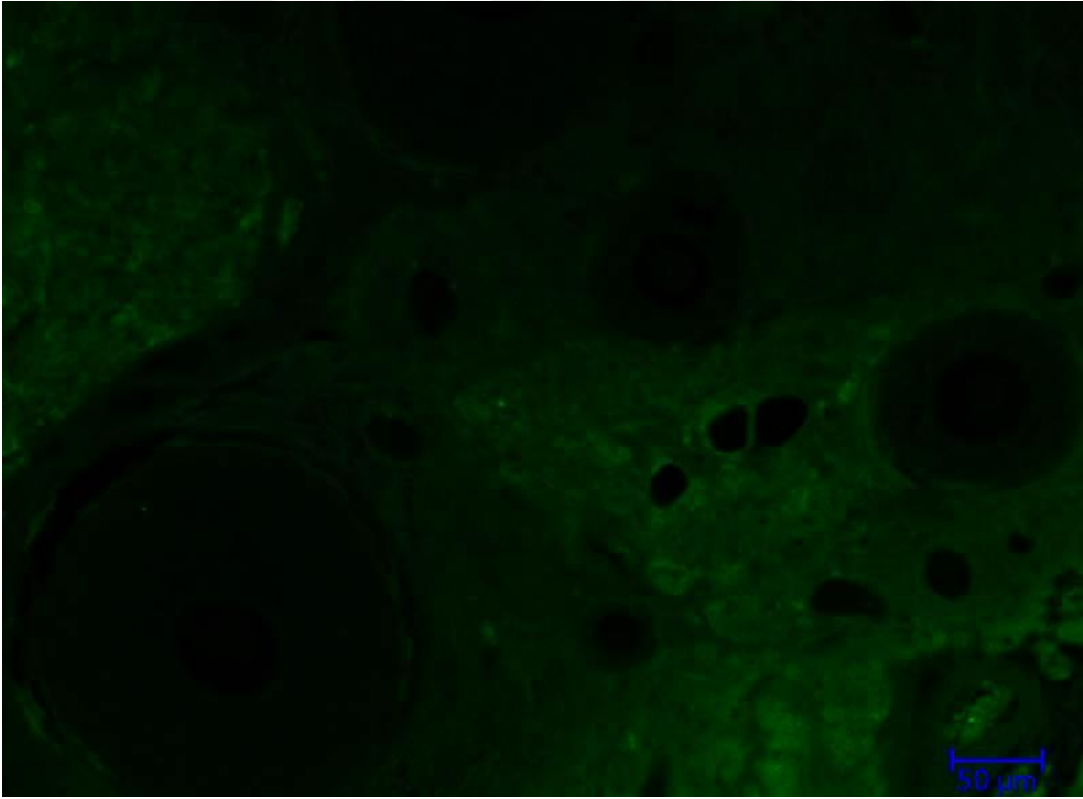
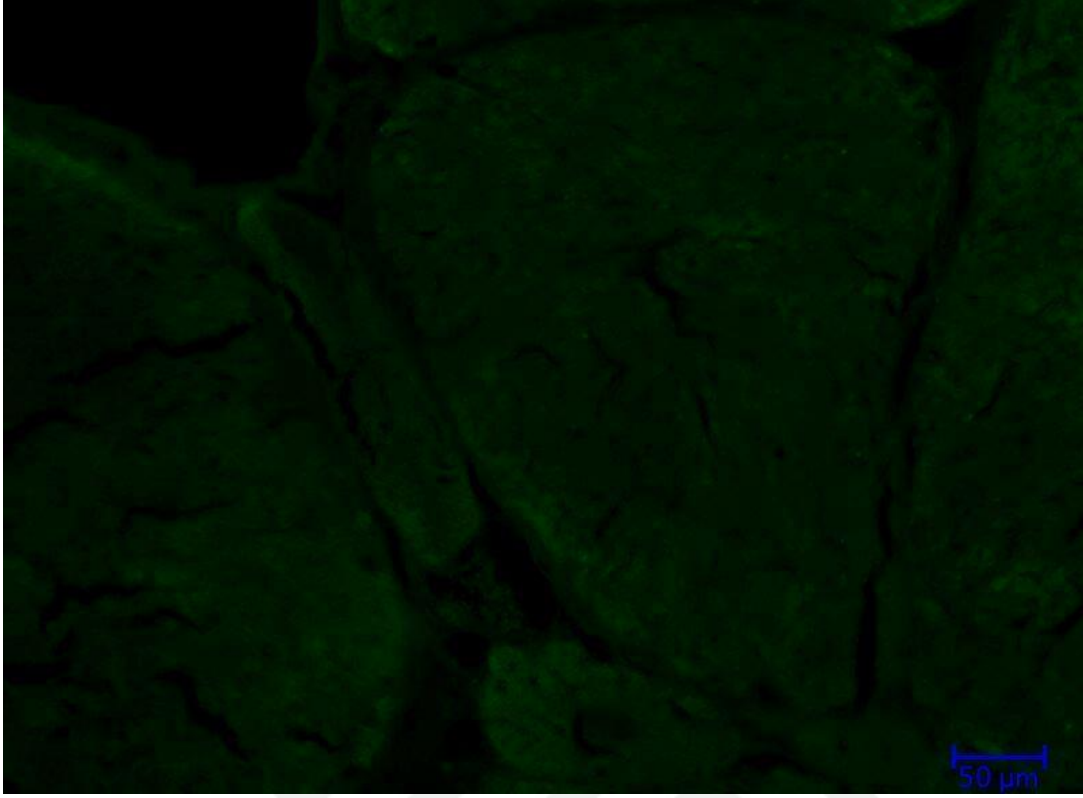




**Şekil 22: a:** Sadece sigara dumanına maruz kalan grup (grup II) anti-caspase 3 immünohistokimyasal boyaması 4x, **b:** 10x, **c:** 20x

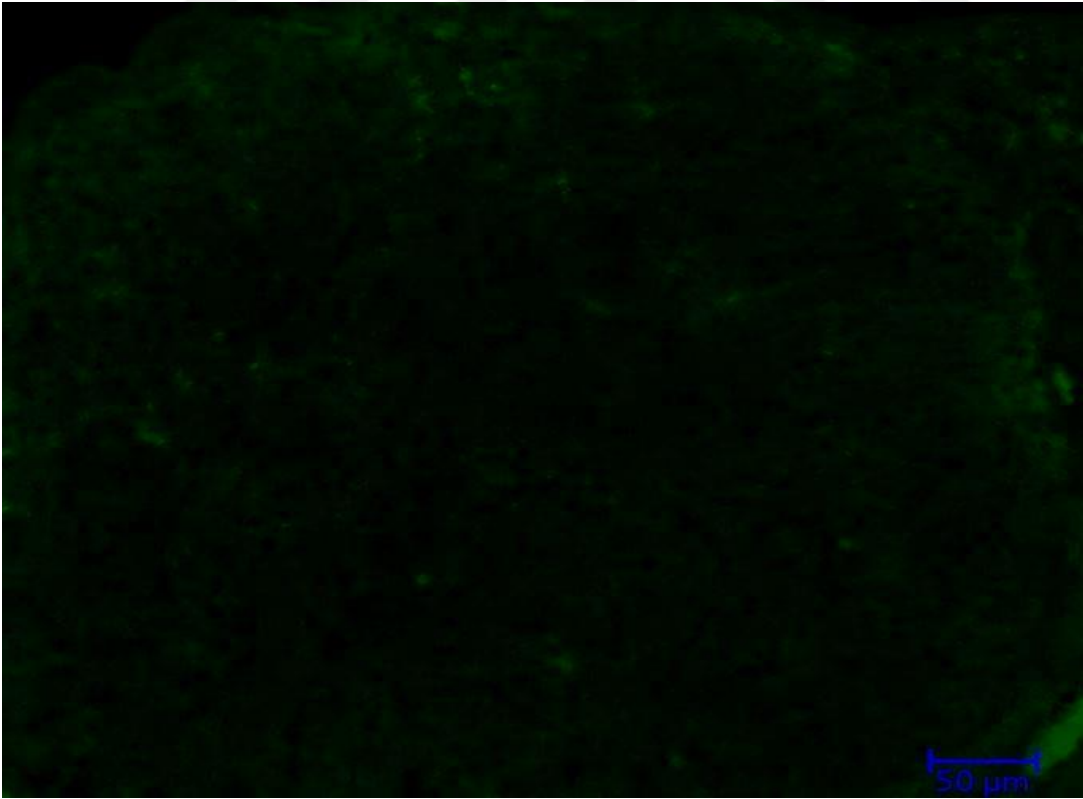
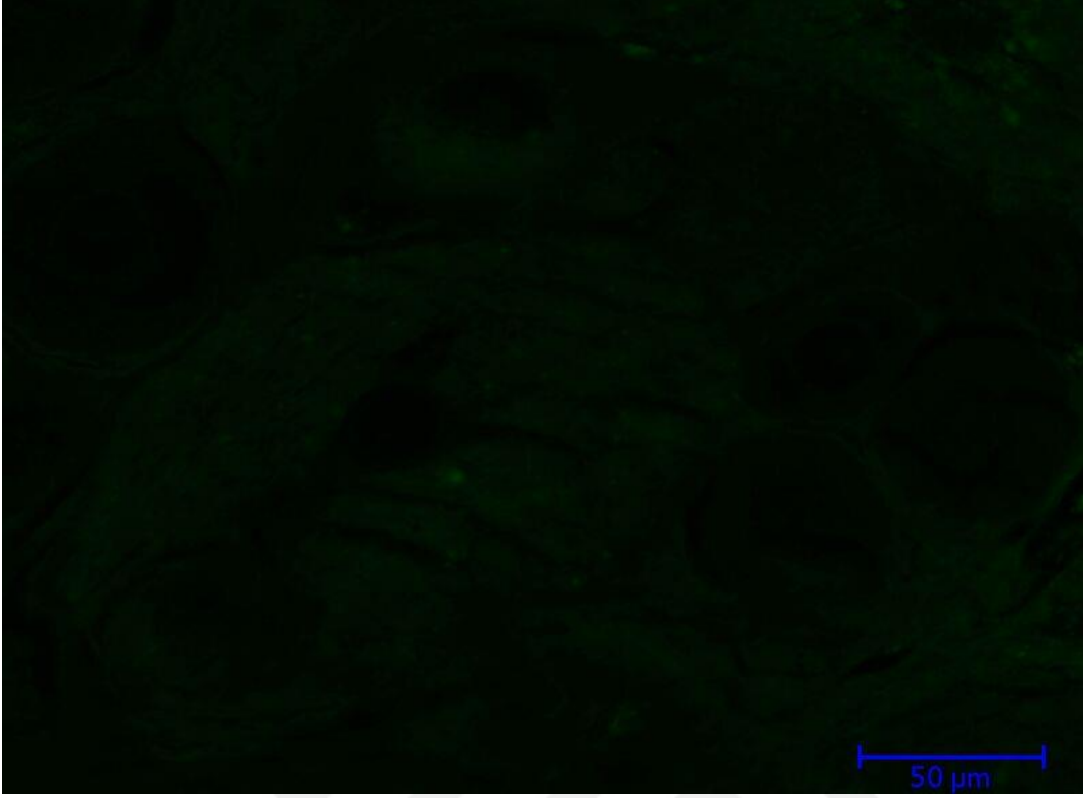
TUNEL boyaması uygulanan gruplarda izlenen apoptotik hücrelerin boyanması ve boyanma şiddetleri şekil 23-28’de gösterilmiştir.

Sadece sigara dumanına maruz kalan grupta (grup II) TUNEL boyaması sonucunda apoptotik hücreler çok sayıda ve yoğun bir şekilde boyanırken, sigara uygulanan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grupta (grup IV) apoptotik hücrelerin belirgin bir şekilde çok az olarak görüldüğü ve yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Sigara uygulanan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grupta (grup V) ise apoptotik hücrelerin sigara dumanına maruz kalan gruba (grup II) kıyasla daha az olduğu ancak sigara uygulanan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) kadar etkili olmadığı görülmüştür.



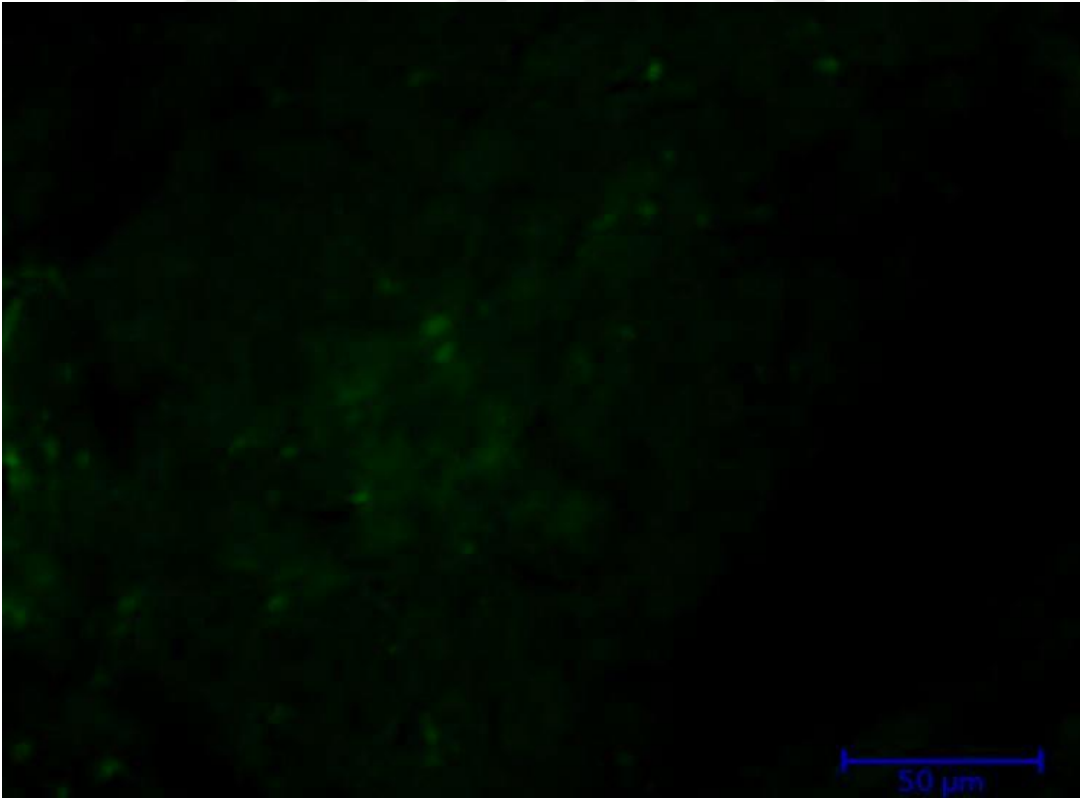
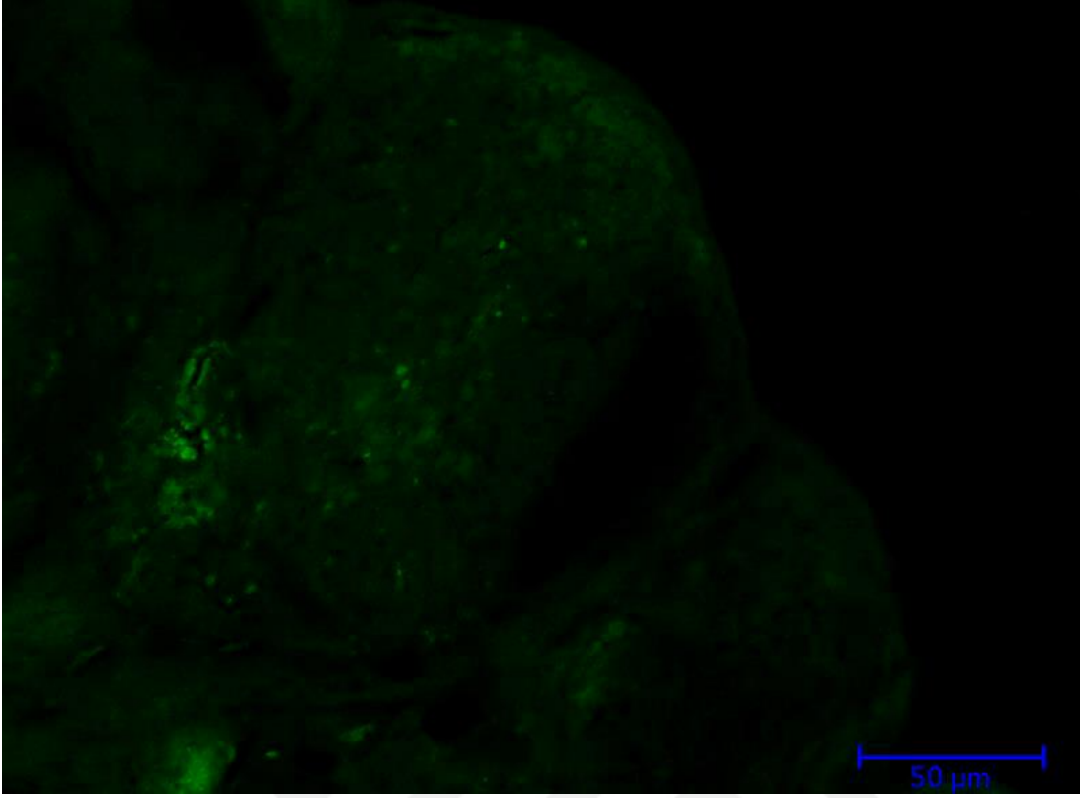
**Şekil 23:** Oda havasında 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup IV) TUNEL boyaması



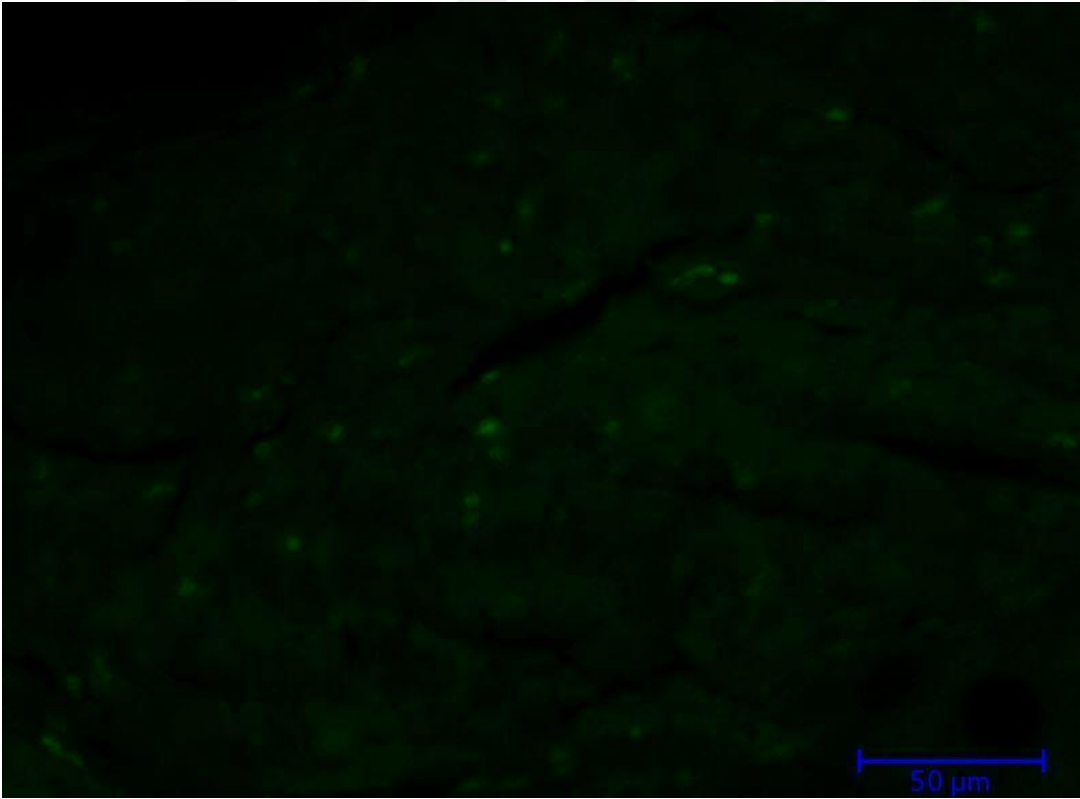
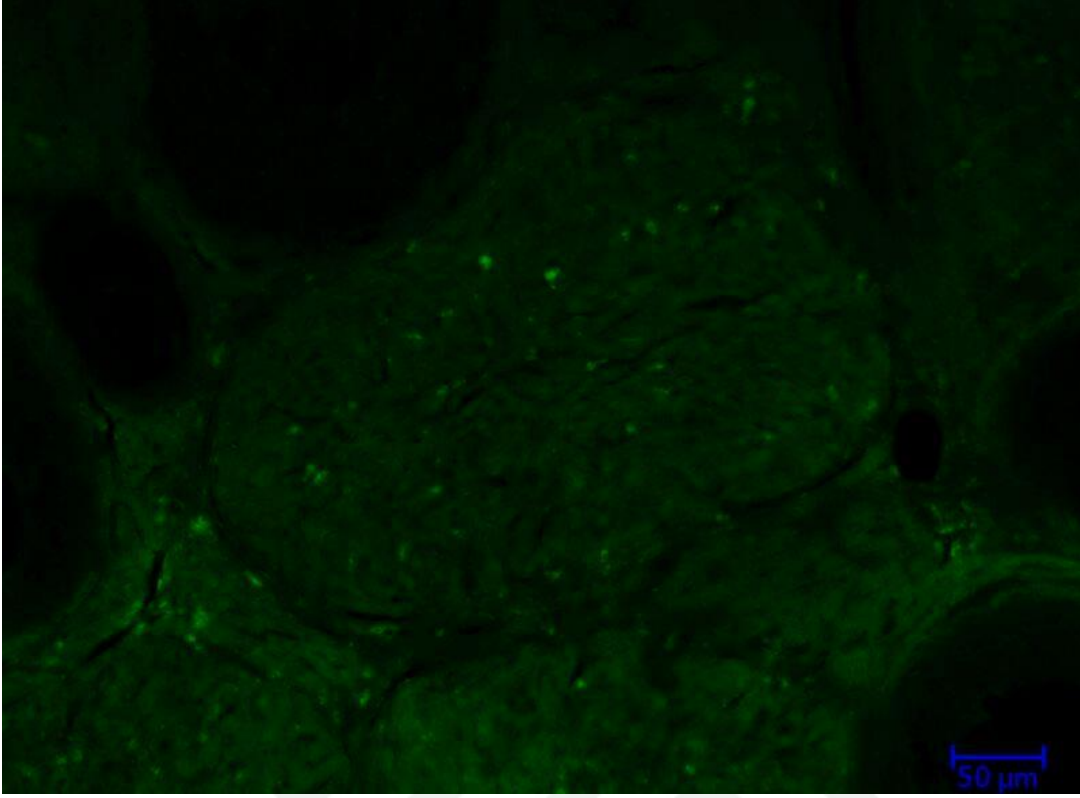


**Şekil 24:** Kontrol grubu (grup I) TUNEL boyaması

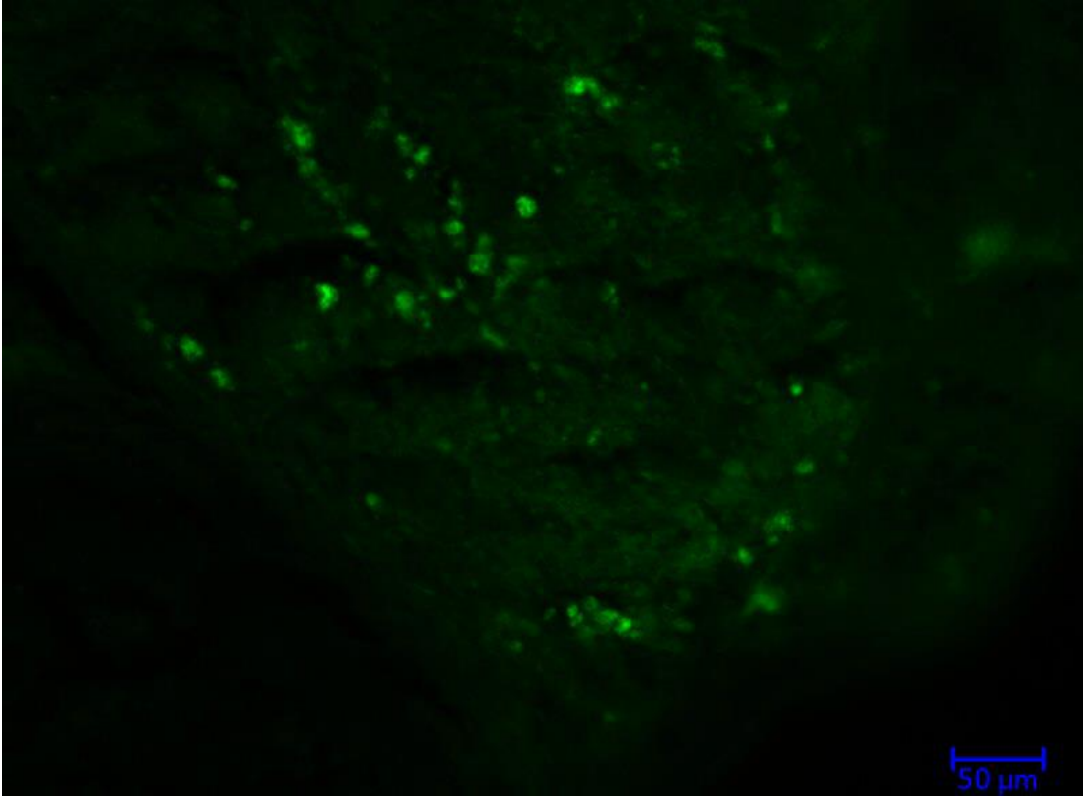
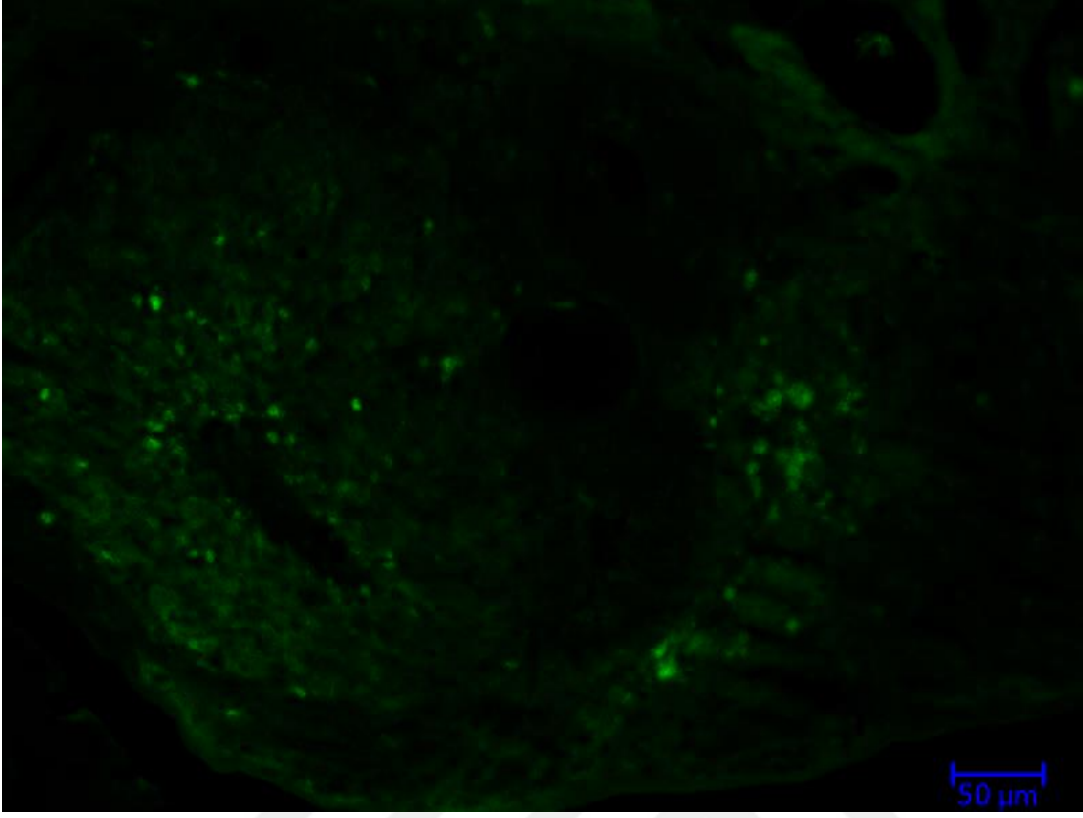




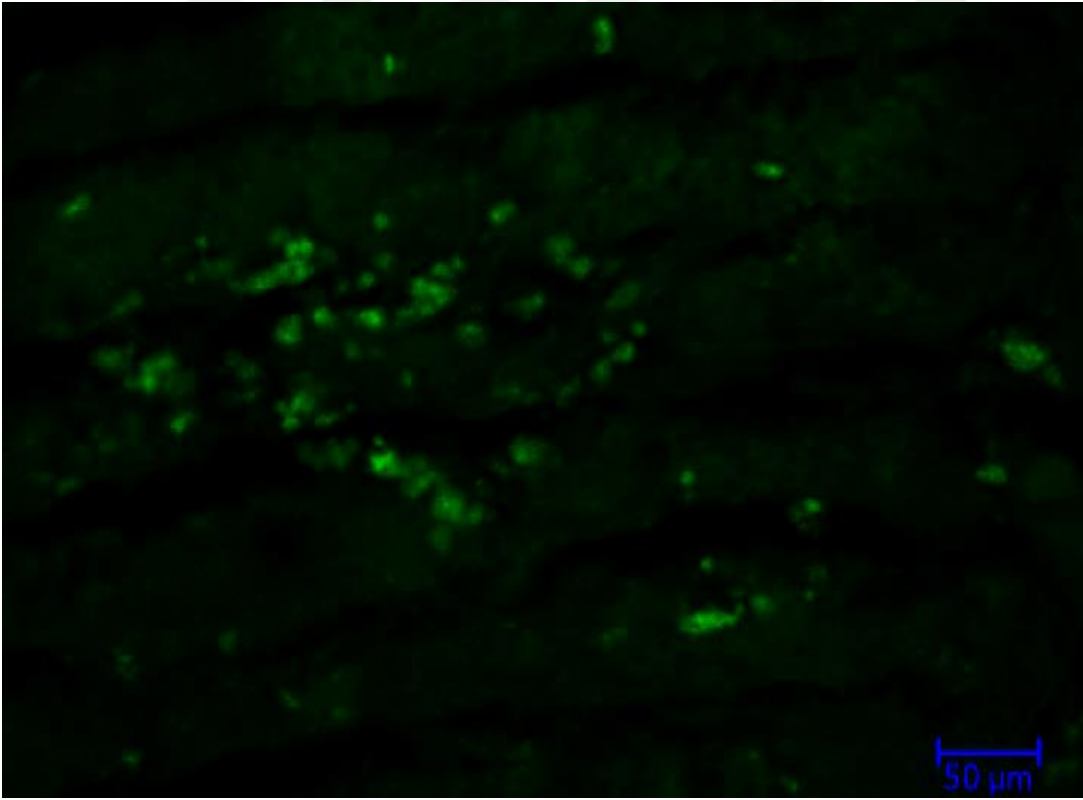
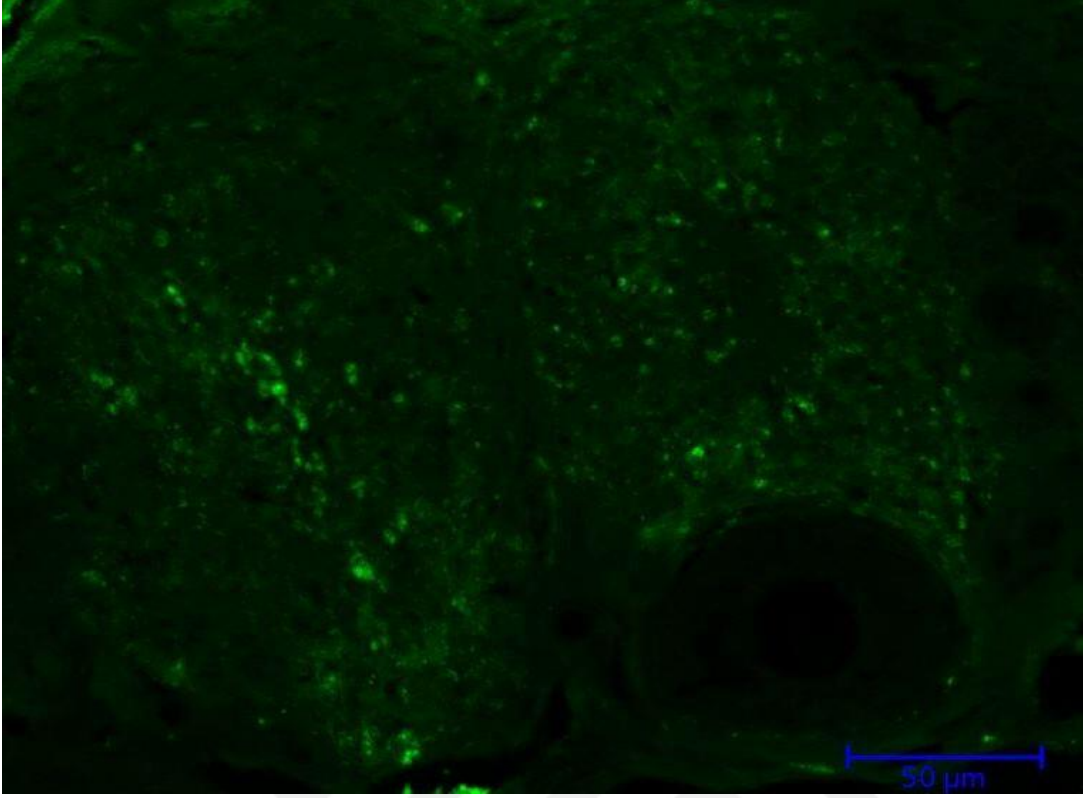
**Şekil 25:** Sigara dumanına maruz kalan + 20 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup VI) TUNEL boyaması



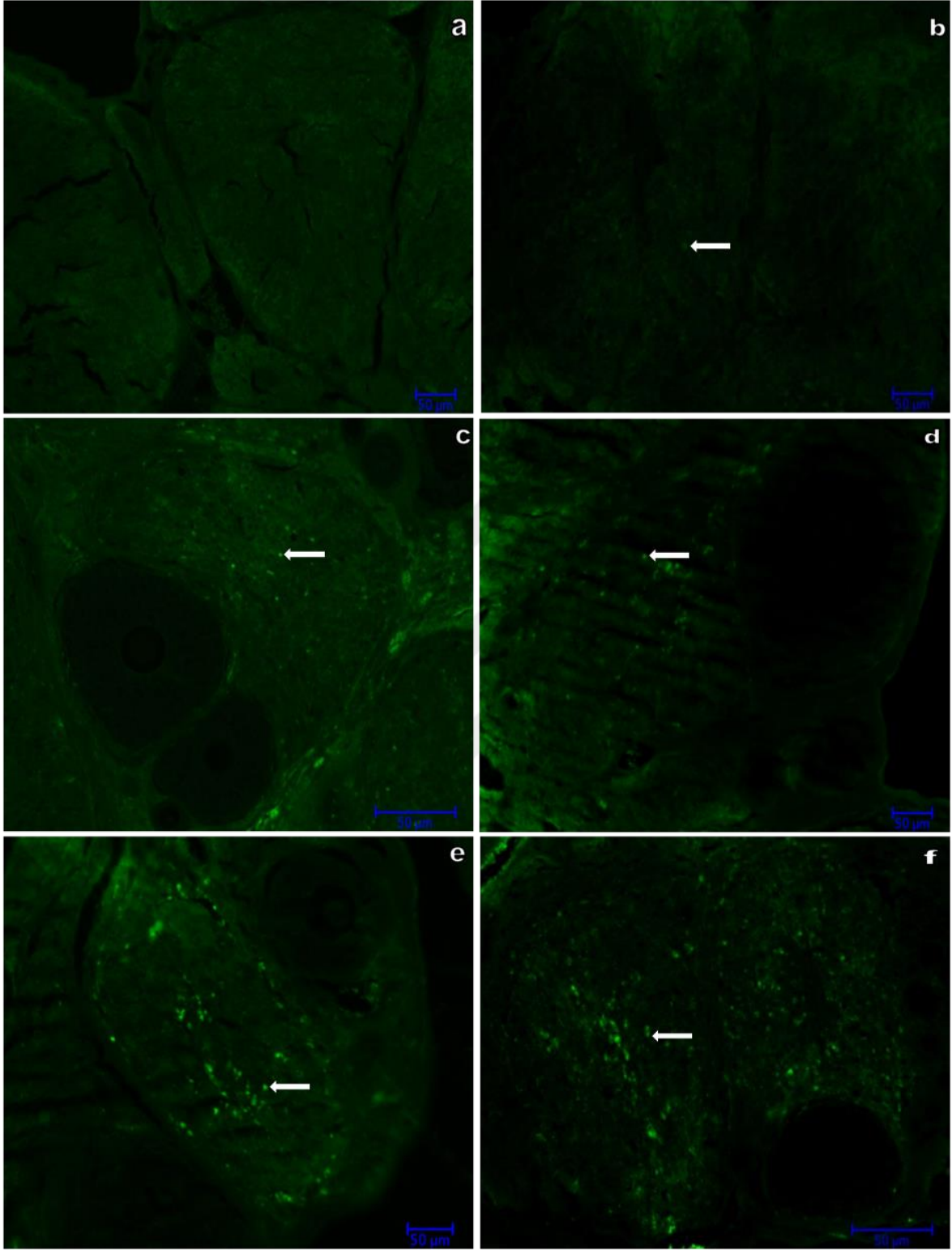
**Şekil 26:** Oda havasında 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup III) TUNEL boyaması



**Şekil 27:** Sigara dumanına maruz kalan + 10 mg/kg melatonin uygulanan grup (grup V) TUNEL boyaması



**Şekil 28:** Sadece sigara dumanına maruz kalan grup (grup II) TUNEL boyaması



**Şekil 10: İmmunfloresan boyanma ile bakılan gruplar arası tünel görüntüleri**

A: Oda havasında 20mg/kg melatonin uygulanan (grup IV), B: kontrol grubu (grup I), C: sigara dumanına maruz kalan 20mg/kg melatonin uygulanan ( grup VI), D: oda havasına 10mg melatonin uygulanan (grup III) , E: sigara dumanına maruz kalan 10mg/kg melatonin uygulanan (grup V), F: sadece sigara dumanına maruz kalan (grup II), (oklar apoptotik hücreler) (büyütme 10x)

## 5. TARTIŞMA

Kronik olarak sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda melatoninin over rezervi üzerine etkilerini değerlendirdiğimiz tez çalışmamızda, gerek biyokimyasal olarak gerek histolojik olarak sigaranın over üzerine olumsuz etkilerini saptadık. Tez çalışmamızdaki veriler neticesinde literatürden farklı olarak 20 mg melatonin uygulanması halinde anti-oksidan etkinin daha belirgin olduğu sonucuna vardık.

İntrauterin dönemde belli sayıda oosit birinci mayoz aşamasında arrest halde kalmış olarak primordial folikül içerisinde yer alır. Sigara içerisinde yaklaşık 4000 kimyasal madde yer almaktadır ve over rezervi üzerine olumsuz etkisi çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur.<sup>10</sup> Sigaranın olumsuz etkilerini değerlendiren hayvan çalışmalarında literatürde genellikle iki farklı model kullanılmıştır: tüm vücut sigara maruziyeti ve sadece nazal sigara maruziyeti.<sup>10 11</sup> Bu açıdan bakıldığında tüm vücut sigara maruziyetinde bizim tez çalışmamızda olduğu gibi ratlar bir düzenek içerisine yerleştirilir ve bu şekilde primer nazal ancak yanı sıra oral ve dermal maruziyet de söz konusu olur. Bu şekilde bir düzenekle Gannon ve arkadaşları 8 hafta süre ile haftada 5 gün ve günde 2 defa sigara içirilmiştir.<sup>195</sup> Benzer olarak Tuttle ve arkadaşları 8 hafta süre ile haftada 7 gün ve günde 2 defa sigaraya maruz bırakmışlardır.<sup>196</sup> Her iki çalışmada da over hacimleri ve primordial folikül sayısı sigra içen grupta daha az olarak belirlenmiş. Bunun yanısıra iki çalışma arasında büyümekte olan foliküller açısından farklılıklar saptanmış. Gannon ve arkadaşlarının çalışmasında 5 gün maruziyet ile daha az gelişmekte olan folikül saptanırken, Tuttle ve arkadaşlarının çalışmasında 7 günlük maruziyete karşılık azalma saptanmamıştır.<sup>195 196</sup> Bizim çalışmamızda H&E ile boyanan preparatlarda bakılan folikül sayılarında tüm aşamalarda, primordial folikül, primer folikül ve sekonder folikül düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır. Matür foliküller ise literatür ile benzer olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Folikül düzeylerindeki bu azalma, sigaranın over rezervini azalttığını göstermektedir. Sadece nazal sigaraya maruz bırakılan ratlarda oluşturulan model de ise özel düzeneklerle direkt nazal inhalasyon sağlanmakta ve dermal maruziyet daha az ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde dizayn edilmiş olan Sobinoff ve arkadaşlarının iki ayrı çalışmasında DMBA uygulaması sonrasında kompanzatuvar primer folikül aktivasyonu gerçekleştiği ortaya koyulmuştur. Bu çalışmalarda özellikle sekonder



ve antral foliküllerde ortaya çıkan hızlanmış atrezi neticesinde primordial folikülden primer foliküle geçişte bir hızlanma olduğu belirlenmiştir.<sup>12 19</sup>

Sigaranın over rezervi ve folikül sayıları üzerine olumsuz etkilerinin kaçınılmaz olduğu literatürde gösterilmişse de bu etkilerin hangi mekanizma ile gerçekleştiği konusunda ortak bir konsensu söz konusu değildir.<sup>7</sup> Primat modellerde primordial foliküllerin toksik ajanlara oldukça hassas olduğu literatürde gösterilmiştir.<sup>197 198 199 200</sup> Özellikle apoptozis (programlı hücre ölümü) mekanizması üzerinde yoğunlaşmış ve pro-apoptotik belirteçler incelenmiştir.<sup>19</sup> Literatürde tüm vücut sigara maruziyeti ile pro-apoptotik belirteçlerde artış belirlenmezken, sadece nazal maruziyette belirgin olarak pro-apoptotik belirteç sıklığında artış saptanmıştır.<sup>12 195 196</sup> Bizim çalışmamızda apoptotik indeksler ve H-scorelar değerlendirildiğinde ise sigara apoptozu artırdığı sonucuna varılabilir. Aynı zamanda immunohistokimyasal olarak anticaspas-3 ile yapılan değerlendirmede, apoptotik indeks ve H-score sonucunda da bu olumsuz etkiler gözlenmektedir. İmmunofloresan boyama ile tünel görüntüleri bakıldığında overdeki stromadaki artmış stromal apoptoz bunu kanıtlar niteliktedir. Doku düzeyinde MDA düzeylerinde yapılan değerlendirmede anlamlı fark görülmemesinin nedeni ise yeterli süre sigara dumanına maruz kalınmadığını gösteriyor olabilir.

Oosit maturasyonunda rol alan temel mekanizmalar mayozun tamamlanması, mayotik iğciğin metafaz II'ye progresyonu, oositin fertilizasyonu için sitoplazmik değişiklikler ve ardından embriyonik gelişimi içermektedir. Sigara kullanımı ekzojen pro-oksidan için temel kaynaklardan birisini oluşturmaktadır ve içerisinde yoğun miktarda serbest oksijen radikalleri (SOR) mevcuttur.<sup>201</sup> Sigara sonrası kanda düzeyi artan SOR neticesinde pro-oksidan-anti-oksidan arasındaki denge prooksidasyon lehine değişmekte ve sonuçta oksidatif stres ortaya çıkmaktadır.<sup>202</sup> Oksidatif stres DNA, protein ve lipid gibi birtakım hayati vital moleküllerin dekompanzasyonuna neden olur. Bu dekompanzasyona yol açan mekanizmalardan bir tanesi de sigara kullanımı neticesinde matür over folikülü içerisinde lipid peroksidasyonunda artış gözlenmesidir ve neticede lokal antioksidatif süreçte azalma ortaya çıkmaktadır.<sup>203</sup> Overlerdeki serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu bu hasarı düzelmek için çalışan antioksidan mekanizmaları değerlendirmek gerekmektedir.

Literatürde sigara kullanıcılarında hem enzimatik hem de non-enzimatik olarak anti-oksidan düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.<sup>204 205</sup> Bu çalışmalarda, foliküler sıvıda antioksidan kapasite düşük olarak saptanmış ve bunun nedeni olarak da reaktif oksijen ürünlerine karşılık ortaya çıkan anti-oksidatif reaksiyon neticesinde savunma amacıyla kullanıldığı savunulmuştur. Bizim çalışmamızda değerlendirilen biyokimyasal parametreler doku ve serum düzeyinde antioksidan mekanizmaların anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir.

Melatoninin antioksidatif enzimler üzerinden direkt ya da indirekt etki göstermesi güçlü bir antioksidan olarak kullanımını gündeme getirmiştir.<sup>206</sup> Özellikle son derece düşük toksisite özelliği, saf halde bulunabilmesi ve göreceli olarak kolay ulaşılabilir ve pahalı olmaması kullanım alanını genişletmiştir.

Reaktif oksijen türleri matürasyon aşamasında ve en son final matürasyon sürecinde diploten aşamasında mayotik oositlerin yeniden aktive edilmesini sağlayarak gelişimsel potansiyellerini arttırmırlar.<sup>207</sup> Yaşlı oositlerde örneğin metafaz II' de arrest halde bulunan oositlerde, O<sub>2</sub> radikalleri daha fazla oranda üretilirler. Yüksek enerji elektronlar elektron transport zincirinden kaçması neticesinde hücre düzeyinde oksidatif hasar artar.<sup>208</sup> Tıpkı serbest oksijen radikalleri olduğu gibi foliküler somatik hücreler yada oosit tarafında üretilen yüksek NO düzeyleri oosit matürasyonu ve fizyolojisinde önemli rol alırlar.<sup>209</sup> NO, nitrik oksid sentetaz enzimi de dahil olmak üzere memeli overlerindeki birtakım hücrelerden sentezlenir. NO düzeylerinde azalma, serbest oksijen radikallerinin ortada daha fazla bulunmasına yol açarak hücre düzeyinde hasar oluşturabilir.<sup>208 209</sup> Sigara kullanımı gibi oksidatif hasar durumlarında artmış SOR düzeyleri oosit yaşlanması ve neticede oosit kalitesinin bozulmasına yol açar. Oksidatif reaksiyonlar oksidasyon mekanizması üzerinden oosit DNA'sının primer yapısını bozabilir. Aynı zamanda membran lipid içeriğini değiştirirler ve oosit içerisindeki sitozolik Ca düzeylerini arttırmırlar. Kalsiyum iyonu iç mitokondrial membrandaki yapısal değişiklikleri hızlandırır ve SOR düzeyini arttırarak mitokondrial solunumsal zincirinde fonksiyon bozukluğuna yol açar. Bu aşamada anti-oksidan etkili olabilecek melatonin gündeme gelmiştir. Melatoninin etki mekanizması direkt olarak birtakım toksik reaktanların nötralizasyonu olabileceği gibi



birtakım antioksidan enzimlerin indüksiyonunda da görev alır. Oksidatif stresin azaltılması ile ilgili olarak melatonin rolü GSH (hücre içerisinde yer alan güçlü bir antioksidan) sentezinin stimülasyonu, mitokondriyal elektron transport zincirinden elektron kaçıının azaltılması (serbest radikal oluşumunu azaltır), inflamatuvar süreçlerin sitozin üretiminin sınırlandırılması (toksik reaktan oluşumunun azaltılması) ve C, E vitamini ya da glutastyon gibi klasik antioksidanlar ile sinerjistik etki gösterir.<sup>36</sup> Bunun yanısıra melatonin sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonunu azaltarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından uyarılan apoptozisi inhibe eder. Direkt olarak foliküler sıvıda yer alan melatonin preovulatuvar folikülün gelişerek fertilizasyon aşamasına ulaşmasına da katkı sağlayabilir.

Bizim tez çalışmamızda, oda havasında alınan melatonin doku düzeyinde SOD, Gpx ve katalaz seviyelerini anlamlı bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Keza sigara dumanına maruz kalanlarda melatonin 10mg kullanımı sonrasında oda havasına göre göreceli olarak doku katalaz seviyelerini artırdığı gözlenmiştir. Serum düzeylerine bakıldığında ise yine oda havasında melatonin uygulandığında melatoninin anlamlı bir şekilde antioksidan mekanizmaları artırdığı gözlenmiştir. Keza sigara ile melatonin kullanımı ile de antioksidan düzeyleri benzerlik göstermesi, melatoninin antioksidan mekanizmaları artırdığı sonucuna varılabilir. Apoptotik indekslerin kontrol grubu ile sigaraya maruz kalan ve melatonin kullanan gruplar arasında benzerlik göstermesi melatonin apoptoz üzerine olumlu etkilerini düşündürmektedir. Melatoninin bu apoptotik süreçleri azaltması Tunel yöntemiyle gösterilmiştir.

Melatonin toksisitesi oldukça nadir olarak ortaya çıkabilir. 10-250 mg/kg dozlarında farelere uygulandığında herhangi bir olumsuz etki bildirilmemiş; 100-200 mg/kg dozlarında dahi saptanmamıştır.<sup>210</sup> Melatoninin dozlarına bakıldığında ise doku düzeylerinde melatonin 20mg/kg antioksidan mekanizmaları arttırdığından söz edilebilir. Aynı zamanda sigara maruz kalanlarda ise melatonin 10mg/kg diğer melatonin uygulanan gruplara göre antioksidan mekanizmaları daha anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür. Aynı bulgular Tunel yöntemiyle de gösterilmiştir. Serum düzeyinde ise oda havasında 10 mg/kg kullananlarda daha anlamlı olarak bulunmuştur. Folikül sayılarındaki sigaraya maruz kalanlar ile oda havasındaki gruplar arasında anlamlı farkların olmaması da melatoninin olumlu etkilerinin

olmasını kanıtlar niteliktedir. Sigara içen grupta 20mg/kg melatonin alımının apoptotik indeksi anlam bir şekilde azalttığı, aynı zamanda Hscore anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Tünel yöntemiyle de apoptozdaki azalma gösterilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda sigara içilmesi ile ilişkili olarak primordial folikül, primer folikül, sekonder folikül ve matür folikül düzeyleri anlamlı düzeyde azalmıştır. Folikül düzeylerindeki bu azalma, sigaranın over rezervini azalttığını göstermektedir. Sigara içen grupta 20mg/kg melatonin alımının doku düzeyinde apoptotik indeksi anlam bir şekilde azalttığı sonucuna varılmıştır.



## 7. SONUÇLAR

Günümüzde hala yoğun olarak kullanılan sigara tüm vücut sistemleri üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Bu sistemlerden biride ürogenital sistemdir. Sigara primer olarak over rezervini azalttığıının tespiti için yapılan çalışmalarda ve de bizim çalışmamızda gösterilmiştir. Tabi bunu olumsuz etkilerini azaltmak ve tedavi etmek için melatonin tarafımızca kullanılmıştır.

Çalışmamızda sıçanların overleri üzerinde oluşturmaya çalıştığımız olumsuz etkilerini histolojik anlamda net bir şekilde gösterilmiştir. Çalışmamızda sigara içilmesi ile ilişkili olarak primordial folikül, primer folikül, sekonder folikül ve matür folikül düzeyleri anlamlı düzeyde azalmıştır. Folikül düzeylerindeki bu azalma, sigaranın over rezervini azalttığını göstermektedir. Sigara içen grupta 20mg/kg melatonin alımının doku düzeyinde apoptotik indeksi anlam bir şekilde azalttığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma ile etkili olan melatonin düzeyinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ışık tutacağını düşünülmektedir. Aynı zamanda overde net etkilere ulaşılacak için sıçanların sigaraya maruz kalma sürelerininde uzatılması gereğinin kanaatindeyiz. Daha çok çalışma ve verilerinin ışığında, infertil hastalarda over rezervini artırmaya yönelik alternatif tedaviler oluşacağına inanmaktayız. İnsanlarda uygulanacak bu tedavilerden biride melatonin uygulaması olması muhtemeldir.

Biz bu deneysel çalışmada, kronik olarak sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda, sigara içiminin indüklediği azalmış over rezervine karşı Melatoninin protektif etkileri olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bu çalışmanın sonunda, sigaranın over rezervi üzerine olumsuz etkilerine karşı Melatoninin koruyucu etkilerinin olduğunu gösterilmesi, yardımcı üreme tedavilerinin uygulandığı sigara içen infertil kadınlarda Melatoninin medikal bir ajan olarak tedavi sürecine eklenmesine yönelik bilimsel veriler sağlayabilir. *In vitro fertilizasyon (IVF)* sürecinde Melatoninin adjuvan bir terapötik ajan olarak kullanılması, elde edilen oosit sayısı arttırılarak, daha iyi fertilizasyon ve implantasyon oranları, daha yüksek klinik gebelik ve canlı doğum oranları elde edilerek, IVF sonuçları açısından daha yüksek klinik başarı oranlarına ulaşılmasını sağlayabilir.

## 8. ÖZET

**Amaç:** Kronik olarak sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda melatonin'in over rezervi üzerine etkilerinin araştırılması.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, 72 adet dişi Wistar-Albino sıçanının her biri 12 hayvan içeren 6 gruba randomize edilmiştir, Toplam 45 gün süresince sigara içme makinesi aracılığı ile oda havasına ve sigara dumanına maruz bırakılarak, hem oda havası hem de sigara dumanına maruz bırakılan gruplara 15 gün süre ile 10 mg/kg ve 20 mg/kg subkütan melatonin uygulanmıştır. 45 günlük bir maruziyet sonrasında, overlerde apoptozis, overlerde ve kan örneklerinde oksidatif hasar belirteçlerinin analizleri için biyokimyasal, histolojik, immunhistokimyasal ve immunofloresan analizler yapmak üzere sıçanlar kurban edilmiştir. Apoptotik indeks, immunhistokimyasal skorlama ve over follikülü sayımı gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Bu çalışmada hematoksil-eozin ile boyanan preparatlarda bakılan folikül sayılarında tüm aşamalarda, primordial, primer, sekonder ve matür folikül sayıları kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Sigara içen grupta Anticaspas-3 ile apoptotik indekslerde artma ve H-scoreda artma, immunofloresan boyama ile tünel görüntüleri bakıldığında over stromasında artmış apoptoz saptandı. Gruplar arasında doku düzeyinde MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, anlamlı fark saptanmadı. Oda havasında alınan melatoninin doku düzeyinde SOD, Gpx ve katalaz seviyelerini anlamlı bir şekilde artırdığı gözlemlendi. Sigara içen grupta 20mg/kg melatonin alımının apoptotik indeksi anlam bir şekilde azalttığı, aynı zamanda Hscore anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir.

**Tartışma:** Sonuç olarak, çalışmamızda sigara içilmesi ile ilişkili olarak primordial folikül, primer folikül, sekonder folikül ve matür folikül düzeyleri anlamlı düzeyde azalmıştır. Folikül düzeylerindeki bu azalma, sigaranın over rezervini azalttığını göstermektedir. Sigara içen grupta 20mg/kg melatonin alımının doku düzeyinde apoptotik indeksi anlamlı bir şekilde azalttığı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sigara, Over rezervi, Anti-oksidan, Folikül, Melatonin

## 8. ABSTRACT

**Objective:** We aimed to investigate Effects of melatonin on ovarian reserve in rats exposed to chronic smoking

**Materials and Methods:** An experimental rat model was planned to be set up involving 72 female Wistar-Albino rats. The rats randomized into 6 groups each consisting of 12 rats in order to be exposed to either room air or cigarette smoke with a smoking machine for 45 days adding both 10 and 20 mg/kg subcutaneous Melatonin to room air and smoking groups for 15 days. Following 45 days of the exposure, the rats sacrificed for biochemical, histological, immunohistochemical, immunofluorescence analyses for apoptosis and oxidative damage markers in the ovaries and oxidative balance parameters in blood samples. Apoptotic index, immunohistochemical scoring, ovarian follicular count were the other laboratory indices to be determined.

**Results:** In this study; The primordial ,primary, secondary and mature follicle levels at all stages which were observed in Hemotoxylin-Eosin stained preparations were significantly lower than the control group . In the smoker group ,increase in apoptotic index and H-score with Anti-Caspase-3 staining was detected and apoptosis in ovarian stroma in immunofluorescence stained tunnel images was increased . There was no significant difference in MDA levels in rat tissue between the groups. In the groups which melatonin was received in room air ; SOD ,GPX, katalase levels in rat tissue were observed to increase. It was obviously shown that the apoptotic index and also H-score decreased significantly in the smokers group with 20 mg/kg melatonin.

**Discussion:** In conclusion, in our experimental study ; the decreased levels of primordial follicle, primary, secondary and mature follicles were correlated with smoking . This reduction in follicle levels show that smoking decreases ovarian reserve . In the smoker group, when 20 mg /kg melatonin was received simultaneously , Apoptotic index in tissue decreased significantly.

**Keywords:** Cigarette, Ovarian reserve, Anti oxidant, follicle, Melatonin,

---

## KAYNAKLAR:

- <sup>1</sup> Golding JF.: Smoking. In: Brewis RAL, Gibson GJ, Geddes DM. Respiratory Medicin.-e. London. WB Saunders Company, 1990: 445-460..
- <sup>2</sup> 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.
- <sup>3</sup> Tüberküloz S. Tütün. Yeni Tıp Dergisi 1988; 63-67.
- <sup>4</sup> Peksen Y. Sigara içiminin nedenleri, epidemiyolojisi, pasif içicilik. In: Tür A (ed). Sigaranın sağlığa etkileri ve bırakma yöntemleri. Logos 1995;1-28.
- <sup>5</sup> Hull M, North k, Taylor H, Farrow A, Ford CNC, Delayed conception and active and passive smoking. Fertil Steril 2000; 74: 725-733.
- <sup>6</sup> Mumcu G: Sigaranın fertilitate ve gebelik üzerine etkileri. Özyardımcı N, editor. Sigara ve sağlık, Bursa 2002; 257-280.
- <sup>7</sup> Soares SR, Melo MA. Cigarette smoking and reproductive function. Curr Opin Obstet Gynecol 2008;20(3):281-91
- <sup>8</sup> Elenbogen A, Lipitz S, Mashlach S. The effect of smoking on the outcome of in vitro fertilization embryo transfer. Hum Reprod 1991;6:242-244.
- <sup>9</sup> 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.
- <sup>10</sup> Camlin NJ, McLaughlin EA, Holt JE. Through the smoke: use of in vivo and in vitro cigarette smoking models to elucidate its effect on female fertility. Toxicol Appl Pharmacol 2014;281(3):266-75.
- <sup>11</sup> Sun L, Tan L, Yang F, Luo Y, Li X, Deng HW, Dvornyk V. Meta-analysis suggests that smoking is associated with an increased risk of early natural menopause. Menopause 2012 Feb;19(2):126-32.
- <sup>12</sup> Sobinoff AP, Beckett EL, Jarnicki AG, Sutherland JM, McCluskey A, Hansbro PM, McLaughlin EA. Scrambled and fried: cigarette smoke exposure causes antral follicle destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 2013;271(2):156-67.

- 
- <sup>13</sup> Saraç F, Öztekin K, Çelebi G. Early menopause association with employment, smoking, divorced marital status and low leptin levels. *Gynecol Endocrinol* 2011;27(4):273-8.
- <sup>14</sup> Fuentes A, Muñoz A, Barnhart K, Argüello B, Díaz M, Pommer R. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 2010;93(1):89-95.
- <sup>15</sup> Gruber I, Just A, Birner M, Lösch A. Effect of a woman's smoking status on oocyte, zygote, and day 3 pre-embryo quality in in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 2008;90(4):1249-52.
- <sup>16</sup> Mikkelsen TF, Graff-Iversen S, Sundby J, Bjertness E. Early menopause, association with tobacco smoking, coffee consumption and other lifestyle factors: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2007 Jul 7;7:149.
- <sup>17</sup> Kilic S, Yuksel B, Lortlar N, Sertyel S, Aksu T, Batioglu S. Environmental tobacco smoke exposure during intrauterine period promotes granulosa cell apoptosis: a prospective, randomized study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(10):1904-8.
- <sup>18</sup> Sadeu JC, Foster WG. Effect of in vitro exposure to benzo[a]pyrene, a component of cigarette smoke, on folliculogenesis, steroidogenesis and oocyte nuclear maturation. *Reprod Toxicol* 2011;31(4):402-8.
- <sup>19</sup> Sobinoff AP, Mahony M, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. Understanding the Villain: DMBA-induced preantral ovotoxicity involves selective follicular destruction and primordial follicle activation through PI3K/Akt and mTOR signaling. *Toxicol Sci* 2011;123(2):563-75
- <sup>20</sup> Coutts SM, Fulton N, Anderson RA. Environmental toxicant-induced germ cell apoptosis in the human fetal testis. *Hum Reprod* 2007;22(11):2912-8.
- <sup>21</sup> Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause Int* 2009 Jun;15(2):72-5.
- <sup>22</sup> Keefe DL, Liu L. Telomeres and reproductive aging. *Reprod Fertil Dev* 2009;21(1):10-4.
- <sup>23</sup> Ganesan S, Keating AF. Impact of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure on connexin gap junction proteins in cultured rat ovaries. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;274(2):209-14.



- 
- <sup>24</sup> Igawa Y, Keating AF, Rajapaksa KS, Sipes IG, Hoyer PB. Evaluation of ovotoxicity induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene and its 3,4-diol metabolite utilizing a rat in vitro ovarian culture system. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;234(3):361-9.
- <sup>25</sup> Mohammadghasemi F, Jahromi SK, Hajizadeh H, Homafar MA, Saadat N. The Protective Effects of Exogenous Melatonin on Nicotine-induced Changes in Mouse Ovarian Follicles. *J Reprod Infertil* 2012;13(3):143-50.
- <sup>26</sup> Kuruş M, Ugras M, Esrefoglu M. Effect of resveratrol on tubular damage and interstitial fibrosis in kidneys of rats exposed to cigarette smoke. *Toxicol Ind Health* 2009;25(8):539-44
- <sup>27</sup> Kurus M, Firat Y, Cetin A, Kelles M, Otlu A. The effect of resveratrol in tracheal tissue of rats exposed to cigarette smoke. *Inhal Toxicol* 2009;21(12):979-84.
- <sup>28</sup> Ueta E, Suzuki E, Nanba E, Tadokoro Y, Otsuka Y, Kurata T. Regulation of cigarette smoke-induced cytochrome P4501A1 gene expression in osteogenic disorder Shionogi rat liver and in lung by large ascorbic acid dose. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65(11):2548-51.
- <sup>29</sup> Liu M, Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL, Liu L. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod* 2013;28(3):707-17.
- <sup>30</sup> Fernando S, Rombauts L. Melatonin: shedding light on infertility? - a review of the recent literature. *J Ovarian Res* 2014 Oct 21;7:98.
- <sup>31</sup> Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, Janssen K, Smits J. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology* 2006 Dec 7;228(2-3):333-43.
- <sup>32</sup> Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update* 2014 Mar-Apr;20(2):293-307.
- <sup>33</sup> Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res* 2012 Jan 26;5:5.

- 
- <sup>34</sup> Cruz MH, Leal CL, Cruz JF, Tan DX, Reiter RJ. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 2014 Oct 15;82(7):925-32.
- <sup>35</sup> El-Sokkary GH. An autoradiographic study of cellular proliferation, DNA synthesis and cell cycle variability in the rat liver caused by phenobarbital-induced oxidative stress: the protective role of melatonin. *Cell Mol Biol Lett* 2007;12(3):317-30.
- <sup>36</sup> El-Sokkary GH, Abdel-Rahman GH, Kamel ES. Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats. *Toxicology* 2005 ;213(1-2):25-33.
- <sup>37</sup> El-Sokkary GH, Khidr BM, Younes HA. Role of melatonin in reducing hypoxia-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of male mice. *Eur J Pharmacol* 2006;540(1-3):107-14.
- <sup>38</sup> El-Sokkary GH, Cuzzocrea S, Reiter RJ. Effect of chronic nicotine administration on the rat lung and liver: beneficial role of melatonin. *Toxicology* 2007;239(1-2):60
- <sup>39</sup> Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril*. 2009 Jul;92(1):328-43.
- <sup>40</sup> . Nishihara T, Hashimoto S, Ito K, Nakaoka Y, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Gynecol Endocrinol* 2014 May;30(5):359-62.
- <sup>41</sup> Gökmen G., 2003, *Sistemik Anatomi, İzmir Güven Yayınevi.*
- <sup>42</sup> Mader SS., 2004, *Understanding Human Anatomy and Physiology 5th edition, The McGraw-Hill*
- <sup>43</sup> Williams Jinekoloji, 2010, *İstanbul Nobel Kitapevleri*
- <sup>44</sup> Te Linde' s operative gynecology, 2005, *İzmir Güven Yayınevi*
- <sup>45</sup> Snell RS., 1995, *Clinical Anatomy for Medical Students, 5th edition, Little Brown.*
- <sup>46</sup> Saksouk FA, Johnson SC.: Recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. *Radiographics.*, 1:133-146, 2004.
- <sup>47</sup> Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC.: Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*, 22(2): 255-288., 2001.
- <sup>48</sup> Nishida T, Nishida N.: Reinstatement of "germinal epithelium" of the ovary. *Reprod Biol Endocrinol.*, 4:42, 2006.

- 
- <sup>49</sup> Kierszenbaum A L (Ed) : Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual Döngü (siklus) (Çev. R. Demir), Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 566-572
- <sup>50</sup> Guyton AC, Hall JE., 2006, Textbook of Medical Physiology, 11th edition, Elsevier Saunders
- <sup>51</sup> Cecconi S, Ciccarelli C, Barberi M, Macchiarelli G, Canipari R.: Granulosa cell-oocyte interactions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol., 115(1):19-22, 2004
- <sup>52</sup> Johnson KE., 1991, Histology and Cell Biology, 2nd edition, Williams and Wilkins.
- <sup>53</sup> Hirshfield AN., Theca cells may be present at the outset of follicular growth. Biol Reprod., 44(6):1157-1162, 1991.
- <sup>54</sup> Sadler TW., 2006, Langman's Medical Embryology, 10th edition, Lippincott Williams and Wilkins
- <sup>55</sup> Moore KL, Persaud TWN., 1993, The Developing Human Clinically Oriented Embryology, 5th edition, Harcourt Brace International Edition Saunders.
- <sup>56</sup> Baker TG, Scrimgeour JB.: Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. J Reprod Fertil., 60(1):193-199, 1980.
- <sup>57</sup> Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite, 2014, Marc A. Fritz ve Leon Speroff, Güneş Tıp Kitapevleri
- <sup>58</sup> Oktem O, Oktay K.: The ovary. New York Academy of Sciences, 1127: 1-9, 2008. Review
- <sup>59</sup> Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH., 2009, Larsen's Human Embryology, Churchill Livingstone, 4th edition.
- <sup>60</sup> Motta PM, Makabe S, Nottola SA, The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary, *Hum Reprod Update* 3:281, 1997.
- <sup>61</sup> Baker TG, A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries, *Proc Roy Soc Lond* 158:417, 1963.
- <sup>62</sup> Gondos B, Bhiraleus P, Hobel C, Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries, *Am J Obstet Gynecol* 110:644, 1971
- <sup>63</sup> De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L.: Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod.*, 12(10):2235-41, 1997.
- <sup>64</sup> Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U, Human female phenotypic development: role of fetal ovaries, *J Clin Endocrinol Metab* 79:604, 1994.

- 
- <sup>65</sup> Eşrefoğlu M., 2004, Genel ve Özel Histoloji, Pelikan Yayıncılık
- <sup>66</sup> Delilbaşı L., 2008, İn vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri, Güneş Tıp Kitabevleri.
- <sup>67</sup> Ohnishi J, Ohnishi E and Shibuya H, Takahashi. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta, Protein Proteomics*, 2005; 10: 119-133
- <sup>68</sup> Hassa H., 2003, İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları, Osmangazi Üniversitesi Yayınları.
- <sup>69</sup> Shier D, Butler J, Lewis R., 2001, Human Anatomy and Physiology, 9th edition, The McGraw-Hill.
- <sup>70</sup> Hawkins SM, Matzuk MM.: The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci.*, 1135:10-8, 2008. Review.
- <sup>71</sup> Vicdan K, Işık AZ., 1999, İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipulasyon Uygulamalarında Laboratuvar, 1. Baskı, Çağdaş Medikal Yayın Dağıtım
- <sup>72</sup> Laven JS, Fauser BC.: What role of estrogens in ovarian stimulation. *Maturitas*, 54(4):356-362, 2006. Review.
- <sup>73</sup> Palermo R.: Differential actions of fsh and lh during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine*, 15(3): 326- 337, 2007. Review.
- <sup>74</sup> Kahraman S, Karlıkaya G., 2009, Ovulasyon İndüksiyonu, Serono Yayınları.
- <sup>75</sup> Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K.: The role of gonadotropins in the follicular phase. *Ann NY Acad Sci.*, 1205:5-11, 2010. Review.
- <sup>76</sup> Scanlon VC, Sanders T., 2007, Essentials of Anatomy and Physiology, 5th edition, F. A. Davis.
- <sup>77</sup> Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF 3rd.: Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*, 18(2):19-24, 2009.
- <sup>78</sup> Moore KL, Persaud TVN., 2008, Before We Are Born, 7th edition, Saunders Elsevier.
- <sup>79</sup> Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI., 1995, Histology A Text And Atlas, 3rd edition, Williams and Wilkins
- <sup>80</sup> Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss, *Fertil Steril* 90(Suppl 5):S60, 2008.

- 
- <sup>81</sup> Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J, Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study, *Fertil Steril* 79:577, 2003.
- <sup>82</sup> Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G, Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility, *Hum Reprod* 18:1959, 2003.
- <sup>83</sup> Maroulis GB, Effect of aging on fertility and pregnancy, *Seminars Reprod Endocrinol* 9:165, 1991.
- <sup>84</sup> van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbena JDF, te Velde ER, Karbaat J, Delaying child-bearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy, *Br Med J* 302:1361, 1991.
- <sup>85</sup> Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A, The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization, *Fertil Steril* 65:783, 1996.
- <sup>86</sup> Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Lindenberg S, Petersen K, Andersen AN, Embryo quality and developmental potential is compromised by age, *Acta Obstet Gynecol Scand* 80:169, 2001.
- <sup>87</sup> Stein ZA, A woman's age: childbearing and child rearing, *Am J Epidemiol* 121:327, 1985.
- <sup>88</sup> Hassold T, Chiu D, Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy, *Hum Genet* 70:11, 1985.
- <sup>89</sup> Coxworth JE, Hawkes K, Ovarian follicle loss in humans and mice: lessons from statistical model comparison, *Hum Reprod*, Epub May 26, 2010.
- <sup>90</sup> Stubblefield P, Monson R, Schoenbaum S, Wolfson CE, Cookson J, Ryan KJ, Fertility after induced abortion: a prospective follow-up study, *Obstet Gynecol* 62:186, 1984.
- <sup>91</sup> Frank P, McNamee R, Hannaford PC, Kay CR, Hirsch S, The effect of induced abortion on subsequent fertility, *Br J Obstet Gynaecol* 100:575, 1993.
- <sup>92</sup> Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Soules MR, The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age, *Am J Obstet Gynecol* 181:952, 1999.
- <sup>93</sup> Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S, Effect of female age on the diagnostic categories of infertility, *Hum Reprod* 23:538, 2008.

- 
- <sup>94</sup> Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Report on optimal evaluation of the infertile male, *Fertil Steril* 86(Suppl 5):S172, 2006.
- <sup>95</sup> Abraham GE, Maroulis GB, Marshall JR, Evaluation of ovulation and corpus luteum function using measurements of plasma progesterone, *Obstet Gynecol* 44:522, 1974.
- <sup>96</sup> Wathen NC, Perry L, Lilford RJ, Chard T, Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range, *Br Med J* 288:7, 1984.
- <sup>97</sup> Jones GS, Some newer aspects of the management of infertility, *JAMA* 141:1123, 1949.
- <sup>98</sup> Jones GS, The luteal phase defect, *Fertil Steril* 27:351, 1976.
- <sup>99</sup> Hertig AT, Rock J, Adams EC, A description of 34 human ova within the first 17 days of development, *Am J Anat* 98:435, 1956.
- <sup>100</sup> Navot RW, Scott RT, Doresch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z, The window of embryo transfer and the efficiency of human conception *in vitro*, *Fertil Steril* 55:114, 1991.
- <sup>101</sup> Bergh PA, Navot D, The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation, *Fertil Steril* 58:537, 1992.
- <sup>102</sup> Noyes RW, O'HJ, Accuracy of endometrial dating: correlation of endometrial dating with basal body temperature and menses, *Fertil Steril* 4:504, 1953.
- <sup>103</sup> Andrews WC, Luteal phase defects, *Fertil Steril* 32:501, 1979.
- <sup>104</sup> de Crespigny LC, O'Herlihy C, Robinson HP, Ultrasonic observation of the mechanism of human ovulation, *Am J Obstet Gynecol* 139:636, 1981.
- <sup>105</sup> Eggert-Kruse W, Reimann-Andersen J, Rohr G, Pohl S, Tilgen W, Runnebaum B, Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction *in vivo* and *in vitro*, *Fertil Steril* 63:612, 1995.
- <sup>106</sup> Bonilla-Musoles F, Scanner electron microscopy of the cervical mucus, *Clin Exp Obstet Gynecol* 10:151, 1983.
- <sup>107</sup> Overstreet JW, Katz DF, Yudin AI, Cervical mucus and sperm transport in reproduction, *Seminars Perinatol* 15:149, 1991.
- <sup>108</sup> Katz DF, Human cervical mucus: research update, *Am J Obstet Gynecol* 165:1984, 1991.

- 
- <sup>109</sup> Katz DF, Slade DA, Nakajima ST, Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability, *Adv Contracept* 13:143, 1997.
- <sup>110</sup> Oei SG, Keirse MJ, Bloemenkamp KW, Helmerhorst FM, European postcoital tests: opinions and practice, *Br J Obstet Gynaecol* 102:621, 1995.
- <sup>111</sup> Franken DR, Pretorius E, Grobler S, De Wet JI, Important semen parameters during postcoital testing, *Arch Androl* 14:213, 1985.
- <sup>112</sup> Hull MG, Savage PE, Bromham DR, Prognostic value of the postcoital test: prospective study based on time-specific conception rates, *Br J Obstet Gynaecol* 89:299, 1982.
- <sup>113</sup> Glazener CM, Ford WC, Hull MG, The prognostic power of the post-coital test for natural conception depends on duration of infertility, *Hum Reprod* 15:1953, 2000.
- <sup>114</sup> Collins JA, So Y, Wilson EH, Wrixon W, Casper RF, The postcoital test as a predictor of pregnancy among 355 infertile couples, *Fertil Steril* 41:703, 1984.
- <sup>115</sup> Kovacs GT, Newman GB, Henson GL, The postcoital test: What is normal?, *Br Med J* i:818, 1978.
- <sup>116</sup> Mol BW, Diagnostic potential of the postcoital test, In: Heineman MJ, ed. Evidence-Based Medicine in Clinical Practice, American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, AL, 2001.
- <sup>117</sup> Glatstein IZ, Best CL, Palumbo A, Sleeper LA, Friedman AJ, Hornstein MD, The reproducibility of the postcoital test: a prospective study, *Obstet Gynecol* 85:396, 1995
- <sup>118</sup> American Society for Reproductive Medicine, Optimal evaluation of the infertile female. A practice committee report, Birmingham, AL, 2000.
- <sup>119</sup> Simon C, Martinez L, Pardo F, Tortajada M, Pellicer A, Mullerian defects in women with normal reproductive outcome, *Fertil Steril* 56:1192, 1991
- <sup>120</sup> Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, Bontis JN, Devroey P, Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results, *Hum Reprod Update* 7:161, 2001.
- <sup>121</sup> Homer HA, Li TC, Cooke ID, The septate uterus: a review of management and reproductive outcome, *Fertil Steril* 73:1, 2000.
- <sup>122</sup> Pritts EA, Fibroids and infertility: a systematic review of the evidence, *Obstet Gynecol Survey* 56:483, 2001.



- 
- <sup>123</sup> Donnez J, Jadoul P, What are the implications of myomas on fertility? A need for a debate?, *Hum Reprod* 17:1424, 2002.
- <sup>124</sup> Buttram VC, Reiter RC, Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology and management, *Fertil Steril* 36:433, 1981.
- <sup>125</sup> Eldar-Geva T, Meagher S, Healy DL, MacLachlan V, Breheny S, Wood C, Effect of intramural, subserosal, and submucosal uterine fibroids on the outcome of assisted reproductive technology treatment, *Fertil Steril* 70:687, 1998.
- <sup>126</sup> Ramzy AM, Sattar M, Amin Y, Mansour RT, Serour GI, Aboulghar MA, Uterine myomata and outcome of assisted reproduction, *Hum Reprod* 13:198, 1998.
- <sup>127</sup> Jun SH, Ginsburg ES, Racowsky C, Wise LA, Hornstein MD, Uterine leiomyomas and their effect on in vitro fertilization outcome: a retrospective study, *J Assist Reprod Genet* 18:139, 2001
- <sup>128</sup> Surrey ES, Lietz AK, Schoolcraft WB, Impact of intramural leiomyomata in patients with a normal endometrial cavity on in vitro fertilization-embryo transfer cycle outcome, *Fertil Steril* 75:405, 2001.
- <sup>129</sup> March CM, Intrauterine adhesions, *Obstet Gynecol Clin North Am* 22:491, 1995.
- <sup>130</sup> Al-Inany H, Intrauterine adhesions. An update, *Acta Obstet Gynecol Scand* 80:986, 2001.
- <sup>131</sup> Jensen PA, Stromme WB, Amenorrhea secondary to puerperal curettage (Asherman's syndrome), *Am J Obstet Gynecol* 113:150, 1972.
- <sup>132</sup> Romer T, Post-abortion-hysteroscopy—a method for early diagnosis of congenital and acquired intrauterine causes of abortions, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 57:171, 1994.
- <sup>133</sup> Taylor PJ, Cumming DC, Hill PJ, Significance of intrauterine adhesions detected hysteroscopically in eumenorrheic infertile women and role of antecedent curettage in their formation, *Am J Obstet Gynecol* 139:239, 1981.
- <sup>134</sup> Shaffer W, Role of uterine adhesions in the cause of multiple pregnancy losses, *Clin Obstet Gynecol* 29:912, 1986.
- <sup>135</sup> Schenker JG, Etiology of and therapeutic approach to synechia uteri, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 65:109, 1996.
- <sup>136</sup> Roma Dalfo A, Ubeda B, Ubeda A, Monzon M, Rotger R, Ramos R, Palacio A, Diagnostic value of hysterosalpingography in the detection of intrauterine abnormalities: a comparison with hysteroscopy, *AJR Am J Roentgenol* 183:1405, 2004.

- 
- <sup>137</sup> Maia H Jr, Pimentel K, Silva TM, Freitas LA, Zausner B, Athayde C, Coutinho EM, Aromatase and cyclooxygenase-2 expression in endometrial polyps during the menstrual cycle, *Gynecol Endocrinol* 22:219, 2006.
- <sup>138</sup> Pal L, Niklaus AL, Kim M, Pollack S, Santoro N, Heterogeneity in endometrial expression of aromatase in polyp-bearing uteri, *Hum Reprod* 23:80, 2008.
- <sup>139</sup> Mastrominas M, Pistofi dis GA, Dimitropoulos K, Fertility outcome after outpatient hysteroscopic removal of endometrial polyps and submucous fibroids, *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 3: S29, 1996.
- <sup>140</sup> Hourvitz A, Ledee N, Gervaise A, Fernandez H, Frydman R, Olivennes F, Should diagnostic hysteroscopy be a routine procedure during diagnostic laparoscopy in women with normal hysterosalpingography?, *Reprod Biomed Online* 4:256, 2002.
- <sup>141</sup> Kim MR, Kim YA, Jo MY, Hwang KJ, Ryu HS, High frequency of endometrial polyps in endometriosis, *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 10:46, 2003.
- <sup>142</sup> Paavonen J, Kiviat N, Brunham RC, Stevens CE, Kuo CC, Stamm WE, Miettinen A, Soules M, Eschenbach DA, Holmes KK, Prevalence and manifestations of endometritis among women with cervicitis, *Am J Obstet Gynecol* 152:280, 1985.
- <sup>143</sup> Korn AP, Hessol N, Padian N, Bolan G, Muzsnai D, Donegan E, Jonte J, Schachter J, Landers DV, Commonly used diagnostic criteria for pelvic inflammatory disease have poor sensitivity for plasma cell endometritis, *Sex Transm Dis* 22:335, 1995.
- <sup>144</sup> Mount S, Mead P, Cooper K, Chlamydia trachomatis in the endometrium: can surgical pathologists identify plasma cells?, *Adv Anat Pathol* 8:327, 2001.
- <sup>145</sup> Taylor-Robinson D, Mycoplasma genitalium—an up-date, *Int J STD AIDS* 13:145, 2002.
- <sup>146</sup> Paukku M, Puolakkainen M, Paavonen T, Paavonen J, Plasmacell endometritis is associated with Chlamydia trachomatis infection, *Am J Clin Pathol* 112:211, 1999.
- <sup>147</sup> Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon İndüksiyonu.2000:24-32,101
- <sup>148</sup> Tremellen Kp, Kolom, Gilmore A, lekam ge DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust Nz j Obstet Gynaecol* 2005;45:20-4.
- <sup>149</sup> Cevrioğlu S. Ovaryan Rezerv Testleri. In: Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A, eds. *Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. 2. baskı. Ankara-İstanbul: Güneş Kitabevi Ltd. Şti; 2006. p.1427-32.

- 
- <sup>150</sup> Hendriks Dj, Broekmans Fj, Bancsi LF, Looman W, de Jong FH, te Velde ER. Single and repeated GnRH agonist stimulation tests compared with basal markers of ovarian reserve in the prediction of outcome in IVF. *J Assist Reprod Genet* 2005;22:65-73.
- <sup>151</sup> Lim SAT, Tsakok MFH. Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:265-71.
- <sup>152</sup> Filicori M, Flamigni C. The Role of Luteinizing Hormon in Folliculogenesis and Ovulation Induction. 1999:37-49
- <sup>153</sup> Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis LM, Liu HC, Jones GS, Rosenwaks Z, The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome, *Fertil Steril* 50:298, 1988.
- <sup>154</sup> Scott RT Jr, Hofmann GE, Prognostic assessment of ovarianreserve, *Fertil Steril* 63:1, 1995.
- <sup>155</sup> Roberts JE, Spandorfer S, Fasouliotis SJ, Kashyap S, Rosenwaks Z, Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization, *Fertil Steril* 83:37, 2005.
- <sup>156</sup> Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P, Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol, *Fertil Steril* 82:1323, 2004.
- <sup>157</sup> Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA, Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization, *Fertil Steril* 69:1010, 1998.
- <sup>158</sup> Yanushpolsky EH, Hurwitz S, Tikh E, Racowsky C, Predictive usefulness of cycle day 10 follicle-stimulating hormone level in a clomiphene citrate challenge test for in vitro fertilization outcome in women younger than 40 years of age, *Fertil Steril* 80:111, 2003.
- <sup>159</sup> Csemiczky G, Harlin J, Fried G, Predictive power of clomiphene citrate challenge test for failure of in vitro fertilization treatment, *Acta Obstet Gynecol Scand* 81:954, 2002.
- <sup>160</sup> Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans FJ, The clomiphene citrate challenge test for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review, *Fertil Steril* 86:807, 2006.

- 
- <sup>161</sup> Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J, Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation, *Hum Reprod* 18:328, 2003.
- <sup>162</sup> Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang D, Harlow S, Randolph JF Jr, Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition, *J Clin Endocrinol Metab* 93:3478, 2008.
- <sup>163</sup> Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M, Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients?, *Br J Obstet Gynaecol* 111:1248, 2004.
- <sup>164</sup> Hansen KR, Morris JL, Thyer AC, Soules MR, Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting, *Fertil Steril* 80:577, 2003.
- <sup>165</sup> Lass A, Skull J, McVeigh E, Margara R, Winston RM, Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before human menopausal gonadotrophin superovulation for in-vitro fertilization can predict poor response, *Hum Reprod* 12:294, 1997.
- <sup>166</sup> Steptoe PC, Edwards RG, Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy, *Lancet* 1:880, 1976.
- <sup>167</sup> Beyler SA, James KP, Fritz MA, Meyer WR, Hydrosalpingeal fluid inhibits in-vitro embryonic development in a murine model, *Hum Reprod* 12:2724, 1997.
- <sup>168</sup> Strandell A, Lindhard A, Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid, *Hum Reprod* 17:1141, 2002.
- <sup>169</sup> Centers for Disease Control and Prevention, *2007 Assisted Reproductive Technology Success Rates. National Summary and Fertility Clinic Reports*. Atlanta, GA, 2009.
- <sup>170</sup> Lyons RA, Djahanbakhch O, Saridogan E, Naftalin AA, Mahmood T, Weekes A, Chenoy R, Peritoneal fluid, endometriosis, and ciliary beat frequency in the human fallopian tube, *Lancet* 360:1221, 2002.
- <sup>171</sup> Muzii L, Bellati F, Palaia I, Plotti F, Mancini N, Zullo MA, Angioli R, Panici PB, Laparoscopic stripping of endometriomas: a randomized trial on different surgical techniques. Part I: clinical results, *Hum Reprod* 20:1981, 2005.
- <sup>172</sup> Azkan N. Tütün yaprağının kimyasal bileşimi. Ozyardımcı N. (Ed.) Sigara ve Sağlık, Bursa, 2002; sh:10-7.

- 
- <sup>173</sup> Bilir N., Çakır B., Dağlı E., Ergüder T., Önder Z. Tobacco Control in Turkey. WHO Europe, 2009.
- <sup>174</sup> Basaran N. Hincal F.: Çevresel tütün dumanı ve pasif sigara içimi. FABAD Form. Bil. Der. 1990; 15:247-248.
- <sup>175</sup> 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.
- <sup>176</sup> 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.
- <sup>177</sup> Hymowitz N. Tobacco. Clinical textbook of addictive disorders. Frances RJ., Miller Sİ., Mack AH (eds). The Guilford Press, New York, 2005; sh:105-16.
- <sup>178</sup> 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.
- <sup>179</sup> 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.
- <sup>180</sup> 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
- <sup>181</sup> 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
- <sup>182</sup> Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod 1998; 13: 1532-1539.
- <sup>183</sup> 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.
- <sup>184</sup> 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.
- <sup>185</sup> 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.
- <sup>186</sup> Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. A review of the evidence supporting

---

melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*. 1995 Jan;18(1):1-

11. PubMed PMID: 7776173.

<sup>187</sup> Üstündağ, B., Canatan, H.: Melatonin: Güçlü bir antioksidan ve serbest radikal giderici. *Fırat Tıp Der.* 1: 7, 1999.

<sup>188</sup> Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 1997 Aug;29(8):363-72. PubMed PMID:9288572.

<sup>189</sup> Penev, P.D., Zee, P.C.: Melatonin: a clinical perspective. *Ann. Neurol.* 42: 545-553, 1997.

<sup>190</sup> Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237–256.

<sup>191</sup> Saija A, Tomaino A, Trombetta D et al. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53: 209–215.

<sup>192</sup> O.S. Palaoglu, E. Beskonaklı, Pineal Gland and Aging, *Turkish Journal of Geriatrics* 1998; 1: 1 13-18.

<sup>193</sup> Calkins CM, Bensard DD, Heimbach JK, et al. L-arginine attenuates lipopolysaccharide induced lung chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(3):L400-408

<sup>194</sup> E.F. Hartree. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* Volume 48, Issue 2, August 1972, Pages 422-427

<sup>195</sup> Gannon AM, Stämpfli MR, Foster WG. Cigarette smoke exposure leads to follicle loss via an alternative ovarian cell death pathway in a mouse model. *Toxicol Sci.* 2012 Jan;125(1):274-84.

<sup>196</sup> Tuttle AM, Stämpfli M, Foster WG. *Hum Reprod.* Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Hum Reprod.* 2009 Jun;24(6):1452-9.

<sup>197</sup> Appt SE<sup>1</sup>, Kaplan JR, Clarkson TB, Cline JM, Christian PJ, Hoyer PB. Destruction of primordial ovarian follicles in adult cynomolgus macaques after exposure to 4-

---

vinylcyclohexene diepoxide: a nonhuman primate model of the menopausal transition. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4 Suppl):1210-6.

<sup>198</sup> Sobinoff AP, Pye V, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. Adding insult to injury: effects of xenobiotic-induced preantral ovotoxicity on ovarian development and oocyte fusibility. *Toxicol Sci*. 2010 Dec;118(2):653-66.

<sup>199</sup> Sobinoff AP, Pye V, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. Jumping the gun: smoking constituent BaP causes premature primordial follicle activation and impairs oocyte fusibility through oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Apr 1;260(1):70-80.

<sup>200</sup> Soleimani R, De Sutter P. In situ identification of follicles in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and developmental potential in strategies to preserve female fertility. *Hum Reprod*. 2011 Apr;26(4):955-6; author reply 956-9.

<sup>201</sup> Frei B<sup>1</sup>, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem J*. 1991 Jul 1;277 ( Pt 1):133-8.

<sup>202</sup> Finkel T<sup>1</sup>, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.

<sup>203</sup> Jozwik M<sup>1</sup>, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*. 1999 May;5(5):409-13.

<sup>204</sup> Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta*. 1995 May 15;236(2):173-80.

<sup>205</sup> Palan PR<sup>1</sup>, Cohen BL, Barad DH, Romney SL. Effects of smoking on the levels of antioxidant beta carotene, alpha tocopherol and retinol in human ovarian follicular fluid. *Gynecol Obstet Invest*. 1995;39(1):43-6.

<sup>206</sup> Reiter RJ<sup>1</sup>. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol Sci*. 2000 Oct;15:246-250.



---

<sup>207</sup> Tripathi A<sup>1</sup>, Khatun S, Pandey AN, Mishra SK, Chaube R, Shrivastav TG, Chaube SK. Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. *Free Radic Res.* 2009 Mar;43(3):287-94

<sup>208</sup> Cui MS<sup>1</sup>, Wang XL, Tang DW, Zhang J, Liu Y, Zeng SM. Acetylation of H4K12 in porcine oocytes during in vitro aging: potential role of ooplasmic reactive oxygen species. *Theriogenology.* 2011 Mar 1;75(4):638-46.

<sup>209</sup> Cruz MH<sup>1</sup>, Leal CL<sup>2</sup>, Cruz JF<sup>3</sup>, Tan DX<sup>4</sup>, Reiter RJ<sup>4</sup>. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology.* 2014 Oct 15;82(7):925-32.

<sup>210</sup> Vijayalaxmi V<sup>1</sup>, Kligerman AD, Prihoda TJ, Ullrich SE. Cytogenetic studies in mice treated with the jet fuels, Jet-A and JP-8. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104(1-4):371-5.