

**T.C.**  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FOLİKÜLER SIVIDAKİ TSH DEĞERLERİNİN OKSİDATİF HASAR  
PARAMETRELERİ VE *İN VİTRO* FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

Ender Yalçınkaya

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin  
Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü  
Biyokimya Anabilim Dalı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Proje No: KKA EK 2010/2

KOCAELİ  
2010

**T.C.**  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FOLİKÜLER SIVIDAKİ TSH DEĞERLERİNİN OKSİDATİF HASAR  
PARAMETRELERİ VE *İN VİTRO* FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

Ender Yalçınkaya

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin  
Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü  
Biyokimya Anabilim Dalı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Mustafa B. Çekmen

Proje No: KKA EK 2010/2

KOCAELİ  
2010



## ÖZET

### Foliküler Sıvıdaki TSH Değerlerinin Oksidatif Hasar Parametreleri ve *In Vitro* Fertilizasyon Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, kontrollü over stimülasyonu ve sonrasında oosit aspirasyonu uygulanmış IVF hastalarının foliküler sıvılarında bulunan TSH, serbest T3, serbest T4 ve prolaktin hormonlarının seviyeleri ile oksidatif hasar ve *in vitro* fertilizasyon parametreleri arasındaki ilişkiyi araştırdık. Çalışmamızda, Kocaeli Üniversitesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi'nde tedavi gören 62 infertil kadın hasta rastgele seçilmiş ve folikül sıvı örnekleri kullanılmıştır. Alınan folikül sıvıları hastaların dominant foliküllerinden elde edilmiştir. Bu örneklerdeki tiroid stimulan hormon, serbest T3, serbest T4, prolaktin, nitrik oksit, redükte glutasyon ve malondialdehit miktarları ölçülmüş ve *in vitro* fertilizasyon parametreleri olan oosit sayısı, olgun oosit sayısı, döllenen oosit sayısı, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesi ile ilişkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgular arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sonuçlarımız, tiroid stimulan hormon değerlerinin gebe kalan kadınlarla gebe kalamayan kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediğini ortaya çıkarmıştır ( $p=0.345$ ). Gebelik sonucu pozitif olan hastalarda, negatif olan hastalara oranla nitrik oksit ve serbest T3 seviyeleri anlamlı olarak daha düşükken (sırasıyla;  $p=0.039$ ,  $p=0.012$ ); malondialdehit ve prolaktin seviyeleri anlamlı şekilde daha yüksek çıkmıştır (sırasıyla;  $p=0.001$ ,  $p=0.042$ ).

**Anahtar Kelimeler:** tiroid stimulan hormon, foliküler sıvı, *in vitro* fertilizasyon, nitrik oksit, malondialdehit, glutasyon

## ABSTRACT

### **Effect Of Follicular Fluid TSH Levels On Oxidative Stress Parameters and *In Vitro* Fertilization**

In this study; we investigated the relationship between TSH, free T3, free T4 and prolactin hormone levels with oxidative stress and *in vitro* fertilization parameters in follicular fluids of IVF patients who have undergone controlled ovarian hyperstimulation and afterwards oocyte aspiration. 62 infertile women who were treated in Kocaeli University Hospital IVF Unit were randomly selected and their follicular fluid samples were used in our study. Follicular fluids were obtained from the dominant follicles. Thyroid stimulating hormone, free T3, free T4, prolactin, nitric oxide, reduced glutathione and malondialdehyde levels in these samples were measured and *in vitro* fertilization parameters that are oocyte count, mature oocyte count, fertilized oocyte count, fertilization rate and embryo quality were analyzed. The correlations between these findings were assessed statistically. Our results revealed that there was no statistically significant difference between thyroid stimulating hormone levels of pregnant and nonpregnant women ( $p=0.345$ ). It was also observed that; in pregnant women nitric oxide and free T3 levels were lower ( $p=0.039$ ,  $p=0.012$ ; respectively); malondialdehyde and prolactin levels were higher ( $p=0.001$ ,  $p=0,042$ ; respectively) when compared to nonpregnant women.

**Key Words:** thyroid stimulating hormone, follicular fluid, *in vitro* fertilization, nitric oxide, malondialdehyde, glutathione

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve bana güvendiğini hissettiren sevgili danışman hocam Doç. Dr. Mustafa B. Çekmen'e;

Eğitimim, mesleki ve kişisel gelişimim için çok emek veren, bilgisini, sevgisini ve tecrübesini benden hiç esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Eray Çalışkan'a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktararak yetişmeye büyük katkılarda bulunan sevgili hocalarım Prof. Dr. Sevinç Kuşkay, Doç. Dr. Hale Maral Kır ve Doç. Dr. Meltem Özden Dillioğlugil'e;

Tezimi hazırlamamda bana verdikleri desteklerinden ötürü Tüp Bebek Ünitesi'ndeki sevgili çalışma arkadaşlarım Özcan Budak ve Nevin Eğerci'ye;

Güzel tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Özlem Budak'a;

Ve her şeyden öte, sonsuz bir sevgi ve saygıyla bağlı olduğum, beni bir an olsun yalnız bırakmayan ve onlara sahip olduğum için kendimi dünyanın en şanslı insanı hissettiğim biricik **AİLEM**'e;

**SONSUZ TEŞEKKÜRLER...**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                                           | iv  |
| ABSTRACT .....                                                       | v   |
| TEŞEKKÜR .....                                                       | vi  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                 | ix  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                 | xi  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                              | xii |
| 1.AMAÇ VE KAPSAM.....                                                | 1   |
| 2. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....                                      | 2   |
| 2.1. Tiroid Sistemi .....                                            | 2   |
| 2.1.1. Tiroid hormonları .....                                       | 3   |
| 2.1.2. Tiroid stimulan hormon (TSH).....                             | 5   |
| 2.1.2.1. TSH referans aralığı.....                                   | 5   |
| 2.2. İnfertilite .....                                               | 6   |
| 2.3. Tiroid Hastalıkları ve Kadın İnfertilitesi .....                | 7   |
| 2.3.1. Hipotiroidi, Kadın Üreme Ekseni ve Kadın İnfertilitesi.....   | 7   |
| 2.3.2. Hipertiroidi, Kadın Üreme Ekseni ve Kadın İnfertilitesi ..... | 8   |
| 2.3.3. Hiperprolaktinemi.....                                        | 8   |
| 2.4. TSH, Tiroid Hormonları, Prolaktin ve Oosit Gelişimi .....       | 9   |
| 2.4.1. Oosit gelişimi.....                                           | 9   |
| 2.4.2. TSH ve Oosit .....                                            | 10  |
| 2.4.3. Tiroid hormonları ve oosit gelişimi .....                     | 11  |
| 2.5. Tiroid Durumu ve Oksidatif Stres .....                          | 11  |
| 2.5.1. Serbest radikaller .....                                      | 12  |
| 2.5.2. Lipid peroksidasyonu .....                                    | 13  |
| 2.5.3. Nitrik oksit.....                                             | 14  |
| 2.5.4. Redükte glutatyon .....                                       | 15  |
| 2.6. Oksidatif Stres ve İnfertilite .....                            | 16  |
| 2.6.1. ROS ve Kadın İnfertilitesi .....                              | 16  |
| 2.6.2. ROS ve IVF .....                                              | 18  |
| 3.1. Olguların seçimi .....                                          | 19  |

|                                                               |                                         |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 3.2. Örneklerin alınması .....                                | 19                                      |
| 3.3. Kullanılan Cihazlar, Reaktif Kitler Ve Kimyasallar ..... | 19                                      |
| 4. METOTLAR .....                                             | 21                                      |
| 4.1. HORMON ÖLÇÜMLERİ .....                                   | 21                                      |
| 4.1.1. TSH ölçümü.....                                        | 21                                      |
| 4.1.2. sT3 ölçümü .....                                       | 21                                      |
| 4.1.3. sT4 ölçümü .....                                       | 21                                      |
| 4.1.4. Prolaktin ölçümü .....                                 | 21                                      |
| 4.2. Folikül Sıvısı MDA Ölçümü .....                          | 21                                      |
| 4.4. Folikül Sıvısı NO <sup>•</sup> Ölçümü .....              | 23                                      |
| 4.5. Folikül Sıvısı GSH Ölçümü.....                           | 25                                      |
| 4.6. İstatistiksel Analiz .....                               | 26                                      |
| 5. BULGULAR .....                                             | 27                                      |
| 6. TARTIŞMA .....                                             | 40                                      |
| 7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                 | 47                                      |
| KAYNAKÇA .....                                                | 48                                      |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                 | <b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b> |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                    |                                           |
|------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>TSH:</b>                        | tiroid stimulan hormon                    |
| <b>fT3:</b>                        | serbest triiyodotironin                   |
| <b>fT4:</b>                        | serbest tiroksin                          |
| <b>T3:</b>                         | triiyodotironin                           |
| <b>T4:</b>                         | tiroksin                                  |
| <b>MIT:</b>                        | monoiyodotironin                          |
| <b>DIT:</b>                        | diiyodotironin                            |
| <b>TRH:</b>                        | tirotropin salgılatan hormon              |
| <b>TBG:</b>                        | tiroksin bağlayan globulin                |
| <b>FSH:</b>                        | folikül stimüle edici hormon              |
| <b>LH:</b>                         | luteinizan hormon                         |
| <b>hCG:</b>                        | insan koryonik gonadotropini              |
| <b>E2:</b>                         | östradiol                                 |
| <b>PRL:</b>                        | prolaktin                                 |
| <b>FF:</b>                         | foliküler sıvı                            |
| <b>cAMP:</b>                       | siklik adenzin monofosfat                 |
| <b>IVF:</b>                        | <i>in vitro</i> fertilizasyon             |
| <b>GnRH:</b>                       | gonadotropin salgılatıcı hormon           |
| <b>SHBG:</b>                       | seks hormon bağlayıcı globulin            |
| <b>HPO:</b>                        | hipotalamik-hipofizer-over                |
| <b>CC:</b>                         | kümüls hücreleri                          |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> | hidrojen peroksit                         |
| <b>OH<sup>·</sup>:</b>             | hidroksil radikali                        |
| <b>ROS:</b>                        | reaktif oksijen türleri                   |
| <b>DNA:</b>                        | deoksiribonükleik asit                    |
| <b>NOS:</b>                        | nitrik oksit sentaz (sentetaz)            |
| <b>NADPH:</b>                      | nikotinamid adenin dinükleotit fosfat     |
| <b>cGMP:</b>                       | siklik guanin monofosfat                  |
| <b>RNS:</b>                        | reaktif azot türleri                      |
| <b>ONOO<sup>-</sup>:</b>           | peroksinitrit                             |
| <b>Cu-Zn-SOD:</b>                  | bakır ve çinko içeren süperoksit dismutaz |

|                                    |                                        |
|------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Mn-SOD:</b>                     | manganez içeren süperoksit dismutaz    |
| <b>NO•:</b>                        | nitrik oksit                           |
| <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:</b> | nitrat                                 |
| <b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b> | nitrit                                 |
| <b>MDA:</b>                        | malondialdehit                         |
| <b>GSH:</b>                        | redükte glutatyon                      |
| <b>OS:</b>                         | oksijen türleri                        |
| <b>TAC:</b>                        | total antioksidan kapasite             |
| <b>mRNA:</b>                       | mesajcı ribonükleik asit               |
| <b>ICSI:</b>                       | intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu     |
| <b>OPU:</b>                        | oosit toplama                          |
| <b>TEP:</b>                        | 1,1,3,3 - tetraetoksipropan            |
| <b>DTNB:</b>                       | 5, 5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) |
| <b>NaOH:</b>                       | sodyum hidroksit                       |
| <b>mIU:</b>                        | mili internasyonal ünite               |
| <b>pg:</b>                         | pikogram                               |
| <b>ng:</b>                         | nanogram                               |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Tiroid sistemi geri-bildirim mekanizması..... | 2  |
| Şekil 2. Tiroksin (T4).....                            | 4  |
| Şekil 3. Triiyodotironin (T3).....                     | 4  |
| Şekil 4. Lipid peroksidasyonu basamakları.....         | 14 |
| Şekil 5. NO' sentezi.....                              | 15 |
| Şekil 6. Redükte glutatyonun yapısı.....               | 15 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.</b> Çalışmadaki bütün hastaların tanımlayıcı istatistikleri. ....                                                                                 | 30 |
| <b>Çizelge 2.</b> Gebe kalan ve kalamayan hastalar arasındaki hormon, oksidatif hasar ve <i>in vitro</i> fertilizasyon parametrelerinin karşılaştırılması. .... | 31 |
| <b>Çizelge 3.</b> Gebe kalan hastalarda hormon ve oksidatif stres parametrelerinin korelasyonu                                                                  | 32 |
| <b>Çizelge 4.</b> Foliküler sıvıdaki hormon ve oksidatif stres parametrelerinin korelasyonu. ....                                                               | 33 |
| <b>Çizelge 5.</b> Foliküler sıvı TSH, sT3, sT4, PRL seviyelerinin serum TSH, sT3, sT4, PRL seviyeleriyle korelasyonu. ....                                      | 34 |
| <b>Çizelge 6.</b> Foliküler sıvıda TSH < 2.5 mIU/L ve TSH ≥ 2.5 mIU/L olan hastaların <i>in vitro</i> fertilizasyon parametrelerinin karşılaştırılması. ....    | 36 |
| <b>Çizelge 7.</b> Foliküler sıvıdaki NO <sup>•</sup> seviyeleri ve <i>in vitro</i> fertilizasyon parametrelerinin korelasyonu. ....                             | 37 |
| <b>Çizelge 8.</b> Foliküler sıvıdaki MDA seviyelerinin <i>in vitro</i> fertilizasyon parametreleri ile karşılaştırılması. ....                                  | 37 |
| <b>Çizelge 9.</b> Foliküler sıvıdaki serbest T3 seviyelerinin <i>in vitro</i> fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu. ....                                 | 38 |
| <b>Çizelge 10.</b> Foliküler sıvıdaki prolaktin seviyelerinin <i>in vitro</i> fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu. ....                                 | 38 |
| <b>Çizelge 11.</b> Foliküler sıvıdaki TSH seviyelerinin <i>in vitro</i> fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu. ....                                       | 39 |
| <b>Çizelge 12.</b> Foliküler sıvıdaki redükte GSH seviyelerinin <i>in vitro</i> fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu. ....                               | 39 |

## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Tiroid hastalıkları, üreme çağındaki kadınlarda erkeklere oranla 4 ile 5 kat daha fazladır ve tiroid disfonksiyonunun sıklıkla kadınlarda fertilitenin bozulmasıyla ilişkili olduğu saptanmıştır (Bjoro ve ark., 2000). TSH, tiroid hormonları ve prolaktin ölçümleri günümüzde infertilite değerlendirilmesinde rutin olarak yapılmaktadır.

Tiroid hormonları vücutta büyüme, gelişim ve metabolizmanın anahtar düzenleyicileridir. Aşırı üretilmeleri sonucu bazal metabolik hızda artışa neden oldukları bilinmektedir. BMR'deki artışın, başta mitokondrideki elektron transport zinciri (ETZ) olmak üzere birçok metabolik olayı uyardığı ve serbest radikal üretimini arttırarak, oksidan-antioksidan dengesini etkilediği rapor edilmiştir (Fernández ve ark., 2006). Yine; NO<sup>\*</sup>, malondialdehit ve redükte glutatyonunun yapıları gereği organizmanın oksidan-antioksidan dengesiyle etkileşim içinde olması beklenir.

Oosit kalitesi, kadın infertilitesini belirleyen önemli bir faktördür. Foliküler sıvı; oosit gelişimi için çok önemli bir mikroçevredir; oosit kalitesini belirlemede, fertilizasyon ve embriyogenezde büyük rol oynar. Bu mikroçevre, oositlerin içinde yaşadığı; steroid hormon, büyüme faktörü, sitokinler, granüloza hücreleri ve lökositleri içeren metabolik olarak aktif bir sistemdir ve foliküler olgunlaşma ve granüloza hücre fonksiyonları açısından çok önemlidir (Fortune JE., 1994).

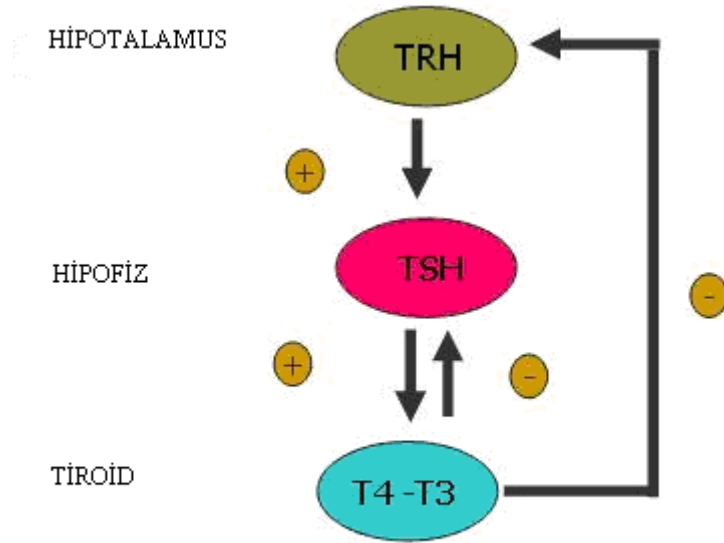
Araştırmamızın temel amacı; infertil kadınlarda oksidan-antioksidan dengesi ve *in vitro* fertilizasyon sonucuyla direkt, indirekt ya da potansiyel olarak ilişkisi olabilecek tiroid stimulan hormon, serbest T3, serbest T4, prolaktin, nitrik oksit, malondialdehit ve redükte glutatyon parametrelerinin, ovülasyon indüksiyonu yapılmış ve tedavi sonunda oositleri toplanmış infertil kadın hastaların foliküler sıvılarında ölçmek; bu parametreler arasındaki olası ilişkileri ve *in vitro* fertilizasyon sonuçlarına olası etkilerini değerlendirmektir.

## 2. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tiroid Sistemi

Tiroid sistemi; tirotropin salgılatan hormon (TRH), tiroid stimulan hormon (TSH) ve tiroid hormonlarından oluşmaktadır. Bu üç bileşen sağlıklı bireylerde birbiri ile uyum içinde çalışmaktadır. Hipotalamustan salgılanan TRH, hipofizden TSH salınımını uyarır. Kandaki TSH artışı ile birlikte tiroid bezinden tiroid hormonlarının salınımı uyarılmaktadır. Tiroid sistemi elemanları arasında işlevsel bir geri bildirim mekanizması vardır (Şekil 1) ve bu mekanizmanın bozulması tiroid işlev bozukluğuna neden olur. Endokrin hastalıkların büyük bir çoğunluğunu tiroid işlev bozuklukları oluşturmaktadır.

Şekil 1.1. Tiroid sistemi geri-bildirim mekanizması.



### 2.1.1. Tiroid hormonları

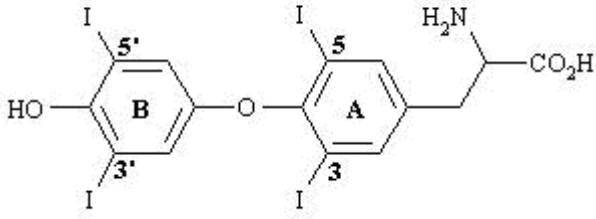
Tiroid hormonları vücutta hemen hemen her hücrede etki gösterir. Genel olarak; bazal metabolik hızı arttıran, protein sentezini etkileyen, nöronal olgunlaşmaya yardımcı olan ve vücudun katekolaminlere olan duyarlılığını arttıran işlevlere sahiptirler. Vücuttaki hücrelerin düzgün gelişimi ve başkalaşımı açısından gereklidirler. Hücrelerin enerji verici bileşikleri kullanım mekanizmaları üzerinde etki göstererek de protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarını düzenlerler. Bunun yanı sıra; kardiyovasküler sistem ve üreme sisteminde birçok fizyolojik etki gösterirler (Murray ve ark., 2003).

Tiroid hormonları, tiroid bezinde üretilen iyodinlenmiş aminoasit türevleri olan T3 (3,3',5-triiodo-L-tironin) ve T4 (3,3',5,5'-tetraiyodo-L-tironin)'tür. T3 biyolojik olarak aktif olan hormondur ve çoğunlukla tiroid dışındaki dokularda T4'ten sentezlenmektedir. T4'ün anlamlı bir biyoaktivitesi yoktur, hormon öncülü olarak görev yapmaktadır.

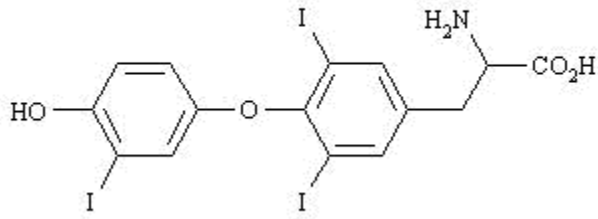
Tiroid hormonu sentezinde iki substrata ihtiyaç vardır:

- i. Tiroglobulin:** Molekül ağırlığı 660 kDa civarında olan, sadece 25-30 tanesi iyotlanan, 133 tirozil kalıntısına sahip glikozile bir proteindir. Tiroglobulin tirositlerin (tiroid bezi hücreleri) bazal kısmında sentezlenir ve ekstraselüler kolloitte depolanmak üzere foliküler lümene hareket eder. Tekrar hücreye girdiğinde aktif T3 ve T4 hormonlarına hidrolize olurken, apikalden bazale hareket eder. Bütün bu basamaklar TSH tarafından hızlandırılır. Tiroid stimüle edici hormon, tiroglobulin geninin transkripsiyonunu da hızlandırmaktadır (Murray ve ark., 2003).
- ii. İyot:** Kaynağı besinlerdeki inorganik iyottur. İnce barsaktan emilen iyot, tiroid bezi ve böbrekler tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır. Tiroid bezindeki tirozit hücreleri tarafından aktif taşımayla içeri alınır, tiroperoksidaz tarafından katalizlenen oksidasyon yoluyla aktif hale getirilir. Oksitlenmiş iyot, tiroglobulindeki tirozil kalıntılarıyla reaksiyona girer. Aromatik halkanın önce 3' sonra da 5' konumu sırasıyla MIT ve DIT oluşturmak üzere iyotlanır. T4 oluşturmak için iki DIT molekülü, T3 oluşturmak içinse bir MIT ve bir DIT molekülü birleşir. Tiroglobulin hidrolizi TSH tarafından uyarılır (Murray ve ark., 2003).

Şekil 1.2. Tiroksin (T4)



Şekil 1.3. Triiyodotironin (T3)



Tiroid hormonları kanda serum proteinlerine bağlı olarak taşınırlar. Ana tiroid hormon bağlayıcı protein, tiroksin bağlayan globulinlerdir. TBG'e bağlı olmayan kısım, biyolojik aktiviteden sorumlu olan kısımdır.

Kandaki tiroid hormonu seviyeleri geri-bildirim mekanizmasıyla düzenlenir (Şekil 1). T3 ve T4 seviyeleri, kandaki TSH hormonunun artmasına cevap olarak yükselir; fakat kandaki serbest T3'ün artması ile pozitif geri bildirim mekanizması durur. TSH ve TRH üzerine etkisi olan negatif geri bildirim mekanizması devreye girer. Bu durum, serbest T3 düzeyi belli bir seviyenin altına düşene kadar devam eder ve T3'teki azalma tekrar TSH salınması için gerekli işareti verir. Bu mekanizma, biyolojik olarak aktif olan serbest T3'ün direkt ya da T4 dönüşümüyle kana kesintisiz olarak verilmesini sağlar.



### 2.1.2. Tiroid stimulan hormon

TSH, ön hipofiz bezindeki bazofil hücrelerinden sentezlenen ve salgılanan 28-30 kDa arasında bir glikoproteindir. Tiroid bezinin büyümesi ve fonksiyonun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. TSH; folikül stimulan hormon, lüteinizan hormon ve insan koryonik gonadotropinini içeren glikoprotein ailesinin bir üyesidir. Bu sınıfa bağlı diğer hormonlar gibi, TSH da, plazma membranı reseptörlerine bağlanır ve adenilat siklazı aktive eder. Bunun ardından meydana gelen cAMP artışıyla birlikte tiroid hormon biyosentezini artırır. Bu glikoprotein ailesindeki hormonların ortak özelliklerinden bir diğeri,  $\alpha$  ve  $\beta$  olarak adlandırılan 2 alt birimden oluşmalarıdır. Hormonların  $\alpha$  altbirimleri birbirleriyle aynıdır; türler arasında da yüksek homoloji gösterir. Spesifik biyolojik aktiviteleri belirleyen ise  $\beta$  altbirimidir; ama  $\beta$  altbirimi tek başına aktif değildir. Reseptörün tanınması için her iki alt birimin etkileşim halinde olması gerekmektedir (Murray ve ark., 2003).

TSH, tiroid fonksiyonunun kontrolündeki anahtar proteindir. Anterior hipofizden TSH sentezi, tirotropin-salgılatan hormon (TRH) ile uyarılır ve klasik endokrin negatif-geri besleme mekanizmasında tiroid hormonuyla inhibe edilir. TSH'nin fizyolojik rolleri, tiroidin iyodin alımı ve organifikasyonu gibi farklılaşmış fonksiyonlarının stimülasyonu, iyodotroninlerin üretimi ve bezden salınması, ve tiroidin gelişiminin başlamasıdır (Szkudlinski ve ark., 2002).

#### 2.1.2.1. TSH referans aralığı

Serum TSH konsantrasyonunun, tiroid işlev bozukluğunun en duyarlı belirteci olduğu düşünülmektedir; çünkü, serumdaki TSH ve tiroid hormonları arasında logaritmik bir ters ilişki vardır. Serbest T4 ya da serbest T3 konsantrasyonlarındaki hafif değişiklikler, TSH'da büyük değişikliklerle sonuçlanmaktadır (Spencer ve ark., 1990). Bir popülasyondaki TSH referans aralığı önemli bir soru işaretidir; çünkü her bireyin tiroid hormon ve TSH konsantrasyonları arasındaki ilişki için tek bir 'denge noktası' olduğu düşünülmektedir (Andersen ve ark., 2002). Bu nedenle; TSH referans aralığı, günümüzde, özellikle subklinik tiroid hastalığı olan hastalarla ilgilenen klinisyenler arasında yoğun ilgi çeken bir konu haline gelmiştir (Goichot ve ark., 2009).

Son 7 yıl içinde, TSH'nin üst referans sınırını tartışan birçok rapor bildirilmiştir (Fatourechî ve ark., 2003; Surks ve ark., 2005; Wartofsky ve ark., 2005; Fatourechî ve ark., 2007; Biondi ve ark., 2008). Bunlardan birinde, özellikle hastanın yaşını dikkate alarak kullanılan referans aralığını değiştirmek gerektiği savunulmaktadır (Surks ve ark., 2007). Diğer yandan, TSH referans aralığının alt sınırı fazla ilgi çekmemiş ve bu konudaki çalışmalara literatürde nadir rastlanmıştır (Goichot ve ark., 2009).

Günümüzde kullanılan TSH referans aralığı, duyarlı testler uygulanarak 0.2-0.4 mIU/L ile 4.0-4.5 mIU/L olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra; etnik özelliklerin, yaşın, iyodin alımının, flebotomi zamanının ya da testin duyarlılığı ve özgüllüğünün TSH değerlerini etkileyen muhtemel faktörler olduğu düşünülmektedir.

Son zamanlarda yapılan bazı popülasyon bazlı çalışmalarda, TSH seviyelerinde daha dar bir aralık tanımlanmıştır. Bu aralık, 0.3 ile 2.5 mIU/L'dir; fakat, TSH değerleri laboratuvar test metodlarındaki değişkenlikleri içeren endojen ve ekzojen etkileşimlere maruz olabileceğinden dolayı uzun süredir kabul görmüş olan 0.2-4.5 mIU/L aralığı göz önünde tutulmalı ve hastanın kliniğiyle birlikte değerlendirilmelidir (Brabant G., 2009).

## 2.2. İnfertilite

İnfertilite, insanları tıbbi ve psikolojik olarak etkileyen klinik bir problemdir. "12 ay boyunca, korunmadan ve yeterli sayıda cinsel ilişkide bulunulmasına karşın gebelik oluşmaması" olarak tanımlanmaktadır. İnfertilitenin çok farklı nedenleri vardır ve bunların %30'u erkek kaynaklıyken, %40-50'sini kadın infertilitesi ve %20-30'unu açıklanamayan infertilite oluşturmaktadır (Duckitt K., 2003).

*In vitro* fertilizasyon uygulamaları ve ovülasyon indüksiyonu, folikülogenez ve luteal faz olaylarını anlamada yeni bakış açıları getirmiştir. Bu yeni bilgiler, oositin, fertilizasyonun ve embriyo klivajının doğrudan izlenmesi kadar periferik kan belirteçleri, ultrason değerlendirmesi, foliküler sıvı içerikleri ve hücre kültürü teknikleri kullanılarak siklusların detaylı bir şekilde değerlendirilebilmesini sağlamıştır (DeCherney ve ark., 1985).

### **2.3. Tiroid Hastalıkları ve Kadın İnfertilitesi**

Tiroid hastalıkları, üreme çağındaki kadınlarda erkeklere oranla 4 ile 5 kat daha fazla görülmektedir (Bjoro ve ark., 2000). Tiroid işlev bozukluğu sıklıkla kadınlarda fertilitenin bozulmasıyla ilişkilidir. Tiroid hastalıklarında hipotalamik-hipofizer-over ekseninin normal geri besleme mekanizmasının düzenlenmesinde bozukluk olduğuna ve bunun da, kadınlarda menstrüel anormalliklere ve fertilitede bozukluğa neden olduğuna inanılmaktadır; fakat, tiroid stimulan hormonun ya da tiroid hormonlarının HPO eksenini nasıl bir mekanizma yoluyla etkilediği tam olarak bilinmemektedir

#### **2.3.1. Hipotiroidi, Kadın Üreme Ekseni ve Kadın İnfertilitesi**

Hipotroidi, tiroid hormonlarının sekresyonunun azalması ile oluşmaktadır ve sıklıkla otoimmün bir süreç aracılığıyla oluşurken, kimi zaman da tiroid operasyonu ya da radyoaktif iyodin ( $I^{131}$ ) tedavisinin ardından gelişir. Subklinik hipotiroidi, normal referans aralığı içindeki serbest T4 ve yüksek serum konsantrasyonuna sahip TSH ile tanımlanır. Klinik hipotiroidinin üreme çağındaki kadınlardaki sıklığı % 0.5-0.7 iken; subklinik hipotiroidinin sıklığı % 2 ile %4 arasındadır (Hollowell ve ark., 2002; Canaris ve ark., 2000). İnfertil kadınlarda yüksek TSH sıklığının % 0.7 ile % 4 arasında olduğu bildirilmişse de; bu konuyla ilgili yapılan çalışma sayısı sınırlı kalmıştır (Shalev ve ark., 1994; Lincoln ve ark., 1999). Hipotiroidinin kadın üreme hormonları üzerindeki etkileri, esas olarak cinsiyet hormonu bağlayıcı globulinde (SHBG) ve total östradiolda azalma; buna bağlı olarak da testosteron ve östradiolün SHBG'ye bağlanmış kısmındaki azalma şeklinde görülür. Bu değişiklikler; hipofiz-over eksenini etkileyebilir. Luteinizan hormon (LH) artabilir ama yine de normal aralıklar içerisinde kalır (Redmond GP, 2004; Koutras DA, 1997; Krassas ve ark., 1999) ve normal foliküler gelişim için gerekli olan pulsatil gonadotropin salıcı hormon sekresyonu ve ovülasyon bozulur (Poppe ve ark., 2004).

Hiperprolaktinemi, hipotiroidide en sık rastlanan bulgudur (Redmond GP, 2004). Yetişkin kadınlarda hipotiroidi, siklus uzunluğu ve kanama miktarında değişikliklere neden olmaktadır (Thomas R. ve Reid RL., 1987). Anovülasyon nedeniyle oluşan östrojen kırılma kanaması sonrasında, menoraji, oligomenore veya amenore sıklıkla rastlanan bulgulardır (Krassas ve ark., 1999). 2002'de yapılan bir çalışmada, özellikle de ovulatuar işlev bozukluğu olan infertil kadınlarda, kontrollere oranla daha yüksek bazal TSH

değerleri olduğu bildirilmiştir (Poppe ve ark., 2002). Tirotropin ve tiroid hormon reseptörleri, insan granüloza hücrelerinde gösterilmiş ve aynı zamanda da, hem T3 hem de T4 foliküler sıvıda tespit edilmiştir (Wakim ve ark., 1993; Wakim ve ark., 1994). T4, gonadotropinlerin, *in vitro* ortamda granüloza hücreleri tarafından gerçekleştirilen luteinizasyon ve progesterin sekresyonu üzerindeki etkisini arttırmaktadır (Wakim ve ark., 1995). Bu nedenle; over düzeyinde yetersiz tiroid hormon konsantrasyonu gonadların işlev bozukluğuna anlamlı bir katkı sağlayabilir. Tiroid hormonlarının oosit fizyolojisindeki rolü, *in vitro* fertilizasyon tedavisi alan kadınlarda TSH'ın fertilizasyon bozukluğuna neden olduğunu gösteren sonuçlarla desteklenmiştir (Cramer ve ark., 2003).

### **2.3.2. Hipertiroidi, Kadın Üreme Ekseni ve Kadın İnfertilitesi**

Klinik hipertiroidi, hipofizer TSH seviyesindeki azalma ve serum sT3, sT4 ya da her ikisinde de görülen artışla tanımlanır. Normal serum T4 ve T3 varlığında sadece TSH baskılanmışsa, bu durum subklinik hipertiroidi olarak adlandırılır. Genel popülasyonda hipertiroidi sıklığı % 1.5 civarındadır (Wang ve Crapo, 1997; Bjoro ve ark., 2000).

Tirotoksik kadınlarda SHBG üretimi anlamlı şekilde artmıştır; bağlı ya da total östradiol seviyesi normalden 2-3 kat daha fazladır ve serbest E2 normal aralığın en alt sınırındadır. Androjenin östrojene dönüşümü artmıştır. LH taban değeri sıklıkla artmış ve LH pikinin orta değeri keskinleşmiştir; bu da büyük olasılıkla ovülasyonu engellemektedir. Tirotoksikozda menstrüel bozukluklara sıkça rastlanmaktadır (Wang ve Crapo, 1997; Bjoro ve ark., 2000).

### **2.3.3. Hiperprolaktinemi**

İnsan prolaktini, 199 aminoasitten oluşan tek zincirli bir polipeptittir ve moleküler ağırlığı 23 kDa'dur. Prolaktinin, laktogenez, ozmoregülasyon, üreme, davranış modifikasyonu ve immün modülasyonunu da içeren 300'ü aşkın tanımlanabilir biyoaktivitesi vardır (Prabhakar VKB ve Davis JRE, 2008).

Hiperprolaktinemi terimi, dolaşımdaki prolaktin seviyelerindeki artışı anlatır. Klinik olarak en yaygın şekilde görülen hipofizer hormon anormalliğidir. Israrıcı hiperprolaktinemi, gonadotropin salgılayıcı hormonun pulsatil sekresyonunu keser;

luteinizan hormon ve folikül stimulan hormon salınımını inhibe eder ve doğrudan, gonadal steroid üretimini bozar. Hiperprolaktinemi, sekonder amenoreli kadınların % 30'unda, amenore ve galaktoreli kadınların % 75'inde bulunur (Prabhakar VKB ve Davis JRE, 2008). Yüksek serum prolaktin seviyelerinin foliküler olgunlaşmayı ve korpus luteum işlevini bozma etkisi vardır (Nawroth F., 2005).

Klinik primer hipotiroidili hastalarda yüksek serum prolaktin seviyelerine rastlanmıştır. Hiperprolaktineminin hipofiz ve over üzerindeki etkilerinden dolayı, tedavi edilmeyen hipotiroidi, ovulatuvar disfonksiyonla ilişkili olabilir; infertilite ve menstrüel bozukluklara neden olabilir (Meier ve ark., 2003).

Hiperprolaktineminin ve klinik olarak anlamlılığının, klinik ve subklinik hipotiroidideki frekansını değerlendiren büyük prospektif çalışmalar yoktur. Ayrıca; varolan sınırlı veriler, yüksek prolaktin konsantrasyonunun östrojen terapisi ve nöroleptik ya da antidepresif ilaçlar gibi potansiyel sebeplerini dikkate almamıştır (Raber ve ark., 2003).

## **2.4. TSH, Tiroid Hormonları, Prolaktin ve Oosit Gelişimi**

Tiroid hormonları, TSH, prolaktin ve kadın infertilitesi arasındaki ilişkiler çoklu ve karmaşıktır. Geleneksel olarak; prolaktin ve TSH ölçümlerinin, infertil kadınların değerlendirilmesinde önemli etkenler olduğu düşünülmüştür (Thomas R ve Redi RL, 1987). İnfertil kadınlar arasında tiroid işlev bozukluğunun devamlı taranmasının değeri çeşitli araştırmacılar tarafından sorgulanmıştır ve tiroid fonksiyon testlerinin ovulatuvar disfonksiyonlu infertil kadın grubunun tanımlanmasında yararlı olabileceği gösterilmiştir (Shalev ve ark., 1994).

### **2.4.1. Oosit gelişimi**

Olgun oosit üretimi ve steroid hormon biyosentezi, memelilerdeki overlerin başlıca işlevleridir. Bu fonksiyonlar, sıkı hormonal kontrol altındaki karmaşık bir süreç olan folikül gelişimi sırasında gerçekleşir (Greenwald GS ve Roy SK, 1994). Oosit kalitesi, kadın fertilitatesini belirleyen önemli bir faktördür. Foliküler sıvı, oosit gelişimi için çok önemli bir mikroçevredir; oosit kalitesini belirlemede, fertilizasyon ve embriyogenezde

büyük rol oynar. Oositlerin içinde yaşadığı bu mikroçevre, steroid hormon, büyüme faktörü, sitokinler, granüloza hücreleri ve lökositleri içeren ve metabolik olarak aktif bir sistemdir; foliküler olgunlaşma ve granüloza hücre fonksiyonları açısından çok önemlidir. Aynı zamanda, fertilizasyon oranını ve embriyo kalitesini de etkilemektedir (Agarwal ve ark., 2005). Embriyo kalitesinin değerlendirilmesi embriyonun morfolojisine göre yapılır. Embriyo morfolojisinin iki önemli tanımlayıcı değişkeni, blastomer büyüklüklerinin eşit olup olmaması ve hücresel fragmentasyonun derecesidir. Embriyo skorlaması bu parametrelerle aşağıdaki gibi yapılır (Hoover ve ark., 1995):

Grade 1: eşit blastomer, fragmentasyon yok.

Grade 2: eşit blastomer, çok az fragmentasyon var.

Grade 3: eşit olmayan blastomerler, orta derecede fragmentasyon var.

Grade 4: eşit olmayan blastomerler, aşırı derecede fragmentasyon var.

Olgun bir oositin gelişimi uzun bir süreçtir. Oosit olgunlaşması, oosit ve antral foliküllerdeki oositleri doğrudan çevreleyen kümülüs hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimleri içerir. Ovulatuvar bir foliküle geçiş, kümülüs hücrelerinin genişlemesini ve oositin mayotik olgunlaşmasını içerir. Çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin faktörler over folikül gelişimini ve ovülasyonu düzenler. Hipofizer gonadotropinler folikül gelişimi ve başkalaşımının düzenlenmesinde önemli rol oynar (Roche JF., 1996).

#### **2.4.2. TSH ve Oosit**

LH, FSH ve hCG gibi, TSH da 2 altbirimden oluşmaktadır; bunlar alfa ve beta altbirimleridir. Alfa altbirimi diğer hormonlarınkiyle aynıdır ama beta altbirimi her hormona özgüdür (Vaitukaitus ve ark., 1976). Alfa altbirimi LH ve FSH'inki ile aynı olduğundan, TSH'in gonadotropik bir hormon gibi çalışabileceği düşünülmektedir.

TSH seviyelerinin yükseldiği hipotiroidi durumlarında, TSH'in granüloza hücreleri ve teka hücreleri gibi over dokuları üzerinde etki edebileceği; böylece, steroidogenezi etkileyebileceği ve ardından HPO ekseninin normal geri besleme düzenini bozabileceği hipotezi kurulmuştur (De Silva ve ark., 1994). Ayrıca; TSH'in oosit kümülüs kompleksi üzerinde etki edebilmesi ve kümülüs genişlemesi ile oosit olgunlaşmasını etkileyebilmesi mümkündür.

### 2.4.3. Tiroid hormonları ve oosit gelişimi

Son yıllarda, dolaşımdaki yeterli miktardaki T3'ün normal kadın üreme fonksiyonlarında primer öneme sahip olduğu artan şekilde netlik kazanmıştır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda, T3 seviyelerindeki değişiklikler menstrüel bozukluklara, fertilitenin bozulmasına ve değişmiş hipofizer gonadotropin sekresyonuna neden olmaktadır (Cecconi ve ark., 1999).

Tiroid hormonları omurgalılarda gelişim üzerinde kritik etkilere sahipken, aynı zamanda T3, ovaryen folikül gelişimi ve kümülüs-oosit kompleksinin olgunlaşması için de önemli olabilir. T3'ün COC olgunlaşması ya da ovülasyonu moleküler yoldan etkileme mekanizmalarını tanımlamak; hem tanı için, hem de *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi için uygun şartları tanımlamada yararlı olabilir (Zhang ve ark., 1997).

Ayrıca; T3'ün, *in vitro* ortamda insan granüloza hücrelerindeki steroid biyosentezi üzerindeki FSH ve LH etkisini direkt olarak değiştirdiği görülmüştür (Goldman ve ark., 1993). Bu bulgular; memeli granüloza ve stromal hücrelerinde ve son zamanlarda da insan kümülüs hücreleri ve oositlerinde birçok T3 reseptör mesajcı RNA ve T3-bağlanan bölgenin tanımlanmasıyla desteklenmiştir (Cecconi ve ark., 1999).

### 2.5. Tiroid Durumu ve Oksidatif Stres

Tiroid hormonları büyüme, gelişim ve metabolizmanın anahtar düzenleyicileridir. Omurgalılarda hipertiroidik bir durumun gelişmesi, çoğu dokuda O<sub>2</sub> tüketim hızındaki artışa bağlı olarak bazal metabolik hızda artışa neden olmaktadır.

T3'e bağlı uzun-sürelili sinyal mekanizması; enerji metabolizmasında ve solunum zincirinde yeralan enzimlerin sentezini indükleyerek oksidatif fosforilasyon kapasitesinin artmasına neden olmaktadır. Tiroid hormonları bazal metabolik hızı ve spesifik mitokondri enzimlerini indükleyerek oksidatif sistemi hızlandırmakta; sonuç olarak da, sistemdeki serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (Fernández ve ark., 2006).

Tiroid hormonları, normal fizyolojik durumlarda mitokondrideki oksijen tüketimini değiştirerek bazal metabolik hızı etkileyen en önemli faktörlerdir; ve, serbest radikallerin başlıca üretim bölgeleridir. T3'ün ana bileşen olduğu tiroid hormonları omurgalılarda büyüme, gelişme ve metabolizmayı etkileyen çok sayıda fizyolojik etki göstermektedir; buna bağlı olarak da, homeostazın ana düzenleyicileri olarak düşünülebilirler. Diğer bir taraftan; dolaşımdaki tiroid hormonu seviyelerinin yüksek olması, tüm organizmada ve çeşitli vücut kısımlarındaki kilo kaybı, yüksek metabolizma hızı ve vücut sıcaklığı gibi olayları etkilemektedir. Plazma membranı, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin, tiroid hormonlarının etki gösterdiği potansiyel hücrel bölge olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stresin ilk hücre içi hedefi, mitokondrinin membran bileşenleridir (Torun ve ark., 2009).

### 2.5.1. Serbest radikaller

Homeostazın ve böylece de aerobik organizmaların bütünlüğünün en büyük tehditlerinden biri, serbest radikaller olarak adlandırılan bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip kimyasal türlerdir. Serbest radikaller, *in vivo* ortamda hücre için gerekli olan normal metabolik olayların yan ürünü şeklinde oluşurlar. Aerobik organizmalar yaşamları için gerekli enerjiyi sağlamak için karbon ve hidrojen zengin substratları oksitlemek için oksijen kullanırlar. Organik moleküller oksitlendiğinde, oksijen arka arkaya dört elektron transferiyle suya indirgenir; fakat, oksijen aynı zamanda tek elektron transferiyle tek basamaklı şekilde de indirgenebilir ve bunun sonucunda süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) gibi oksijen radikali ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi diğer reaktif oksijen türleri oluşur. ROS, biyomembrandaki çoklu doymamış yağ asitlerine, bir peroksidatif reaksiyon zinciri şeklinde, proteinlere ve enzimlere, fonksiyonel özelliklerine zarar verecek şekilde ve nükleik asitlere, zincirde kırılmalara ve bazlarda değişimlere neden olacak şekilde saldırabilir. ROS'un oksidatif etkilerini azaltmak için, evrimsel sağkalım süreci, aerobik organizmaların biyokimyasal bir savunma sistemine sahip olmalarını sağlamıştır. ROS oluşumu hücrelerin antioksidan kapasitesini aştığında, oksidatif hasar meydana gelir (Venditti P. ve Di Meo S., 2005).

Ana hücrel makromoleküllerin oksidasyonu ve sonucunda moleküler işlev bozukluğuna neden olabilen oksidatif stres, serbest radikallerin aşırı üretiminden ya da



çeşitli antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliğinden kaynaklanabilir (Krinsky N.I., 1992).

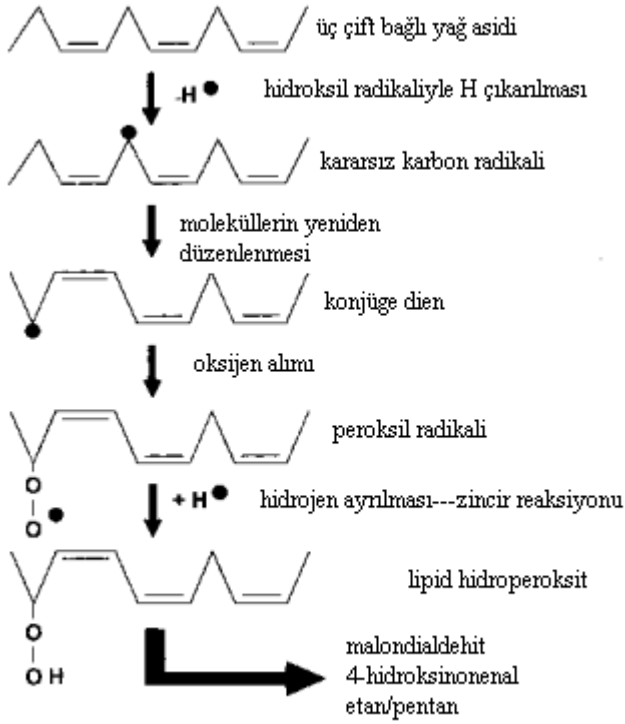
Serbest radikal metabolizması ile ilgili literatür çoktur ama dokulardaki oksidatif stresin endokrin kontrolü ile ilgili az bilgi vardır. Tiroid hormonları ile ilgili olarak da, oksidatif hasar çalışmaları ise ağırlıklı olarak lipid peroksidasyonu, oksidanlar, antioksidan enzimler ya da glutatyonla ilgilidir (Venditti ve ark., 1997).

Organizmada serbest radikallerin oluşturduğu reaksiyonlar radikalın bir diğer radikal ile ya da radikal olmayan ajanlar ile karşılaşması ile oluşur. Serbest radikaller, birbiri ile karşılaştığında kovalan bir molekül oluşturacak şekilde reaksiyona girerler. Serbest radikaller organizmada, radikal olmayan birçok hücre bileşeni ile de reaksiyona girebilir ve bu bileşenlerin yapı ve işlevlerini değiştirir. Böylece, serbest radikaller organizmada moleküler düzeyde birçok biyolojik etkiye neden olur. Oksidatif hasar görmüş olan lipidler, proteinler ve DNA biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin belirteçleridir (Çıkım ve ark., 2004).

### **2.5.2. Lipid peroksidasyonu**

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi tüm önemli bileşenlerini etkilemektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en önemlisi, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Oksidasyonda hidroksil, singlet oksijen ve süperoksit radikalleri ile peroksil ve alkoksil radikalleri rol oynamaktadır. Bu reaksiyon doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun koparılması ile başlayıp, geride kalan karbon atomunun üzerindeki paylaşılmamış elektronla devam etmektedir. Yalnız kalan bu elektron, konjüge dienleri oluşturmakta, bu bileşik ise oksijenle birleşerek peroksil radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu şekilde peroksidasyon başlamakta, en son olarak siklik peroksitler ve endoperoksitler meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonu son ürünlerinden birisi de malondialdehittir. Malondialdehit, stabil bir ürün olduğundan lipid peroksidasyonunun kümülatif bir ölçümü olarak kullanılmaktadır. Serbest radikaller tüm bu etkileri sonucunda oto katalitik etkiyle lipidlerin okside olmasına ve membran hasarına yol açmaktadır (Çıkım ve ark., 2004).

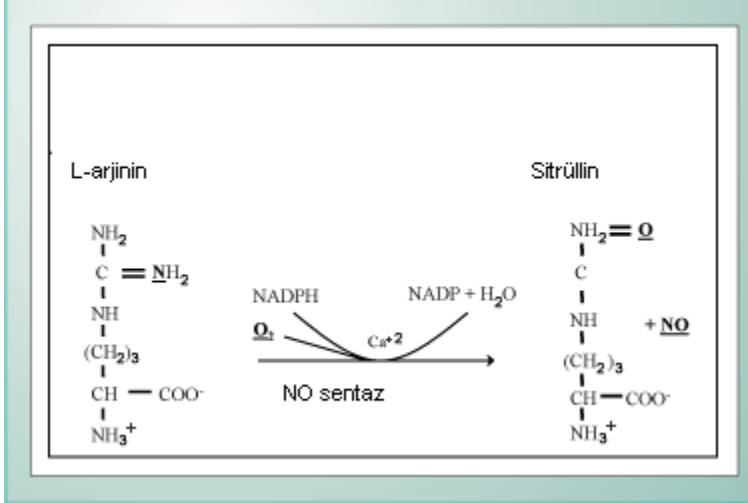
## Şekil 2.1. Lipid peroksidasyonu basamakları



### 2.5.3. Nitrik oksit

Çoğu memeli hücrelerinde azot içeren serbest bir radikal olan ve nitrik oksit olarak adlandırılan  $\text{NO}^\bullet$ , NO sentezlerle (NOS) NADPH'ya ihtiyaç duyulan bir reaksiyonda L- arjininden sentezlenir (Hollowell ve ark., 2002). Nitrik oksit, inorganik, kısa ömürlü (birkaç saniye) serbest radikal özelliği olan bir gazdır ve yüksek çözünürlüğüne bağlı olarak biyolojik membranlardan serbestçe yayılabilir. Fizyolojik konsantrasyonlarda  $\text{NO}^\bullet$  göreceli olarak reaktif değildir, ve fizyolojik aktivitesi çoğunlukla, çözünebilir guanilat siklazın hem grubundaki  $\text{Fe}^{+2}$  'ye bağlanıp enzim aktivasyonu ve siklik GMP üretimine neden olmasıyla oluşur (Ignarro L.J.); fakat,  $\text{NO}^\bullet$  topluca reaktif azot türleri ( $\text{NO}_x$ ) olarak bilinen birkaç farklı reaktif türe de dönüşebilir. Böylece;  $\text{NO}^\bullet$  süperoksit ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşturur. Bu oksidan, birçok biyolojik moleküle hasar verebilir.

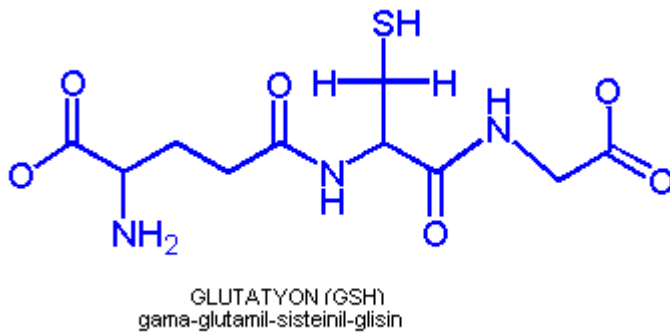
## Şekil 2.2. NO sentezi



## 2.5.4. Redükte glutatyon

İnsanlarda GSH, dokulardaki prooksidan-antioksidan dengesini sağlamada en önemli endojen antioksidan olarak görev yapmaktadır (Ebisch ve ark., 2006). Redükte glutatyon, sistein üzerinde serbest bir sülfidril grubuna sahip bir tripeptittir. Hücrenin sitoplazmasında, çekirdeğinde ve mitokondrisinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunan majör bir antioksidandır. GSH, hücreleri serbest radikaller tarafından meydana gelen oksidasyona karşı korumakta ve glutatyon peroksidaz için substrat görevi görmektedir. Bu selenyum içeren enzimin, hidrojen peroksiti suya indirgeyerek antioksidan savunmada önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Çekirdekte bulunan GSH, özellikle DNA tamir mekanizmalarının sürdürülebilmesinde son derece önemli olan protein sülfidrillerinin redoks düzeyinin korunmasını sağlar.

## Şekil 2.3. Redükte glutatyonun yapısı



Glutasyonun oksidatif strese karşı esas koruyucu özellikleri aşağıdaki gibidir:

- a. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon transferaz gibi oksidatif strese karşı detoksifikasyon özelliği olan enzimlerin kofaktörüdür.
- b. Plazma membranı boyunca aminoasit taşınmasında görev alır.
- c. Hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerini glutasyon peroksidaz aracılığıyla detoksifiye ederken, hidroksil ve singlet oksijeni doğrudan yakalama özelliğine sahiptir.
- d. Vitamin C ve E gibi antioksidanların aktif formlarına geri dönmesini hızlandırır (Valko ve ark., 2006).

Ayrıca; GSH ve zenobiyotikler arasındaki reaksiyonda önemli bir öneme sahiptir.

## **2.6. Oksidatif Stres ve İnfertilite**

IVF, popüler bir yardımla üreme tekniğidir ve infertilite tedavisinde yaygın olarak kabul edilmiş bir işlemdir; fakat, bu tekniğin başarısı sadece % 30 ile %40 arasında değişmektedir. % 20 ile % 30 arasındaki infertil çiftin infertilite nedenleri için belirgin bir açıklama yoktur. Açıklanamayan infertilitenin patofizyolojisi üzerine yapılmış son çalışmalar, oksidatif stresin altında yatan faktörlerden biri olabileceğini belirtmiştir. Oksidatif stresin, üreme fonksiyonlarını etkilediğine inanılmaktadır (Oral ve ark., 2006).

ROS'un erkeklerdeki üreme potansiyeli üzerine etkileri dünya çapında kapsamlı şekilde araştırılmıştır; fakat, ROS'un kadın üreme sistemi üzerindeki muhtemel etkileri ile ilgili sınırlı sayıda veri vardır.

### **2.6.1. ROS ve Kadın İnfertilitesi**

Serbest radikallerin kadın infertilitesindeki rolü hakkında az sayıda veri vardır. *In vitro* fertilizasyon siklusundaki kadınlarda görülen oksidatif stresle ilgili de az sayıda çalışma yapılmıştır.

Foliküler sıvı, ovülasyon öncesi olgunlaşan oositin mikroçevresinde meydana gelen metabolik ve hormonal prosesleri yansıtan biyolojik bir çerçeve olarak varsayılabilir ve aynı zamanda; IVF'teki fertilizasyon, embriyo klivajı ve gebelik oranları gibi sonuç değişkenlerinin bir belirteci olarak gösterilebilir; ama, foliküler sıvıdaki oksidatif stres

parametreleri ve IVF sonuçları arasındaki ilişki kapsamlı şekilde araştırılmamıştır (Das ve ark., 2006).

Oksidatif stres belirteçleri ve antioksidanlar dışı üreme kanalındaki çeşitli bölgelerde bulunmuştur; bu da çeşitli fizyolojik fonksiyonlardaki rollerini göstermektedir (Gardiner ve ark., 1998). Oksidatif stres belirteçleri aynı zamanda IVF/embriyo transferi yapılan hastaların foliküler sıvılarında da lokalize olmuştur. Oksidatif stresin, over fonksiyonunun fizyolojisinde rolü vardır. Fagositik makrofajlar, parankimal steroidojenik hücreler ve endotelial hücreler overlerde ROS oluşumuna neden olurlar. Steroidogeneizde yeralan teka hücreleri, granüloza lutein hücreleri, ve hilus hücreleri güçlü oksidatif enzim aktivitesi göstermektedir. Koruyucu bir enzim olan glutatyon peroksidazın konsantrasyonunun az olması, gametlerin döllenme durumunu etkileyebilir. Katalaz, glutatyon peroksidaz ve gama-glutamil sentetaz gibi enzimatik antioksidanların mRNA ekspresyonu insan oositlerinde çalışılmıştır. Özellikle Cu-Zn-SOD'nin metafaz-II oositinde iyi eksprese edildiği görülmüştür. Mn-SOD ve glutatyon peroksidazın germinal vezikül evresi ve metafaz II evresinde eksprese edildiği gözlenmiş; bu durum, bu enzimlerin oosit olgunlaşmasının belirteçleri olduğunu düşündürmüştür (El Mouatassim ve ark, 1999). Bu enzimlerin ekspresyonu oositlerin oksidatif strese maruz kaldığını ve enzimatik antioksidanların ROS'u etkisiz hale getiren katalistler olarak çalıştığını göstermektedir. Canlı bir oositin oluşumu, foliküler olgunlaşma, granüloza hücre olgunlaşması, ovülasyon ve luteinizasyona neden olan karmaşık endokrin, parakrin ve otokrin faktör etkileşimi ile düzenlenmektedir.

Foliküler sıvıdaki oosit ortamında granüloza hücreleri tarafından üretilen ve erken oosit çevresinde yüksek seviyede bulunan östrojenler majör antioksidan savunma mekanizmasına katkıda bulunmaktadır (Jozwik ve ark., 1999). Östrojenler, fenolik hidroksil bir grup taşıdıklarından dolayı oksijen tüketimini ve serbest radikaller tarafından meydana gelen lipid peroksidasyonunu inhibe eden antioksidan bir rol oynamaktadır (Kaya ve ark., 2004).

## 2.6.2. ROS ve IVF

Yardımla üreme tekniklerinin başarısı ya da başarısızlığı, altta yatan nedenleri tanımlamaya ve her birey için uygun, farklı tedavi protokolleri belirlemeye dayanmaktadır. Stimülasyona verilen başarılı ovaryen cevap, bazal over rezervine bağlı olarak elde edilen oosit sayısı ile belirlenir. OS'in açıklanamayan infertilitenin altında yatan bir faktör olduğu düşünülerek, buna over rezervini azaltarak katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Bu, gonadotropin stimülasyonuna verilen over cevabının belirlenmesinde yararlı belirteçler olan hormonların ovaryen granüloza hücrelerden salgılanmasının azalmasına neden olabilir (Muttukrishna ve ark., 2004).

ROS, endojen ya da ekzojen şekilde oluşabilir; ama, iki şekilde de oosit ve embriyoyu etkileyebilir. IVF kültür ortamı, oositleri ve preimplantasyon embriyosunu etkileyen ekzojen ROS üretim yeri olabilir. Serbest radikaller, embriyo metabolizmasının bir sonucu olarak oluşur. *In vitro* kültür ortamında oksidatif stres oluşumunun, fertilizasyon sonrası gelişim ve yardımla üreme sonuçları üzerinde zararlı etkileri olabilir (Agarwal ve ark., 2005). Embriyo gelişiminde redoks durumu ile ilişkili bazı özgün olaylar vardır. Kültür ortamında 1. gündeki yüksek ROS seviyelerinin, geç embriyo gelişimi, yüksek fragmentasyon ve uzun süren kültürde morfolojik olarak anormal blastosist gelişimi ile ilişkili olduğu görülmüştür. ICSI uygulaması yapılan hastalarda, 1. gün kültür ortamı ROS seviyeleri ile düşük fertilizasyon oranları arasında anlamlı bir korelasyon bildirilmiştir. Kötü kaliteli embriyoların inkübasyonu, 24 saatlik bir inkübasyon sonrasında preimplantasyon embriyo kültür ortamındaki TAC'teki azalma ile ilişkili çıkmıştır. Bundan dolayı; kötü kaliteye sahip embriyoların yüksek ROS oluşumu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Das ve ark., 2006).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Olguların seçimi

Bu çalışmaya; Eylül 2008 ve Ekim 2009 tarihleri arasında, Kocaeli Üniversitesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi'ne tedavi için başvuran infertil çiftler arasından rastgele seçilen 62 kadın hasta dahil edildi. Hastaların hepsinden yumurta toplama işlemi sırasında folikül sıvılarının bu tezde kullanılacağını bildiklerine ve buna razı olduklarına dair bilgilendirilmiş onam alındı. Hastaların folikül sıvılarında TSH, serbest T3, serbest T4 ve prolaktin değerlerinin ölçümü için örnekler Kocaeli Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na gönderildi. Örneklerdeki malondialdehit, nitrik oksit ve glutasyon ölçümleri Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.D. laboratuvarında yapıldı.

#### 3.2. Örneklerin alınması

Gonadotropinlerle uygulanan ovülasyon induksiyonu sonunda uygulanan oosit toplama işlemi sırasında, hastanın dominant iki folikülünden elde edilen folikül sıvıları 3000 rpm'de santrifüj edilerek içindeki eritrositler uzaklaştırıldı ve berrak süpernatant, eppendorflara bölünerek -20°C'de saklandı. İçerisine kültür medyumunu karışmış ya da hemolizli olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi.

#### 3.3. Kullanılan Cihazlar, Reaktif Kitler ve Kimyasallar

##### Cihazlar:

|                               |                  |
|-------------------------------|------------------|
| Spektrofotometre              | Hitachi U-1800   |
| Isıtmalı manyetik karıştırıcı | Heidolph MR 3001 |
| Vortex                        | Nüve NM 110      |
| Sıcak su banyosu              | Nüve BM 402      |
| Buzdolabı                     | Bosch            |
| Santrifüj                     | Nüve NF 800R     |
| pH metre                      | Consort C533     |
| Otomatik mikropipetler        | Eppendorf        |
| Hassas terazi                 | AND GR-200       |

**Reaktif kitler:**

|                |               |
|----------------|---------------|
| TSH kiti       | Cobas - Roche |
| St3 kiti       | Cobas - Roche |
| St4 kiti       | Cobas - Roche |
| Prolaktin kiti | Cobas - Roche |

**Kimyasallar:**

|                                                               |                     |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|
| SDS (Sodyum dodesil sülfat)                                   | Sigma L4509         |
| TBA (Tiyobarbütirik asit)                                     | Sigma T5500         |
| TEP                                                           | Sigma T9889         |
| Asetik asit                                                   | Sigma SK.R.27225    |
| n-Bütanol                                                     | Sigma 537993        |
| Piridin                                                       | Sigma SK.S.P57506   |
| Çinko sülfat (ZnSO <sub>4</sub> )                             | Riedel-deHaën 14455 |
| Sodyum hidroksit (NaOH)                                       | Riedel-deHaën 06203 |
| Glisin                                                        | Sigma G8790         |
| Sülfanilamid                                                  | Sigma S-9251        |
| HCl                                                           | Riedel-deHaën 30721 |
| N-naftiletilen diamin (NED)                                   | Sigma N-9125        |
| Bakır sülfat                                                  | Merck A810587 504   |
| Sülfürik asit                                                 | Merck K28584813 049 |
| Sodyum borat (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) | Sigma S-9640        |
| Metafosforik asit                                             | Sigma M5043         |
| Na-EDTA (titripleks)                                          | Sigma E4884         |
| NaCl                                                          | Riedel-deHaën 13423 |
| Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>                              | Sigma 04276         |
| Sodyum sitrat                                                 | Sigma 71498         |
| DTNB                                                          | Sigma D8130         |
| GSH                                                           | Sigma 49750         |
| KCl                                                           | Sigma SK.R.12636    |
| Kadmiyum                                                      | Fluka Chemika 00623 |



## **4. METOTLAR**

### **4.1. HORMON ÖLÇÜMLERİ**

#### **4.1.1. TSH ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda elektrokemilüminesans yöntemiyle, Cobas marka ticari TSH kiti kullanılarak Roche E170 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar  $\mu\text{IU/ml}$  olarak verildi.

#### **4.1.2. FT3 ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda elektrokemilüminesans yöntemiyle, Cobas marka ticari sT3 kiti kullanılarak Roche E170 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar  $\text{pg/ml}$  olarak verildi.

#### **4.1.3. FT4 ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda elektrokemilüminesans yöntemiyle, Cobas marka ticari sT4 kiti kullanılarak Roche E170 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar  $\text{ng/dl}$  olarak verildi.

#### **4.1.4. Prolaktin ölçümü**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda elektrokemilüminesans yöntemiyle, Cobas marka ticari prolaktin kiti kullanılarak Roche E170 cihazında çalışıldı. Konsantrasyonlar  $\text{ng/ml}$  olarak verildi.

### **4.2. Folikül Sıvısı MDA Ölçümü**

Foliküler sıvı MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem kullanılarak ölçüldü (Ohkawa ve ark. 1979). Bunun için, foliküler sıvıda lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak oluşan malondialdehitin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi esasına dayanan bu yöntem kullanıldı.

**Kullanılan Ayıraçlar:****a) SDS (Sodyum dodesil sülfat):**

0,405 gr SDS, 5 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı.

**b) TBA (Tiyobarbütirik asit):**

0,12 gr TBA, 15 ml distile suya eklendi ve kaynar su banyosunda çözüldü.

**c) MDA Çalışma Standartı:**

TEP distile suda çözdürülerek 50 nmol/ml'lik stok standart hazırlanmış olur. Bu stok standart çözeltiden ardışık dilüsyonlarla 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/ml'lik standartlar hazırlandı.

**d) Asetik asit çözeltisi:**

20 ml glasiyel asetik asite 80 ml distile su eklenerek hazırlandı. pH=3,5 yapmak için 10 N NaOH çözeltisi kullanıldı.

**e) n-Bütanol/Piridin:**

150 ml bütanol üzerine 10 ml piridin eklenerek hazırlandı.

**Çalışma Prosedürü:**

| <b>Çözeltiler:</b>                                                                                                                                         | <b>Kör</b> | <b>Standart</b> | <b>Deney</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Foliküler sıvı                                                                                                                                             | —          | —               | 0,2 ml       |
| MDA Çalışma Standartı                                                                                                                                      |            | 0,2 ml          | —            |
| SDS(%8,1)                                                                                                                                                  | 0,2 ml     | 0,2 ml          | 0,2 ml       |
| Asetik Asit (% 20, pH=3,5)                                                                                                                                 | 1,5 ml     | 1,5 ml          | 1,5 ml       |
| TBA (% 0,8):                                                                                                                                               | 1,5 ml     | 1,5 ml          | 1,5 ml       |
| Distile Su                                                                                                                                                 | 0,8 ml     | 0,8 ml          | 0,8 ml       |
| Çözeltilerin hepsi eklendikten sonra çok iyi vortekslenerek karıştırıldı ve 60 dakika kaynar su banyosunda bekletildikten sonra musluk suyu ile soğutuldu. |            |                 |              |
| Distile Su                                                                                                                                                 | 1 ml       | 1 ml            | 1 ml         |
| Bütanol / piridin (15:1)                                                                                                                                   | 5 ml       | 5 ml            | 5 ml         |

Bütanol/piridin çözeltisi eklenip vortekslelendikten sonra 5 dakika oda ısısında 2500 g 'de santrifüj edildi. Spektrofotometre 532 nm 'ye ayarlanarak havaya karşı absorbans sıfırlandı. Önce kör tüpünün üst kısmındaki bütanol fazının absorbansı okutulurak absorbans sıfırlandı. Daha sonra deney tüplerin üst kısmındaki bütanol fazlarının absorbansları okutulurak sonuçlar  $\mu\text{mol/l}$  ( $\mu\text{M MDA}$ ) olarak hesaplandı.

#### 4.4. Folikül Sıvısı NO<sup>•</sup> Ölçümü

NO<sup>•</sup>; biyolojik sistemlerde üretildikten sonra, 2-30 sn gibi çok kısa bir sürede nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve ardından nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oksitlenir (Ignarro ve ark., 1993). Nitrat formu, NO<sup>•</sup> türevlerinin en kararlı halidir.



NO<sup>•</sup> kararlı bir yapıda olmadığından dolayı direkt olarak ölçülmesi zordur. Bu yüzden NO<sup>•</sup> seviyelerini belirlemek için numunede bulunan nitratı nitrit formuna indirgenmekte ve ortamdaki nitrit ölçülerek toplam nitrit ve nitrat tayin edilmektedir. Bu da ortamda bulunan NO<sup>•</sup> 'yu yansıtmaktadır.

#### Kullanılan reaktifler:

- 1. Çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) çözeltisi:** Çinko sülfat distile suda çözülerek, son konsantrasyon 75 mmol/L'ye ayarlandı.
- 2. Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi:** Sodyum hidroksit distile suda çözülerek, son konsantrasyon 55 mmol/L'ye ayarlandı.
- 3. Glisin-NaOH çözeltisi:** Glisin distile suda çözülerek, son konsantrasyonu 200 mmol/L olacak şekilde ayarlandı. Ardından; 4 M NaOH ile pH'sı 9.7'ye ayarlandı.
- 4. Sülfanilamid:** 5 gr sülfanilamid, 3 M sıcak HCl içerisinde eritildi ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

5. **N-naftiletilen diamin (NED) çözeltisi:** 100 mg NED, distile suda çözülerek son hacim 500 ml'ye tamamlandı.
6. **Griess reaktifi:** Sülfanilamid ve N-naftiletilen daiminin bire bir karıştırılmasıyla hazırlandı. Bu karışım deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı ve koyu renkli şişede bekletildi.
7. **Bakır sülfat çözeltisi:** Bakır sülfat distile suyla çözülerek 100 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.
8. **Sülfürik asit çözeltisi:** Sülfürik asit distile suda çözülerek 200 mmol/L'lik konsantrasyona ayarlandı.
9. **Sodyum borat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) çözeltisi:** Sodyum borat, distile suda çözülerek son konsantrasyon 10 mmol/L olacak şekilde ayarlandı.
10. **Standart çözeltiler:** Stok sodyum nitrit ve nitrat çözeltileri (1 mM) 10 mM sodyum borat içinde çözülerek 100, 50, 20, 10, 5 µM konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlandı.

Araştırmamızda total NO<sup>•</sup> tayini için numune olarak folikül sıvısı kullanıldı. İlk olarak deproteinizasyon işlemi yapıldı. Bunun için; 0,25 ml numune üzerine önce 0,5 ml çinko sülfat ardından 0,5 ml sodyum hidroksit ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra 5000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatant redüksiyon işleminde kullanıldı.

24 saat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde bekletilen kadmiyum, 2 defa distile su ile yıkandı. Daha sonra içindeki su boşaltılarak bekmeden içine bakır sülfat çözeltisi eklendi. Şişe yaklaşık 15 dakika, bakır sülfat renksiz hale gelene kadar karıştırıldı. Kadmiyum tanecikleri koyu renge dönüştü. Ardından, bakır sülfat boşaltıldı ve hava ile temasını (oksitlenmesini) engellemek için kadmiyum içine glisin-NaOH çözeltisi eklendi.

Her numune için boş bir deney tüpüne aktiflenmiş kadmiyumdan yaklaşık 2 gr koyuldu. Tekrar hava ile temasını engellemek için üzerine 1 ml glisin-NaOH, 500 µl distile

su ve deproteinize edilmiş numune ve standartlardan 500 µl koyuldu. Daha sonra tüpler ışık almayan bir yerde 1,5 saat bekletildi. Bu süre içinde 15 dakikalık aralıklarla tüpler hafifçe çalkalanarak numunelerin içindeki  $\text{NO}_3^-$ 'ün  $\text{NO}_2^-$ 'ye dönüşümü sağlandı. 1,5 saat sonunda tüpler 3000 g'de 3 dakika kadar santrifüj edildi.

Ardından; tüplerden alınan 1 ml süpernatant ile 1 ml griess reaktifi temiz bir deney tüpüne koyuldu ve ışık almayan bir ortamda 30 dakika kadar inkübe edildi. Meydana gelen renkli solüsyonların 545 nm'deki absorbansları ölçüldü. Standartlardan elde edilen sonuçlara göre standart eğri grafiği çizildi. Grafiğin eğimine göre numunelerdeki total  $\text{NO}^*$  (nitrit + nitrat) konsantrasyonları hesaplandı. Konsantrasyonlar µmol/l olarak verildi.

#### **4.5. Folikül Sıvısı GSH Ölçümü**

Foliküler sıvı GSH düzeylerinin ölçülmesi için Ellman metodu kullanıldı (Ellman, 1959). Foliküler sıvıdaki serbest sülfidril gruplarının Ellman ayırıcı ile oluşturduğu rengin absorbansı spektrofotometrik olarak okunarak glutatyon miktarı belirlendi.

#### **Kullanılan Ayraçlar:**

##### **a) Proteinsizleştirme Çözeltisi:**

1,67 gr metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA (titripleks) ve 30 gr NaCl 100 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı.

##### **b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Çözeltisi:**

42,59 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1000 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı.

##### **c) Ellman Renk Ayırıcı:**

0,1 gr sodyum sitrat ve 4 mg DTNB 10 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı.

##### **d) Glutatyon Standartı:**

5 mg GSH tartılarak 5 ml distile su içinde çözünerek stok standart hazırlandı. Bu stok çözelti kullanılarak 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 ve 0,0312 mg/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı.

### Çalışma Prosedürü:

| Çözeltiler                                                                                        | Kör    | Standart | Deney  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------|--------|
| KCl Çözeltisi (0,15 M)                                                                            | 2 ml   | 1,5 ml   | 1,5 ml |
| Foliküler sıvı                                                                                    | —      | ...      | 0,5 ml |
| Glutasyon (GSH) Standartı                                                                         | —      | 0,5 ml   | —      |
| Proteinsizleştirme Çözeltisi                                                                      | 3 ml   | 3 ml     | 3 ml   |
| Bütün tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve sonraki aşamada süpernatantlar kullanıldı. |        |          |        |
| Süpernatant                                                                                       | 0,5 ml | 0,5 ml   | 0,5 ml |
| Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> Çözeltisi (0,3 M)                                                | 2 ml   | 2 ml     | 2 ml   |
| Ellman Renk Ayırıcı                                                                               | 0,5 ml | 0,5 ml   | 0,5 ml |

Spektrofotometre 412 nm'ye ayarlanarak kör çözeltisi ile absorbans sıfırlandı. Numune absorbansları okundu ve sonuçlar  $\mu\text{mol/ L}$  olarak tanımlandı.

### 4.6. İstatistiksel Analiz

Araştırmanın istatistiksel analizinde SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanıldı. Tüm verilerin normal dağılıma uygunluk testleri yapıldı. Sürekli değişkenler Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Pearson korelasyon analizi ile sürekli değişkenler arası korelasyon analizleri yapıldı. Her analizde  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Güçlü korelasyonlarda  $p < 0.01$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

- Gebe kalan kadınların folikül sıvılarındaki TSH seviyeleri ortalaması (ffTSH =  $4.45 \pm 6.2$ ) ile gebe kalamayan kadınlardaki TSH seviyeleri ortalaması (ffTSH =  $2.64 \pm 2.05$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p= 0.345$ ) (Çizelge 2).
- Gebe kalan kadınların folikül sıvılarındaki sT3 seviyeleri ortalaması (ffsT3 =  $3.23 \pm 0.34$ ), gebe kalamayan kadınların folikül sıvısındaki sT3 seviyelerinden (ffsT3 =  $3.75 \pm 1.97$ ) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşüktü ( $p= 0.012$ ) (Çizelge 2).
- Gebe kalan kadınların folikül sıvılarındaki sT4 seviyeleri ortalaması (ff sT4 =  $1.1 \pm 0.16$ ) ile gebe kalamayan kadınlardaki sT4 seviyeleri ortalaması (ff sT4 =  $1.16 \pm 0.16$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0.151$ ) (Çizelge 2).
- Gebe kalan kadınların folikül sıvılarındaki prolaktin seviyeleri ortalaması (ffPRL= $54.14 \pm 23.66$ ), gebe kalamayan kadınların folikül sıvısındaki prolaktin seviyelerinden (ffPRL= $42.15 \pm 17.7$ ) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ( $p=0.042$ ) (Çizelge 2).
- Gebe kalan kadınların folikül sıvılarındaki MDA seviyeleri ortalaması (ffMDA= $1.16 \pm 0.57$ ), gebe kalamayan kadınların folikül sıvısındaki MDA seviyelerinden (ffMDA= $0.7 \pm 0.5$ ) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ( $p=0.001$ ) (Çizelge 2).
- Gebe kalan kadınların folikül sıvılarındaki NO seviyeleri ortalaması (ffNO= $33.67 \pm 12.23$ ), gebe kalamayan kadınların folikül sıvısındaki NO seviyelerinden (ffNO= $41.11 \pm 15.1$ ) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşüktü ( $p=0.039$ ) (Çizelge 2).

- Gebe kalan kadınlarda foliküler sıvı MDA seviyeleri ile GSH seviyeleri arasında güçlü negatif bir korelasyon olduğu gözlemlendi ( $r = -0.463$ ,  $p=0.015$ ) (Çizelge 3).
- Gebe kalan hastalarda foliküler sıvı TSH hormon seviyeleri, sT3 ve sT4 ile negatif korelasyona sahip çıktı (sırasıyla;  $r = -0.474$ ,  $p=0.012$ ;  $r=-0.665$ ,  $p=0.000$ ) (Çizelge 3).
- Tüm hastalara bakıldığında; foliküler sıvı TSH seviyeleri ile sT3 korelasyon göstermezken, sT4 ile TSH arasında güçlü negatif bir korelasyon izlenmiştir (sırasıyla;  $r = -0.167$   $p=0.196$ ;  $r = -0.440$   $p=0.000$ ) (Çizelge 4).
- Yine tüm hasta grubunda; foliküler sıvı prolaktin seviyeleri ile MDA seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür ( $r = 0.260$ ,  $p=0.041$ ) (Çizelge 4).
- Foliküler sıvı TSH ve prolaktin değerleri, serum TSH ve prolaktin değerleri ile pozitif korelasyon gösterirken (sırasıyla;  $r=0.963$ ,  $p=0.000$ ;  $r=0.469$ ,  $p=0.000$ ), folikül sıvılarındaki sT3 ve sT4 değerleri serumla korelasyon göstermemiştir (sırasıyla;  $r = 0.025$ ,  $p=0.846$ ,  $r=-0.119$ ,  $p=0.359$ ) (Çizelge 5).
- Folikül sıvısı TSH değerleri 2.5 mIU/L'nin altında olan kadınlarla 2.5 mIU/L ve üzeri olan kadınların *in vitro* fertilizasyon parametreleri ve oksidatif hasar parametreleri arasında anlamlı fark görülmemiştir (Çizelge 6).
- Folikül sıvısındaki NO seviyeleri ve *in vitro* fertilizasyon parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Çizelge 7).
- Folikül sıvısındaki MDA seviyeleri ve *in vitro* fertilizasyon parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Çizelge 8).



- Folikül sıvısındaki serbest T3 seviyeleri ve *in vitro* fertilizasyon parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Çizelge 9).
- Folikül sıvısındaki prolaktin seviyelerinin elde edilen toplam oosit sayısı ve olgun oosit sayısı ile güçlü pozitif bir korelasyon gösterdiği (sırasıyla;  $r=0.390$ ,  $p=0.002$ ;  $r=0.394$ ,  $p=0.002$ ); fakat diğer *in vitro* fertilizasyon parametreleriyle anlamlı bir korelasyona sahip olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 10).
- Folikül sıvısındaki TSH seviyeleri ve *in vitro* fertilizasyon parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Çizelge 11).

**Çizelge 1.** Çalışmadaki bütün hastaların tanımlayıcı istatistikleri

|                                       | <b>N</b> | <b>Minimum</b> | <b>Maksimum</b> | <b>Ortalama</b> | <b>Standart sapma</b> |
|---------------------------------------|----------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| <b>Hasta yaşı</b>                     | 62       | 22             | 41              | 32.32           | 4.945                 |
| <b>FF TSH</b>                         | 62       | 0.05           | 26.35           | 3.43            | 4.42                  |
| <b>FF ft3</b>                         | 62       | 2.50           | 14.91           | 3.52            | 1.507                 |
| <b>FF ft4</b>                         | 62       | 0.71           | 1.53            | 1.13            | 0.167                 |
| <b>FF PRL</b>                         | 62       | 18.42          | 104.40          | 47.37           | 21.18                 |
| <b>Serum TSH</b>                      | 62       | 0.06           | 24.41           | 3.21            | 3.77                  |
| <b>Serum ft3</b>                      | 62       | 2.19           | 6.50            | 3.22            | 0.59                  |
| <b>Serum ft4</b>                      | 62       | 0.59           | 16.50           | 1.39            | 1.95                  |
| <b>Serum PRL</b>                      | 62       | 6.7            | 128.4           | 37.36           | 27.49                 |
| <b>FF MDA</b>                         | 62       | 0.11           | 2.64            | 0.902           | 0.572                 |
| <b>FF NO<sup>+</sup></b>              | 62       | 19.80          | 73.80           | 37.87           | 14.31                 |
| <b>FF GSH</b>                         | 62       | 0.001          | 0.024           | 0.0067          | 0.0044                |
| <b>Oosit sayısı</b>                   | 62       | 1              | 45              | 11.97           | 8.512                 |
| <b>Olgun oosit sayısı</b>             | 62       | 0              | 35              | 9.08            | 7.120                 |
| <b>Döllenmiş oosit sayısı</b>         | 62       | 0              | 27              | 6.7             | 5.3                   |
| <b>Transfer edilen embriyo sayısı</b> | 62       | 0              | 4               | 2.7             | 1.1                   |
| <b>Grade 1 embriyo sayısı</b>         | 62       | 0              | 4               | 1.44            | 1.1                   |
| <b>Grade 2 embriyo sayısı</b>         | 62       | 0              | 4               | 0.87            | 0.95                  |
| <b>Grade 3 embriyo sayısı</b>         | 62       | 0              | 4               | 0.34            | 0.77                  |

**Çizelge 2.** Gebe kalan ve kalamayan hastalar arasındaki hormon, oksidatif hasar ve *in vitro* fertilizasyon parametrelerinin karşılaştırılması

|                        | <b>Gebe kalanlar<br/>(N=27)</b> | <b>Gebe kalamayanlar<br/>(N=35)</b> | <b>P değeri</b> |
|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| Hasta yaşı             | 32.30±4.738                     | 32.34±5.167                         | 0.898           |
| FF TSH                 | 4.4499±6.198                    | 2.6406±2.05                         | 0.345           |
| FF ft3                 | 3.2322±0.340                    | 3.7469±1.968                        | <b>0.012</b>    |
| FF ft4                 | 1.0889 ±0.163                   | 1.1613±0.16503                      | 0.151           |
| FF PRL                 | 54.1448±23.666                  | 42.1497±17.670                      | <b>0.042</b>    |
| MDA                    | 1.1615 ±0.566                   | 0.7026±0.497                        | <b>0.001</b>    |
| NO <sup>•</sup>        | 33.67±12.23                     | 41.1143±15.106                      | <b>0.039</b>    |
| GSH                    | 0.0082±0.0053                   | 0.0056±0.0031                       | 0.076           |
| Oosit sayısı           | 12.15±6.91                      | 11.83±9.66                          | 0.447           |
| Olgun oosit sayısı     | 9.30±5.71                       | 8.91±8.12                           | 0.381           |
| Döllenmiş oosit sayısı | 7.26±4.486                      | 6.26±5.878                          | 0.160           |
| Grade 1 embriyo sayısı | 1.89±1.050                      | 1.09±1.011                          | <b>0.004</b>    |
| Grade 2 embriyo sayısı | 0.63±0.926                      | 1.06±0.938                          | <b>0.039</b>    |
| Grade 3 embriyo sayısı | 0.30±0.542                      | 0.37±0.910                          | 0.697           |
| Fertilizasyon oranı    | 81.84± 3.74                     | 70.77 ±4.86                         | 0.137           |

p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.

**Çizelge 3.** Gebe kalan hastalarda hormon ve oksidatif stres parametrelerinin korelasyonu

|                  | TSH            | fT3           | fT4            | PRL   | NO*   | MDA           | GSH           |
|------------------|----------------|---------------|----------------|-------|-------|---------------|---------------|
| TSH Pearson cor. | 1              | <b>-,474*</b> | <b>-,665**</b> | -,117 | -,079 | -,065         | -,200         |
| Sig. (2-yönlü)   |                | <b>,012</b>   | <b>,000</b>    | ,562  | ,695  | ,749          | ,318          |
| N                | 27             | <b>27</b>     | <b>27</b>      | 27    | 27    | 27            | 27            |
| fT3 Pearson cor. | <b>-,474*</b>  | 1             | <b>,444*</b>   | ,111  | ,186  | ,257          | -,154         |
| Sig. (2-yönlü)   | <b>,012</b>    |               | <b>,020</b>    | ,581  | ,354  | ,195          | ,442          |
| N                | <b>27</b>      | 27            | <b>27</b>      | 27    | 27    | 27            | 27            |
| fT4 Pearson cor. | <b>-,665**</b> | <b>,444*</b>  | 1              | -,033 | -,150 | -,097         | ,077          |
| Sig. (2-yönlü)   | <b>,000</b>    | <b>,020</b>   |                | ,870  | ,455  | ,630          | ,702          |
| N                | <b>27</b>      | <b>27</b>     | 27             | 27    | 27    | 27            | 27            |
| PRL Pearson cor. | -,117          | ,111          | -,033          | 1     | ,174  | ,336          | -,154         |
| Sig. (2-yönlü)   | ,562           | ,581          | ,870           |       | ,384  | ,087          | ,443          |
| N                | 27             | 27            | 27             | 27    | 27    | 27            | 27            |
| NO* Pearson cor. | -,079          | ,186          | -,150          | ,174  | 1     | ,340          | -,104         |
| Sig. (2-yönlü)   | ,695           | ,354          | ,455           | ,384  |       | ,082          | ,605          |
| N                | 27             | 27            | 27             | 27    | 27    | 27            | 27            |
| MDA Pearson cor. | -,065          | ,257          | -,097          | ,336  | ,340  | 1             | <b>-,463*</b> |
| Sig. (2-yönlü)   | ,749           | ,195          | ,630           | ,087  | ,082  |               | <b>,015</b>   |
| N                | 27             | 27            | 27             | 27    | 27    | 27            | <b>27</b>     |
| GSH Pearson cor. | -,200          | -,154         | ,077           | -,154 | -,104 | <b>-,463*</b> | 1             |
| Sig. (2-yönlü)   | ,318           | ,442          | ,702           | ,443  | ,605  | <b>,015</b>   |               |
| N                | 27             | 27            | 27             | 27    | 27    | <b>27</b>     | 27            |

\*\* Korelasyon  $p < 0.01$  seviyesinde anlamlıdır.

\* Korelasyon  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 4.** Foliküler sıvıdaki hormon ve oksidatif stres parametrelerinin korelasyonu

|                         | TSH            | fT3   | fT4            | PRL          | NO*    | MDA          | GSH   |
|-------------------------|----------------|-------|----------------|--------------|--------|--------------|-------|
| TSH Pearson correlation | 1              | -,167 | <b>-,440**</b> | ,057         | - ,117 | ,027         | -,058 |
| Sig. (2-tailed)         |                | ,196  | <b>,000</b>    | ,661         | ,364   | ,833         | ,654  |
| N                       | 62             | 62    | <b>62</b>      | 62           | 62     | 62           | 62    |
| fT3 Pearson correlation | -,167          | 1     | ,164           | -,003        | -,137  | -,050        | -,168 |
| Sig. (2-tailed)         | ,196           |       | ,202           | ,983         | ,289   | ,702         | ,192  |
| N                       | 62             | 62    | 62             | 62           | 62     | 62           | 62    |
| fT4 Pearson correlation | <b>-,440**</b> | ,164  | 1              | -,050        | ,195   | -,105        | ,073  |
| Sig. (2-tailed)         | <b>,000</b>    | ,202  |                | ,700         | ,129   | ,416         | ,574  |
| N                       | <b>62</b>      | 62    | 62             | 62           | 62     | 62           | 62    |
| PRL Pearson correlation | ,057           | -,003 | -,050          | 1            | ,057   | <b>,260*</b> | -,086 |
| Sig. (2-tailed)         | ,661           | ,983  | ,700           |              | ,659   | <b>,041</b>  | ,509  |
| N                       | 62             | 62    | 62             | 62           | 62     | <b>62</b>    | 62    |
| NO* Pearson correlation | -,117          | -,050 | ,195           | ,057         | 1      | -,012        | -,121 |
| Sig. (2-tailed)         | ,364           | ,702  | ,129           | ,659         |        | ,925         | ,350  |
| N                       | 62             | 62    | 62             | 62           | 62     | 62           | 62    |
| MDA Pearson correlation | ,027           | -,168 | -,105          | <b>,260*</b> | -,012  | 1            | -,231 |
| Sig. (2-tailed)         | ,833           | ,192  | ,416           | <b>,041</b>  | ,925   |              | ,071  |
| N                       | 62             | 62    | 62             | <b>62</b>    | 62     | 62           | 62    |
| GSH Pearson correlation | -,058          | -,137 | ,073           | -,086        | -,121  | -,231        | 1     |
| Sig. (2-tailed)         | ,654           | ,289  | ,574           | ,509         | ,350   | ,071         |       |
| N                       | 62             | 62    | 62             | 62           | 62     | 62           | 62    |

\*\* Korelasyon  $p < 0.01$  seviyesinde anlamlıdır.

\* Korelasyon  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 5.** Foliküler sıvı TSH, ft3, ft4, PRL seviyelerinin serum TSH, ft3, ft4, PRL seviyeleriyle korelasyonu

|                  | Serum TSH     | Serum ft3     | Serum ft4     | Serum PRL | Ff TSH        | Ff ft3 | Ff ft4         | Ff PRL        |
|------------------|---------------|---------------|---------------|-----------|---------------|--------|----------------|---------------|
| <b>Serum TSH</b> |               |               |               |           |               |        |                |               |
| Pearson cor.     | 1             | -,156         | -,072         | -,047     | <b>,963**</b> | -,159  | <b>-,409**</b> | ,094          |
| Sig. (2-yönlü)   |               |               |               |           |               |        |                |               |
| N                |               | ,226          | ,577          | ,716      | <b>,000</b>   | ,218   | <b>,001</b>    | ,469          |
|                  | 62            | 62            | 62            | 62        | <b>62</b>     | 62     | <b>62</b>      | 62            |
| <b>Serum ft3</b> |               |               |               |           |               |        |                |               |
| Pearson cor.     | -,156         | 1             | <b>,721**</b> | -,032     | -,184         | ,025   | -,089          | ,054          |
| Sig. (2-yönlü)   |               |               |               |           |               |        |                |               |
| N                | ,226          |               | <b>,000</b>   | ,803      | ,152          | ,846   | ,492           | ,679          |
|                  | 62            | 62            | <b>62</b>     | 62        | 62            | 62     | 62             | 62            |
| <b>Serum ft4</b> |               |               |               |           |               |        |                |               |
| Pearson cor.     | -,072         | <b>,721**</b> | 1             | -,131     | -,069         | -,050  | -,119          | ,189          |
| Sig. (2-yönlü)   |               |               |               |           |               |        |                |               |
| N                | ,577          | <b>,000</b>   |               | ,311      | ,592          | ,701   | ,359           | ,140          |
|                  | 62            | <b>62</b>     | 62            | 62        | 62            | 62     | 62             | 62            |
| <b>Serum PRL</b> |               |               |               |           |               |        |                |               |
| Pearson cor.     | -,047         | -,032         | -,131         | 1         | -,095         | ,076   | ,046           | <b>,469**</b> |
| Sig. (2-yönlü)   |               |               |               |           |               |        |                |               |
| N                | ,716          | ,803          | ,311          |           | ,461          | ,559   | ,720           | <b>,000</b>   |
|                  | 62            | 62            | 62            | 62        | 62            | 62     | 62             | <b>62</b>     |
| <b>Ff TSH</b>    |               |               |               |           |               |        |                |               |
| Pearson cor.     | <b>,963**</b> | -,184         | -,069         | -,095     | 1             | -,167  | <b>-,440**</b> | ,057          |
| Sig. (2-yönlü)   |               |               |               |           |               |        |                |               |
| N                | <b>,000</b>   | ,152          | ,592          | ,461      |               | ,196   | <b>,000</b>    | ,661          |
|                  | <b>62</b>     | 62            | 62            | 62        | 62            | 62     | <b>62</b>      | 62            |

**Çizelge 5 Devamı**

|                |                |       |       |               |                |       |       |       |
|----------------|----------------|-------|-------|---------------|----------------|-------|-------|-------|
| <b>Ff ft3</b>  |                |       |       |               |                |       |       |       |
| Pearson cor.   | -,159          | ,025  | -,050 | ,076          | -,167          | 1     | ,164  | -,003 |
| Sig. (2-yönlü) |                |       |       |               |                |       |       |       |
| N              | ,218           | ,846  | ,701  | ,559          | ,196           |       | ,202  | ,983  |
|                | 62             | 62    | 62    | 62            | 62             | 62    | 62    | 62    |
| <b>Ff ft4</b>  |                |       |       |               |                |       |       |       |
| Pearson cor.   | <b>-,409**</b> | -,089 | -,119 | ,046          | <b>-,440**</b> | ,164  | 1     | -,050 |
| Sig. (2-yönlü) | <b>,001</b>    | ,492  | ,359  | ,720          | <b>,000</b>    | ,202  |       | ,700  |
| N              | <b>62</b>      | 62    | 62    | 62            | <b>62</b>      | 62    | 62    | 62    |
| <b>Ff PRL</b>  |                |       |       |               |                |       |       |       |
| Pearson cor.   | ,094           | ,054  | ,189  | <b>,469**</b> | ,057           | -,003 | -,050 | 1     |
| Sig. (2-yönlü) | ,469           | ,679  | ,140  | <b>,000</b>   | ,661           | ,983  | ,700  |       |
| N              | 62             | 62    | 62    | <b>62</b>     | 62             | 62    | 62    | 62    |

\*\* Korelasyon 0.01 seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 6.** Foliküler sıvı TSH < 2.5 mIU/L ve TSH ≥ 2.5 mIU/L olan hastaların *in vitro* fertilizasyon parametrelerinin karşılaştırılması

|                                | <b>TSH&lt;2.5 mIU/L</b><br>(N=34) | <b>TSH≥2,5 mIU/L</b><br>(N=28) | <b>P değeri</b> |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Oosit sayısı                   | 10.24 ±6.7                        | 14.07±10.03                    | 0.144           |
| Olgun oosit sayısı             | 7.65±5.75                         | 10.82±8.26                     | 0.127           |
| Transfer edilen embriyo sayısı | 2.47±1.24                         | 2.93±0.85                      | 0.177           |
| Grade 1 embriyo sayısı         | 1.29±1.219                        | 1.61±0.916                     | 0.203           |
| Grade 2 embriyo sayısı         | 0.88±1.038                        | 0.86±0.848                     | 0.850           |
| Grade 3 embriyo sayısı         | 0.29±0.676                        | 0.39±0.875                     | 0.677           |
| FF malondialdehit              | 0.918±0.624                       | 0.884±0.512                    | 0.870           |
| FF NO*                         | 38.47±14.75                       | 37.14±13.99                    | 0.723           |
| FF GSH                         | 0.0066±0.0039                     | 0.0069±0.005                   | 0.977           |
| FF PRL                         | 42.66±17.50                       | 53.1±24.03                     | 0.101           |
| Fertilizasyon oranı            | 71.08 ±30.68                      | 81.08±16.4                     | 0.459           |

p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.



**Çizelge 7.** Foliküler sıvıdaki NO<sup>+</sup> seviyelerinin ve *in vitro* fertilizasyon parametrelerinin korelasyonu

|                          | <b>Ff NO<sup>+</sup></b> | <b>Oosit sayısı</b> | <b>Olgun oosit sayısı</b> | <b>Döllenmiş Oosit sayısı</b> | <b>Grade 1 embriyo sayısı</b> | <b>Grade 2 embriyo sayısı</b> | <b>Grade 3 embriyo sayısı</b> | <b>Fertilizasyon Oranı</b> |
|--------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| <b>Ff NO<sup>+</sup></b> |                          |                     |                           |                               |                               |                               |                               |                            |
| Pear.                    |                          |                     |                           |                               |                               |                               |                               |                            |
| Cor.                     | 1                        | ,002                | -,063                     | -,069                         | -,206                         | ,049                          | ,139                          | -,147                      |
| Sig.                     |                          | ,988                | ,624                      | ,595                          | ,108                          | ,703                          | ,282                          | ,255                       |
| N                        | 62                       | 62                  | 62                        | 62                            | 62                            | 62                            | 62                            | 62                         |

Korelasyon  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 8.** Foliküler sıvıdaki MDA seviyelerinin *in vitro* fertilizasyon parametreleri ile karşılaştırılması

|                     | <b>Ff MDA</b> | <b>Grade 1 embriyo sayısı</b> | <b>Grade 2 embriyo sayısı</b> | <b>Grade 3 embriyo sayısı</b> | <b>Oosit sayısı</b> | <b>Olgun oosit sayısı</b> | <b>Fertilizasyon oranı</b> |
|---------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|
| <b>Ff MDA</b>       |               |                               |                               |                               |                     |                           |                            |
| Pearson correlation |               |                               |                               |                               |                     |                           |                            |
| Sig.                | 1             | ,235                          | -,099                         | ,003                          | -,039               | -,092                     | ,210                       |
| N                   | 62            | 62                            | 62                            | 62                            | 62                  | 62                        | 62                         |

Korelasyon  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 9.** Foliküler sıvıdaki serbest T3 seviyelerinin *in vitro* fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu

|               | Ff ft3 | Oosit sayısı | Olgun oosit sayısı | Grade1 embriyo sayısı | Grade 2 embriyo sayısı | Grade 3 embriyo sayısı | Fertilizasyon oranı |
|---------------|--------|--------------|--------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| <b>Ff ft3</b> |        |              |                    |                       |                        |                        |                     |
| Pearson cor.  | 1      | -,158        | -, 150             | -, 234                | ,040                   | -,024                  | -, 220              |
| Sig.          |        | ,219         | ,219               | ,067                  | ,756                   | ,851                   | ,086                |
| N             | 62     | 62           | 62                 | 62                    | 62                     | 62                     | 62                  |

Korelasyon  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 10.** Foliküler sıvıdaki prolaktin seviyelerinin *in vitro* fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu

|               | Ff PRL | Oosit sayısı  | Olgun oosit sayısı | Grade 1 embriyo sayısı | Grade 2 embriyo sayısı | Grade 3 embriyo sayısı | Fertilizasyon oranı |
|---------------|--------|---------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| <b>Ff PRL</b> |        |               |                    |                        |                        |                        |                     |
| Pearson cor.  | 1      | <b>,390**</b> | <b>,394**</b>      | ,208                   | -, 149                 | ,211                   | ,074                |
| Sig.          |        | <b>,002</b>   | <b>,002</b>        | ,105                   | ,249                   | ,100                   | ,568                |
| N             | 62     | <b>62</b>     | <b>62</b>          | 62                     | 62                     | 62                     | 62                  |

\*Korelasyon  $p < 0.01$  seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 11.** Foliküler sıvıdaki TSH seviyelerinin *in vitro* fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu

|               | Ff TSH | Oosit sayısı | Olgun oosit sayısı | Grade 1 embriyo sayısı | Grade 2 embriyo sayısı | Grade 3 embriyo sayısı | Fertilizasyon oranı |
|---------------|--------|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| <b>Ff TSH</b> |        |              |                    |                        |                        |                        |                     |
| Pearson cor.  | 1      | ,177         | ,164               | ,063                   | -,021                  | -,076                  | ,065                |
| Sig.          |        | ,170         | ,202               | ,625                   | ,874                   | ,559                   | ,616                |
| N             | 62     | 62           | 62                 | 62                     | 62                     | 62                     | 62                  |

Korelasyon  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlıdır.

**Çizelge 12.** Foliküler sıvıdaki GSH seviyelerinin *in vitro* fertilizasyon parametreleri ile korelasyonu

|               | Ff GSH | Oosit sayısı | Olgun oosit sayısı | Grade 1 embriyo sayısı | Grade 2 embriyo sayısı | Grade 3 embriyo sayısı | Fertilizasyon oranı |
|---------------|--------|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| <b>Ff GSH</b> |        |              |                    |                        |                        |                        |                     |
| Pearson cor.  |        | ,042         | ,022               | ,111                   | -,032                  | -,072                  | -,063               |
| Sig.          |        | ,748         | ,863               | ,392                   | ,805                   | ,578                   | ,624                |
| N             | 62     | 62           | 62                 | 62                     | 62                     | 62                     | 62                  |

Korelasyon  $p < 0.05$  seviyesinde anlamlıdır.

## 6. TARTIŞMA

*In vitro* fertilizasyon uygulamalarında oositin kalitesinin kapsamlı şekilde değerlendirilmesi zamanla önem kazanmaktadır. Oosit seçiminde bugüne kadar kullanılan yöntemler morfoloji kriterleriyle sınırlı kaldığından ve tatmin edecek derecede olmadığından, oosit kalitesini değerlendirmede yeni yöntemler bulma yoluna gidilmektedir.

Bazı araştırmacılar; granüloza hücreleri ve oositlerde gen ekspresyonu çalışmaları yapmışlar ve oosit kalitesini belirlemede yardımcı olabilecek bir takım spesifik moleküler belirteçler bulma yoluna gitmişlerdir. Bu tekniklerin çoğu zor tekniklerdir ve insan oositleri üzerinde çalışmalar yapmak beraberinde birçok etik problem getirmektedir. Bu yüzden; klinik pratiğe uygulanabilirlikleri imkansız görünmektedir. Foliküler sıvı, hem kan foliküler bariyerinden geçen plazma içeriği hem de granüloza ve teka hücrelerinin sekretuar aktivitelerinin bir ürünüdür (Fortune JE., 1994). Bu nedenle; foliküler sıvının biyokimyasal özelliklerinin oosit kalitesini ve bunu takip eden döllenme ve embriyo gelişimini belirlemede kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Foliküler sıvı, *in vitro* fertilizasyon uygulamalarından oosit toplama işlemi sırasında oositle birlikte aspire edildiğinden kolaylıkla elde edilebilir. Bu nedenle; biyokimyasal incelemeler için oldukça uygun bir örnektir. Oosit metabolizmasının tüm biyokimyasal belirteçlerini içerdiği düşünülerek, foliküler sıvı üzerinde bir çok parametre incelenmiştir. Bu parametreler; hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler, reaktif oksijen türleri, proteinler, aminoasitler ve şekerler gibi biyokimyasal belirteçlerdir (Revelli ve ark., 2009).

Gonadotropinler, foliküler sıvıda çalışılmış başlıca hormonlardır. FSH, hCG ve LH'nın yüksek konsantrasyonlarının oosit olgunlaşmasını başlattığı ve döllenme olasılığı daha yüksek oosit gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Revelli ve ark., 2009). TSH, tiroid hormonları ve prolaktin seviyeleri infertil kadınların izleminde rutin olarak uygulanmaktadır. TSH'nın gonadotropik bir hormon gibi çalışabileceği hipotezini doğrulayan bir çalışmada; TSH'nın, *in vitro* ortamda sıçan granüloza hücrelerinde progesteron üretimini uyardığı gözlenmiştir (Grasso Sr. P. ve Crisp TM., 1985). Eğer TSH'nın *in vivo* ortamda granüloza hücrelerini ya da oosit kümülüs kompleksini etkileme

fonksiyonu varsa, foliküler sıvı içinde de bulunması gerektiği düşünülmüştür. TSH'nin insan foliküler sıvısında bulunduğu, serum ve foliküler sıvı seviyelerinin pozitif şekilde korelasyon gösterdiği gösterilmiştir (De Silva ve ark., 1991). Bizim çalışmamızın sonuçları da; De Silva ve ark.'larının çalışmasıyla doğru orantılı sonuçlar vermiştir. Çalışmamızdaki hasta grubunda, serum TSH seviyeleri foliküler sıvıdaki TSH seviyeleri arasında güçlü pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (Çizelge 5).

Tedavi öncesi TSH seviyeleri ve IVF sikluslarının sonuçları arasındaki ilişkiyle alakalı az sayıda çalışma bildirilmiştir. Cramer ve ark., fertilizasyon bozukluğu görülen oosit üretimi gözlenen kadınlarda TSH seviyelerinin anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu bulmuştur (Cramer ve ark., 2003). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre; TSH seviyeleriyle, döllenmiş oosit sayısı ve fertilizasyon oranı arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır (Çizelge 11). Yine küçük çaplı bir çalışmada, *in vitro* fertilizasyon uygulaması sonrası klinik gebelik görülen kadınlarda gebe kalamayanlara oranla daha yüksek TSH seviyelerine rastlanmıştır (Zollner ve ark., 2001). Bizim sonuçlarımıza göre; gebe kalan hastalarla, gebe kalamayanlar arasında TSH ve sT4 seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemişken; sT3 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Bu hastalar, embriyo kalitesi açısından karşılaştırıldığında da; grade 1 ve grade 2 embriyo sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır (Çizelge 2). Embriyo kalitelerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen veriler beklenilenle uyumluluk göstermektedir; çünkü, embriyo kalitesi klinik gebelikle doğrusal bir ilişki gösterir.

Son zamanlarda yapılan bazı popülasyon bazlı anket çalışmaları, TSH seviyelerinde daha dar bir aralık tanımlanmıştır. Bu aralık, 0.3 ile 2.5 mIU/L'dir (Brabant G., 2009). Hasta grubumuzda; bu üst referans değerini sınır değer kabul ederek oluşturduğumuz iki grup arasında yaptığımız karşılaştırmalı analizde, iki grubun döllenme oranları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Çizelge 6).

Bizim çalışmamızda, incelediğimiz infertil hasta grubunda, beklenen şekilde, foliküler sıvıdaki TSH değerleri ile sT3 ve sT4 değerleri arasında anlamlı negatif bir korelasyon görülmüştür. Bu negatif korelasyon; bu hormonların birbirleri üzerindeki negatif geri-besleme etkilerinden kaynaklanmaktadır.

Sıçanlarda yapılmış bazı immünohistokimyasal çalışmalar, foliküler sıvı içerisindeki prolaktinin, hem foliküler hücreler hem de olgunlaşan oositler üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir (McNatty ve ark., 1974). *In vitro* ortamda, kültür ortamına eklenen prolaktinin, oositlerin inseminasyon sonrası morula ve blastokist aşamalarına kadar ilerleme oranlarını arttırdığı gözlenmiştir (Yoshimura ve ark., 1989). Foliküler sıvı prolaktin seviyelerinin incelendiği bir çalışmanın sonuçlarına göre, prolaktinin oosit olgunlaşma sürecindeki sitoplazmik modifikasyonlara pozitif etki ettiği düşünülmüştür (Lindner ve ark., 1988). Bizim hasta grubumuzda foliküler sıvıdaki prolaktin seviyeleri, toplam oosit sayısı ve olgun oosit sayısı ile güçlü pozitif bir korelasyon göstermişken; embriyo gelişimi (embriyo kalitesi) ile korelasyon göstermemiştir (Çizelge 10). Prolaktin seviyeleri günümüzde hala çok uygun bir oosit kalitesi belirteci olarak kabul edilmemektedir; çünkü, prolaktin seviyelerinin fertilizasyon ve gebelikle ilişkisinin anlamlı bulunduğu bazı çalışmalar diğerlerince doğrulanmamıştır (Lee ve ark., 1987; Messinis IE ve Templeton AA, 1987; Reinhaller ve ark., 1987).

Bizim çalışmamızda, gebe kalan hastalarla, gebe kalamayan hastaların foliküler sıvıdaki prolaktin seviyeleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (Çizelge 2). Prolaktin seviyelerinin oosit sayısı ve olgun oosit sayısı ile güçlü pozitif bir korelasyon göstermiş olması dikkate alınarak E2 ile ilişkisine bakıldığında, foliküler sıvı prolaktinin aynı çevredeki E2 seviyeleriyle de pozitif korelasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır. İyi embriyo kalitesi, gebelik sonucuna etki eden en önemli parametrelerden biridir. Gebe kalan kadınlarda prolaktin seviyelerinin daha yüksek çıkması fakat prolaktin seviyelerinin embriyo kalitesi ile ilişkili çıkmaması, prolaktinin embriyo kalitesinden çok implantasyon üzerinde etki ediyor olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra; tüm hasta grubunda foliküler sıvı prolaktin seviyeleri ve malondialdehit seviyeleri arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır (Çizelge 3).

Oksidatif stres parametreleri üzerindeki hormonal etkiler birçok laboratuvarın araştırma konusu olmuştur. Bu çalışmalarda, metabolizma hızı üzerindeki önemli etkileri olan tiroid hormonları başlıca hormonal parametreler olarak incelenmiştir. Tiroid hormonlarının ROS ve RNS üretimi üzerindeki etkileriyle ilgili literatür her ne kadar az da olsa; hipertiroidik hallerde radikal üretiminin arttığına dair güçlü kanıtlar vardır. Yapılmış çalışmaların birçoğunda, farklı dokuların (kan, kalp, karaciğer, beyin) hipertiroidik ve hipertiroidik hallerindeki başlıca lipid peroksidasyonu olmak üzere birçok oksidatif stres

parametresi çalışılmıştır. Lipid kompozisyonunun bozulmuş tiroid durumlarının belirgin bir özelliği olduğu görülmüştür (Hoch F.L., 1988). Farklı sonuçlar elde edilmiş birkaç rapor haricinde eldeki tüm veriler, tiroid hormonlarının hedef dokulardaki oksidatif stresi indüklediği yönündedir (Venditti P. ve Di Meo S., 2006). Gredilla ve ark. tarafından yapılan bir çalışmanın sensitivite sonuçları, hipertiroidik hayvanların lipid peroksidasyonuna daha yatkın olduklarını göstermiş ve redükte glutatyonun tiroid fonksiyonunun bir fonksiyonu olarak değişmediğini göstermiştir (Gredilla ve ark., 2000). Bunun ardından gelen bazı çalışmalar da, tiroid hormonunun sıçan hipotalamusunda NOS geni ekspresyonunu arttırdığını ve insan vasküler endoteli ve sıçan fagositik hücrelerinde NO· üretimini arttırdığını bildirmiştir (Venditti P. ve Di Meo S., 2006).

Bizim çalışmamızda, foliküler sıvıdaki TSH, sT3 ve sT4 hormonları ve oksidatif stres belirteçleri olan nitrik oksit, malondialdehit ve redükte glutatyon arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Yalnızca; foliküler sıvıdaki prolaktin seviyelerinin foliküler sıvı malondialdehit seviyeleriyle anlamlı bir korelasyona sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4). Bu sonuç; gebe kalanlarda kalamayanlara oranla foliküler sıvı prolaktin ve malondialdehit seviyelerinin anlamlı olarak daha yüksek çıkmasıyla uyumluluk göstermektedir (Çizelge 2).

Foliküler sıvının serbest radikal ve antioksidan içeriği son yıllarda önem kazanmış bir konudur. Agarwal ve ark., 2004'te, oksidatif stresin hem doğal hem de yardımcı üreme üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir. Oksidatif stres parametrelerinin kadın üreme kanallarının çeşitli bölgelerinde bulunduğu anlaşılmaması çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda rol oynadığını düşündürmüştür. Bir çok çalışmada, ROS'un infertiliteye neden olan çeşitli faktörlerdeki etkileri çalışılmış; özellikle de, açıklanamayan infertilitenin patofizyolojisinde oksidatif stresin rol oynayabileceği düşünülmüştür (Agarwal ve ark., 2005). Ovülasyonda, granüloza hücrelerinin yoğun metabolizmasının folikül duvarındaki çok sayıda makrofaj ve nötrofil granülositleriyle beraber, aktif bir serbest radikal üretim bölgesi olduğu düşünülmektedir (Jozwik ve ark., 1999).

Jozwick ve ark., serumdaki ve preovulatar foliküler sıvı oksidatif stres belirteçlerinin miktarlarını karşılaştıran çalışmalarında, foliküler sıvıda daha düşük seviyelerde buldukları sonucuna varmışlardır. Serumda yapılan oksidatif hasar çalışmalarındaki oksidatif stres belirteçleri ile kıyaslandığında, bizim çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz foliküler sıvı MDA, NO ve GSH konsantrasyonları ortalamalarının Jozwick ve ark.'nın sonuçlarıyla korele şekilde daha düşük çıktığı görülmüştür (Çizelge 1).

Serbest radikallerin hücre bütünlüğü üzerindeki zararlı etkileri düşünüldüğünde, IVF sonuçları ve peroksidasyon ürünleri arasında negatif bir korelasyon beklenmiştir; fakat, bu konuyla ilgili yapılmış çalışmaların bir çoğu, birbiriyile uyumlu olmayan sonuçlar vermiştir. Appasamy ve ark. tarafından 2008'de yapılan bir çalışmada, foliküler sıvıdaki ROS seviyelerinin IVF yapılan hastalardaki gebelik oranıyla pozitif bir korelasyonu olduğunu bulmuştur. Bu gözlem, sınırlı miktarda oksidatif stresin embriyo gelişimi için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Pasqualotto ve ark.'nın 2004'te yapmış olduğu çalışmanın sonuçları da Appasamy ve ark.'nın sonuçlarıyla aynı yönde çıkmıştır; gebe kalan kadınlarda gebe kalamayanlara oranla daha yüksek LPO seviyelerine rastlanmıştır. Bu sonuçların aksine; Oral ve ark., foliküler sıvı MDA seviyeleri ve fertilizasyon oranları arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır (Oral ve ark., 2006). Jozwick ve ark. da, IVF sonuçları ve farklı oksidatif stres konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişkiye rastlamamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, farklı TBARS konsantrasyonlarının oositlerin üreme potansiyelleri üzerinde etkisi olmadığı sonucuna varmıştır. S. Das ve ark. tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçları, foliküler sıvıdaki ROS ve LPO seviyeleri ile embriyo kalitesi arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, gebe kalan hastalarla kalamayanlar arasında, foliküler sıvı MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. Gebe kalan hastaların foliküler sıvıdaki MDA seviyeleri diğerlerine oranla anlamlı olarak yüksek çıkmıştır; (Çizelge 2) fakat, tek başına MDA'nın embriyo kalitesiyle arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır (Çizelge 8). Bulgularımız; 2004'te Pasqualotto ve ark. tarafından yapılan bir çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Bu çalışmadaki hasta grubunda, gebe kalan kadınlarda daha yüksek lipid peroksidasyonu (LPO) ve TAC seviyeleri ile karşılaşmıştır ama LPO seviyeleri embriyo kalitesini tahmin etmeye yaramamıştır. Gebelik oranları ile lipid peroksidasyonu seviyeleri pozitif korelasyon göstermiştir (Agarwal ve ark., 2005).



Granüloza hücreleri NO<sup>•</sup> sentazın endotelial izoformuna sahiptir ve aktif şekilde NO<sup>•</sup> sentezler (Lee ve ark., 2000). Son yıllarda; NO<sup>•</sup>'nun foliküler mikroçevredeki rolünü anlamak amaçlı birçok çalışma yapılmıştır. NO<sup>•</sup> serbest radikali, gonadotropin stimülasyonu sonrası foliküler sıvıda tespit edilmiştir; fakat, NO<sup>•</sup> stabil olmayan bir gaz olduğundan, NO<sup>•</sup> konsantrasyonu göstergesi olarak nitrit/nitrat konsantrasyonu ölçülmektedir. Lee ve ark.; olgun oosit elde edilen foliküler sıvıdaki nitrit/nitrat konsantrasyonunun anlamlı şekilde daha düşük olduğunu ve yüksek foliküler sıvı nitrit/nitrat konsantrasyonlarının etki ettiği embriyolarda daha fazla fragmentasyon ve daha düşük implantasyon oranlarının gözleendiği sonucuna varmıştır. Bu sonuçlarla pozitif olarak ilişkili şekilde; Barrionuevo ve ark., oluşturdukları IVF modelinde, foliküler sıvı NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> seviyelerinin olgun oositlerin fertilizasyon potansiyeli ile güçlü bir ters ilişkisi olduğunu göstermiştir.

Bu veriler ışığında; yüksek foliküler sıvı konsantrasyonlarında, NO<sup>•</sup>'nun oosit ve embriyo sonuçlarını tahmin etmede yararlı bir prediktör olabileceği düşünülmüştür. Elde edilmiş olan bu veriler; oositi çevreleyen mikroçevrede aşırı NO<sup>•</sup> üretiminin, folikül içinde fertilizasyon öncesi apoptozu uyurabileceğini ve böylece, oosit gelişimini etkilediğini önermektedir. Bunun aksi şekilde; intrafoliküler seviyelerin IVF sonuçlarıyla korelasyon göstermediği gözleendiğinden, NO<sup>•</sup> değerlendirmesi şaşırtıcı olabilir (Manau et al, 2000).

Bizim çalışmamızda, gebe kalan hastalarla gebe kalamayan hastalar karşılaştırıldığında, gebe kalamayan hastalarda anlamlı şekilde NO<sup>•</sup> seviyelerinin yüksek çıktığı gözlenmiştir (Çizelge 2). Bu sonuç; NO<sup>•</sup>'nun yüksek konsantrasyonlarının gebelik sonucu üzerinde negatif bir etkisi olabileceği varsayımıyla uyumludur; fakat, NO<sup>•</sup> seviyelerinin, oosit sayısı, olgun oosit sayısı, dölleme oranları ve embriyo kaliteleri ile ilişkileri ayrı ayrı incelendiğinde, bu parametrelerin hiçbirisiyle arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Çizelge 7). Dolayısıyla; NO<sup>•</sup>'nun gebelik üzerine yaptığı etkinin oosit ya da embriyo kanalıyla değil, implantasyondaki diğer parametreler aracılığıyla olabileceği akla gelmektedir.

Foliküler sıvının ROS seviyesini dengede tutmak için, oosit ve embriyoyu korumak için serbest-radikal yakalayıcıları içerdiği gösterilmiştir (Joswik ve ark., 1999; Pasqualotto ve ark., 2004). GSH, dokulardaki prooksidan-antioksidan dengesini sağlamada en önemli endojen antioksidan olarak görev yapmaktadır. Hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, oositteki GSH konsantrasyonlarının sperm çekirdek dekonansasyonu sırasında disülfid bağlarını azaltmada ve PN oluşumu, dekapasitasyon, zigotik sentrozom oluşumu ve pronukleus yerleşiminde önemli olduğunu göstermiştir. Oositlerin *in vitro* olgunlaşması sırasında ortama eklenen GSH'ın normal fertilizasyon ve embriyo gelişimini geliştirdiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra da; *in vitro* fertilizasyon işlemlerinde kullanılan oosit ve embriyo kültür ortamlarındaki GSH ve GSH-oluşturan blokların fertilizasyon oranlarını ve embriyo gelişimini arttırdığı gözlenmiştir (Ebisch ve ark., 2006).

Oyawoye ve ark., 2003'te yaptıkları bir çalışmada, TAC seviyesi azaldıkça fertilizasyon potansiyelinin de azaldığını görmüşlerdir. Ardından; başarılı şekilde döllenmiş oositlerin foliküler sıvılarında TAC seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu yüzden; düşük total antioksidan kapasitesinin düşük fertilizasyon potansiyelinin bir belirteci olduğu düşünülmektedir (Oyawoye et al., 2003).

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre; foliküler sıvıdaki GSH seviyeleri ile döllenme oranı ve embriyo kaliteleri arasında anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır (Çizelge 12). Gebe kalan kadınlarla kalamayanlardaki GSH seviyeleri karşılaştırıldığında da; iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 2).

## 7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırmamızın sonunda; tedavi sonrası gebe kalan kadınların folikül sıvılarındaki NO, MDA, sT3 ve prolaktin seviyeleri gebe kalamayan kadınların folikül sıvılarında bulunanlardan istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Fakat başlı başına prolaktin dışındaki diğer değişkenlerin oosit kalitesi ve embriyo kalitesi ile anlamlı bir ilişkisi olmadığı görülmüştür. Sadece prolaktinin elde edilen toplam oosit sayısı ve olgun oosit sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum, ovülasyon indüksiyonu sırasında kullanılan gonadotropinlerin etkisiyle prolaktin artışı arasındaki ilişkiye bağlı olabilir.

İnfertilite tedavisinde kullanılan farklı ilaçlar ve farklı protokoller vardır. Kullanılan farklı ilaçların araştırmamızda ölçtüğümüz parametreler üzerinde farklı etkileri olabilir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, bir sonraki aşamada, aynı parametrelerin farklı protokollerdeki ilişkisi karşılaştırılabilir.

Gebelik sonucu değerlendirilirken sperm faktörü dikkate alınmamış; sonuçlar doğrudan embriyo kalitesi ve gebelik üzerinden değerlendirilmiştir.

Literatüre bakıldığında; hormonal parametreler ve oksidatif hasar parametreleri çoğunlukla hasta serumunda çalışılmıştır; folikül sıvısında yapılan ve bu parametrelerin hepsinin aynı anda bakılıp analiz edildiği başka bir çalışma bulunamamıştır. Kullanılan örnek türü ve parametre sayısının çalışmamıza orijinallik kattığını düşünmekteyiz. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen verilerin, daha fazla örnekle yapılacak daha kapsamlı çalışmalara zemin oluşturacağına inanmaktayız.

## KAYNAKLAR

- Agarwal A., Gupta S., K Sharma R. Role of Oxidative stress in female reproduction. Review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005;3:28.
- Agarwal A., Gupta S., K Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility- a clinician's perspective. Review. *Reproductive Biomedicine Online* 2005; Vol. 11, No. 5: 641-650.
- Andersen S., Pedersen KM., Bruun NH., Laurberg P. Narrow individual variations in serum T4 ve T3 in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1068-72.
- Biondi B., Cooper D. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocr Rev* 2008; 29: 76-131.
- Bjoro T., Holmen J., Kruger O. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trondelag (HUNT). *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 639-647.
- Brabant G. New normal ranges for TSH: when to treat? *Dtsch Med Wochenschr* 2009; 134(49): 2510-3.
- Canaris GJ., Manowitz NR., Mayor G., Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 526-534.
- Cecconi S., Rucci N., Scaldaferrì M.L., Masciulli M.P., Rossi G., Moretti C., D'armiento M., Ulisse S. Thyroid Hormone Effects on Mouse Oocyte Maturation and Granulosa Cell Aromatase Activity. *Endocrinology* 1999; 140(4):1783-1788.
- Cramer DW., Sluss PM., Powers RD. Serum prolactin and TSH in an *in vitro* fertilization population: is there a link between fertilization and thyroid function? *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:210-215.
- Çıkım G., Ozan G. Gülcü F., Baykan D., Gürsu M.F. Toksik Multinodüler Guatrılı Olgularda Homosistein Düzeyi ve Lipid Peroksidasyonu. *Firat Tıp Dergisi* 2004; 9(4):116-119.
- Das S., Chattopadhyay R., Ghosh S., Ghosh S., Goswami S.K., Chakravarty B.N., Chaudhury K. Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF? *Human Reproduction* 2006; 21(9):2403-2407.
- DeCherney AH, Tarlatzis BC, Laufer N. Follicular development: lessons learned from human *in vitro* fertilization. *Am J Obstet Gynecol*. 1985 Dec 15;153(8):911-23.
- De Silva M, Pearl A.W., Butler W.J. Thyroid Stimulating Hormone Causes Cumulus Expansion in Mouse Oocytes. *Theriogenology* 1994; 41: 899-905.
- Duckitt K. Infertility and subfertility. *Clinical Evidence*. 2003; 11: 2427-2458.
- Ebisch I.M.W., Peters W.H.M., Thomas C.M.G., Wetzels A.M.M., Peer P.G.M., Steegers-Theunissen R.P.M. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Human Reproduction* 2006; 21(7):1725-1733.
- El Moutassim S., Guerin P., Menezo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction* 1999; 5:720-725.
- Fatourechi V., Klee GG., Grebe SK., Bahn RS., Brennan MD., Hay ID. Effects of reducing the upper limit of normal TSH values. *JAMA* 2003; 290: 3195-6.

- Fatourechí V. Upper limit of a normal serum thyroid-stimulating hormone: a moving and now an aging target? *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4560-2.
- Fernández V., Tapia G., Varela P., Romanque P., Cartier-Ugarte D., Videla L.A. Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans: A comparative view and relation to redox regulation of gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 2006 (142):231-239.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994; 50:225-232.
- Gardiner C.S., Salmen J.J., Brandt C.J., Stover S.K. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biology of Reproduction* 1998; 59:431-436.
- Goichot B., Sapin R., Schlienger JL. Subclinical Hyperthyroidism: Considerations in Defining the Lower Limit of the Thyrotropin Reference Interval. *Clinical Chemistry* 2009; 55(3): 420-424.
- Goldman S., Dirnfeld M., Abramovici H., Kraiem Z. Triiodothyronine (T3) modulates Hcg-regulated progesterone secretion, cAMP accumulation and DNA content human luteinized granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 96: 125-131.
- Grasso Sr P., Crisp TM. *In vitro* responses of luteinizing rat granulosa cells to human thyroid stimulating hormone. *Biol Reprod* 1985; 32: 935-945.
- Greenwald GS., Roy SK. Follicular development and its control. In: *Knobil E, Neill JD(eds). The Physiology of Reproduction. Raven Pres, New York, 1994; pp629-724.*
- Hoch F.L. Lipids and thyroid hormones. *Progress in Lipid Research* 1988;27:199- 270.
- Hollowell JG., Staehling NW., Flanders WD. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey ( NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 489-499.
- Hoover L., Baker A., Check JH., Lurie D., O'Shaughnessy A. Evaluation of a new embryo grading system to predict pregnancy rates following *in vitro* fertilization. *Gynecol and Obstet Invest* 1995; 40(3):151-7.
- Ignarro L.J. Nitric oxide: biology and pathobiology, Academic Press, San Diego.
- Ignarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M., Rogers N.E., Byrns R.E. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 September 1; 90(17): 8103–8107.
- Jozwik M., Wolczynski S., Jozwik M., Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 1999;5:409-13.
- Kaya H., Sezik M., Ozkaya O., Dittrich R., Siebzehrubl E., Wildt L. Lipid Peroxidation at Various Estradiol Concentrations in Human Circulation during Ovarian Stimulation with Exogenous Gonadotropins. *Horm Metab Res* 2004; 36:693-695.
- Koutras DA. Disturbances of menstruation in thyroid disease. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 816:280-284.
- Krassas GE. Thyroid disease and female reproduction. *Fertil Steril* 2000; 74:1063-70.
- Krassas GE., Pontikides N., Kaltsas T. Disturbances of menstruation in hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 50:655-659.
- Krinsky N.I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1992; 200:248-254.

- Lee MS., Ben-Rafael Z., Meloni F., Mastroianni L. Jr., Flickinger GL. Relationship of human oocyte maturity, fertilization and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1987, 4(3): 168-172.
- Lee KS., Joo BS., Na JY., Yoon MS., Choi OH., Kim WW. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:222-228.
- Lincoln SR., Ke RW., Kutteh WH. Screening for hypothyroidism in infertile women. *J Reprod Med* 1999; 44: 455-457.
- Lindner C., Lichtenberg V., Westhof G., Braendle W., Bettendorf G. Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm Metab Res* 1988;20:243-246.
- Manau D., Balasch J., Jimenez W., Fabregues F., Civico S., Casamitjana R., Creus M., Vanrell JA. Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response. *Hum Reprod* 2000; 15:1295-1299.
- McNatty KP., Sawers RS., McNeilly AS. A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature* 1974;250:653-55.
- Meier C., Christ-Crain M., Guglielmetti M., Huber P., Staub J-J., Müller B. Prolactin Dysregulation in Women with Subclinical Hypothyroidism: Effect of Levothyroxine Replacement Therapy. *Thyroid* 2003; 13(10):979-984.
- Messinis IE., Templeton AA. Relationship between intrafollicular levels of prolactin and sex steroids and *in-vitro* fertilization of human oocytes. *Hum Reprod* 1987; 2:607-609.
- Murray Robert K., Rodwell Victor W., Garnner D.K., Mayes P.A. *Harper's Illustrated Biochemistry, 26th edition*, 2003.
- Muttukrishna S., Suharjono H., McGarrigle H., Sathanandan M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004;111:1248-53.
- Nawroth F. Hyperprolactinemia and the regular menstrual cycle in asymptomatic women: should it be treated during therapy for infertility? *Reprod Biomed Online* 2005; 11(5):581-8.
- N. V. BHAGAVAN, *Medical Biochemistry; Fourth Edition*.
- Oral O., Kutlu T., Aksoy E., Fıçıcıoğlu C., Uslu H., Tuğrul S. Short communication. The Effects of Oxidative Stress on Outcomes of Assisted Reproductive Techniques. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2006, Vol. 23, No.2: 81-85.
- Oyawoye O., Abdel Gadir A., Garner A., Constantinovici N., Perrett C., Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003; 18:2270-2274.
- Pasqualotto EB., Agarwal A., Sharma RK., Izzo VM., Pinotti JA., Joshi NJ., Rose BI. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 2004; 81:973-976.
- Poppe K., Glinde D., Van Steirteghem A. Thyroid dysfunction and autoimmunity in infertile women. *Thyroid* 2002; 12: 997-1001.
- Poppe K., Velkeniers B. Female infertility and the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18: 153-165.
- Prabhakar VKB., Davis JRE. Hyperprolactinemia. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2008; 22(2):341-353.

- Raber W., Gessi A., Nowotny P., Vierhapper H. Hyperprolactinemia in hypothyroidism: clinical significance and impact of TSH normalization. *Clinical Endocrinology* 2003; 58:185-191.
- Redmond GP. Thyroid dysfunction and women's reproductive health. *Thyroid* 2004; 14: S5-S15.
- Reinhaller A., Deutinger J., Riss P., Müller-Tyl E., Fischl F., Bieglmayer C., Janisch H. Relationship between the steroid and prolactin concentration in follicular fluid and the maturation and fertilization of human oocytes. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1987; 4:228-231.
- Revelli A., Dele Piane L., Casano S., Molinari E., Massobrio M., Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. Review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009; 7(40):1-13.
- Roche JF. Control and regulation of folliculogenesis. Symposium in perspective. *Rev Reprod* . 1996, 1: 19-27.
- Shalev E., Eliyahu S., Ziv M., Ben-Ami M. Routine thyroid function tests in infertile women: are they necessary? *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1191-2.
- Spencer CA., LoPresti JS., Patel A., Guttler RB., Eigen A., Shen D. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 453-60.
- Surks MI., Goswami G., Daniels GH. The thyrotropin reference range should remain unchanged. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5489-96.
- Surks MI., Hollowell JG. Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the US population: implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4575-82.
- Szkudlinski MW., Fremont V., Ronin C., Weintraub BD. Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Structure-Function Relationships. *Physiol Rev* 2002; 82: 473-502.
- Thomas R., Redi RL. Thyroid disease and reproductive dysfunction: a review. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 70-5.
- Torun A.N., Kulaksizoglu S., Kulaksizoglu M., Pamuk B.O., Isbilen E., Tutuncu N.B. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Clinical Endocrinology* 2009; 70:469-474.
- Vaitukaitus JL., Ross GT., Braunstein GD., Rayford PL. Gonadotrophins and their subunits: basic and clinical studies. *Rec Prog Horm Res* 1976; 32: 289-331.
- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160:1-40.
- Venditti P., Balestrieri M., Di Meo S., De Leo T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defenses, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *Journal of Endocrinology* 1997; 155:151-157.
- Venditti P., Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. Review. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006; 63:414-434.
- Wakim AN., Polizotto SL., Buffo MJ., Marreo MA., Burholt DR. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril* 1993; 59: 1187-1190.
- Wakim AN., Paljug WR., Jasnosz KM., Alhakim N., Brown AB., Burholt DR. Thyroid hormone receptor Messenger ribonucleic acid in human granulosa and ovarian stromal cell. *Fertil Steril* 1994; 62: 531-534.
- Wakim AN., Polizotto SL., Burholt DR. Influence of thyroxine on human granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:274-277.

Wartofsky L., Dickey RA. The evidence for a narrower thyrotropin reference range is compelling. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5483-8.

Yoshimura Y., Hosoi Y., Iritani A., Nakamura Y., Atlas SJ., Wallach EE. Developmental potential of rabbit oocyte matured *in vitro*: the possible contribution of prolactin. *Biol Reprod* 1989;41:26-33.

Zhang S.S., Carrillo A.J., Darling D.S. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*. 1997, Vol. 3, No. 7: pp 555-562.

Zollner U., Lanig K., Steck T., Dietl J. Assessment of endocrine status in patients undergoing *in-vitro* fertilization treatment. Is it necessary? *Arch Gynecol Obstet* 2001; 265:16-20.



## 5. ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgiler

İsim: Ender Yalçınkaya

Doğum yeri ve tarihi: Zonguldak/ 10-02-1981

Uyruğu: T.C.

Medeni durum: Bekar

Kurum: Kocaeli Üniversitesi

İletişim adresi: Yuvam Akarca Konutları B/1-B-6 D:8 Alikahya/Kocaeli

Telefon: 0 533 6370115

### 2. Eğitim

|           |                                                                     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|
| 2008-...  | Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans |
| 1999-2004 | Boğaziçi Üniversitesi<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik-Lisans       |
| 1992-1999 | K.D.Z. Ereğli Anadolu Lisesi<br>Lise                                |

➤ Yabancı dili: İngilizce

### 3. Mesleki Deneyim

- 01/08 - ..... Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Araştırma görevlisi
- 05/06 – 08/07 Özel Umut Tüp Bebek Merkezi  
Klinik embriyolog
- 03/04 – 05/06 Alman Hastanesi  
Klinik embriyolog

#### 4. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

TSRM (Turkish Society of Reproductive Medicine)

Klinik Embriyoloji Derneđi

|               |      |                  |
|---------------|------|------------------|
| YÜKSEK LİSANS | 2010 | ENDER YALÇINKAYA |
|---------------|------|------------------|