

T.C.  
FATİH ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL OLARAK SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN  
FARELERDE SİGARA DUMANININ VE E VİTAMİNİNİN  
ENDOMETRİAL PİNOPOD OLUŞUMU ÜZERİNE  
OLASI ETKİLERİ

Dr. Müzeyyen DURAN ERDOLU

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA  
2011

**T.C.  
FATİH ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL OLARAK SİĞARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN  
FARELERDE SİĞARA DUMANININ VE E VİTAMİNİNİN  
ENDOMETRİAL PİNOPOD OLUŞUMU ÜZERİNE  
OLASI ETKİLERİ**

**Dr. Müzeyyen DURAN ERDOLU**

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof.Dr. Nilgün Turhan**

**ANKARA  
2011**

## TEŞEKKÜR

Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde geçen Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık eğitimim süresince tıbbi bilgi ve deneyimlerimin artması için katkılarını esirgemeyen, mesleki tecrübeleri ve bilgilerini paylaşmanın yanında yakın ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim, hakkını ödeyemeyeceğim, çok değerli hocam Prof. Dr. Nilgün TURHAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Hocam Prof. Dr. Hasan KAFALI' ya eğitimime katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İhtisasım süresince klinik deneyim ve becerilerimi arttırmamda büyük katkıları olan Yrd. Doç. Dr. İlknur GÜMÜŞ'e, Op. Dr. Aydın KÖŞÜŞ'e, Op. Dr. Nermin KÖŞÜŞ'e, Op. Dr. İkbal KAYGUSUZ'a, Yrd. Doç. Dr. Aylin AYRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Aysel UYSAL DERBENT'e, Yrd. Doç. Dr. Candan DUVAN'a, Yrd. Doç. Dr. Yüksel ARIKAN'a, Yrd. Doç. Dr. Esra KESKİN'e, Op. Dr. Deniz HIZLI'ya, Op. Dr. Ayla ESER'e teşekkürlerimi sunarım.

İhtiyacım olduğunda her zaman yanımda olan, başlarını ağrıttığım halde nazımı çeken Doç. Dr. Bülent BERKER'e ve Op. Dr. Bülent ÇAKMAK'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi, kötü her zamanımda desteklerini hep arkamda hissettiğim kardeşlerim, Nurdan HÜSREV'e ve Başak DAŞKIN'a, manevi ablam Aslıhan PEKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dört senelik eğitimimi birlikte geçirmiş olmaktan gurur duyduğum, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım kıdemli Op. Dr. Umut SARI başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Aynı şekilde birlikte çalıştığım tüm hemşire arkadaşlarıma özellikle aramızdan ayrılan Esmâ Hemşire'ye teşekkür ederim.

Sevgileri ve fedakarlıklarıyla beni ben yapan, bu noktaya getiren canımdan kıymetli Anne ve Babama.....

Her zaman bana destek olan kardeşlerim Suzan ve Nazan'a....

Sevgisini ve desteğini her an hissettiğim eşim Burak'a, tüm kalbimle sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Müzeyyen DURAN ERDOLU

## ÖZET

Deneysel olarak sigara dumanına maruz bırakılan farelerde sigara dumanının ve E vitamininin endometrial pinopod oluşumu üzerine olası etkileri.

Erdolu Duran, M. Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2011.

**Amaç:** Endometrial pinopod oluşumu üzerine sigara dumanı ve E vitamininin etkilerini incelemek.

**Materyal ve Metod:** Bu çalışmada, 12-14 haftalık, ortalama ağırlıkları  $25,19 \pm 4,34$  olan 18 dişi, ve çiftleştirme amacıyla 12 erkek swiss-albino fare kullanıldı. Dişi fareler 3 eşit gruba bölündü. Farelere 10 hafta süresince her gün, intraperitoneal (i.p.) serum fizyolojik (Grup 1), sigara makinesi ile 20 adet sigaraya ait duman (Grup 2), sigara makinesi ile 20 adet sigaraya ait duman ve E vitamini 50 mg/kg (Grup 3) uygulandı. Deney süresi bitiminde dişi fareler, 12 adet erkek fare kullanılarak çiftleştirildi. Smear testi ile uygun siklus günü belirlenerek farelere ötenazi yapıldı. Uterusları çıkarılarak elektron mikroskopisi altında endometrial pinopod oluşumu üzerine sigara dumanı ve E vitamininin etkileri incelendi.

**Bulgular:** Gruplar pinopod sayısı açısından kıyaslandığında tüm gruplar arasında fark olduğu tesbit edildi ( $p < 0.001$ ). Kontrol grubunda yüksek olan pinopod sayısının sigara içen grupta oldukça azaldığı tesbit edildi ( $p = 0.002$ ). Sigara+E vitamini grubunda ise sigara içenlere göre pinopod sayısının anlamlı şekilde fazla olduğu görülürken ( $p = 0.002$ ), kontrol grubundaki pinopod sayısına göre ise oldukça az olduğu gözlemlendi ( $p = 0.002$ ).

**Sonuç:** Sigara kullanımı endometriyumda hücresel düzeyde yaptığı etkiler ile implantasyonu azaltmaktadır. Bu etkiler vitamin E gibi antioksidan kullanımı ile kısmi olarak da olsa düzeltilebilir. Uygun antioksidan ve dozunun belirlenebilmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Sigara, endometrial pinopod, antioksidan, implantasyon, E vitamini.

## **ABSTRACT**

The possible effects of cigarette smoke and vitamin E on endometrial pinopode formation; An animal model on cigarette smoke exposed mice.

Erdolu Duran, M. Fatih Universty Faculty of Medicine, Department of Obstetric and Gynecology, Ankara, 2011.

**Aim:** To study on the effects of smoking and vitamine E on endometrial pinopode formation.

**Material and Method:** 18 Swiss-Albino female mice and 12 Swiss-Albino male mice who were 12-14 weeks old and with a mean weight of  $25,19 \pm 4,34$  gr. were used in this study. Female mice were divided into three groups as cigarette smoke exposed group, control group and cigarette smoke exposed plus vitamine E given group. Mice in the control group were injected intraperitoneal %0.9 NaCL, cigarette smoke exposed group mice were exposed 20 cigarette/day for ten weeks. Cigarette smoke exposed with the same manner and vitamine E were injected 50 mg/kg/day intraperitoneally for the third group. Female mice mated with male mice at the and of 10 weeks. Female mice sacrificed at appropriate cycle day that was determined by smear test. Uterus of the mices were excised surgically and the effects of smoke and vitamine E on endometrial pinopode formation was assesed by electron microscopy.

**Result:** The groups were compared according to number of pinepodes and there were statistically significany difference between all groups ( $p < 0.001$ ). The number of pinepodes were high in the control group whereas it was lower in the cigarette group ( $p = 0.002$ ). The number of pinepodes in the 3<sup>rd</sup> group was higher according to cigarette group ( $p = 0.002$ ) however it was lower according to control group ( $p = 0.002$ ).

**Conclusion:** Smoking adversely influence implantation with its effect on endometrial cells. These effects can partially be ameliorated by antioxidant therapies such as vitamine E. Further comprehensive studies is needed to determine the appropriate antioxidant therapy.

**Key Words:** Cigarette, antioxidant, vitamine E, endometrial pinopode, implantation.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE VE İMPLANTASYON.....	4
2.1.1. Endometrial Reseptivite.....	5
2.1.2. Reseptivitenin Morfolojik Belirteçleri: Pinopod .....	6
2.1.3. Reseptivitenin Biyokimyasal Belirteçleri .....	7
2.2. SİGARAYI OLUŞTURAN MADDELER ve FARKLI SİSTEMLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ.....	10
2.2.1. Sigara Dumanı .....	10
2.2.2. Sigara Dumanının Katran Fazı ve Gaz Fazı .....	11
2.2.3. Sigaranın Biyolojik Sistemlere Etkisi .....	15
2.3. SİGARANIN İNFERTİLİTE ÜZERİNE ETKİLERİ.....	18
2.3.1. Sigaranın Kadın İnfertilitesi Üzerine Etkileri .....	18
2.3.2. Sigaranın Erkek İnfertilitesi Üzerine Etkileri .....	21
2.4. SİGARA, OKSİDATİF STRES, ANTİOKSİDAN SİSTEM VE REPRODÜKTİF SİSTEM İLİŞKİSİ.....	22
2.4.1. Serbest Radikaller.....	22
2.4.2. Reaktif Oksijen Partikülleri (Reaktive Oxygen Species- ROS).....	23
2.4.3. Hücrelerde Serbest Radikal Üretimi.....	23
2.4.4. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Defans.....	24
2.4.5. ROS ve Reprodüktif Sistem.....	26
2.5. E VİTAMİNİ.....	28

2.5.1. Vitamin E'nin Emilimi ve Taşınması .....	30
2.5.2. Vitamin E Eksikliği .....	30
2.5.3. Vitamin E Toksisitesi .....	30
2.5.4. Vitamin E Kaynakları .....	31
2.5.5. E Vitamini Antioksidan Özelliği .....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
4. BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA.....	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
7. KAYNAKLAR.....	64

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

IVF	: In Vitro Fertilizasyon
FSH	: Foliküler Stimulan Hormon
LH	: Luteinizan Hormon
ICSI	: Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu
MMP	: Matriks Metalloproteinazlar
MUC	: Müsin
IL	: İnterlökin
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
KUF	: Koloni Uyarıcı Faktör
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TGF	: Transforming Büyüme Faktörü
PG	: Prostaglandin
DNA	: Deoksi-Nükleik-Asit
PPAR-ξ	: Peroksizom proliferatör aktive reseptör
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit anyonu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
OH	: Hidroksil radikali
NO	: Azot monoksit
NO <sub>2</sub>	: Azot dioksit
CO	: Karbon monoksit
CO <sub>2</sub>	: Karbon dioksit
Met-Hb	: Methemoglobin
TXA <sub>2</sub>	: Tromboksan



HbCO	: Karbon monoksi hemoglobin
Ig	: Immünglobulin
E <sub>2</sub>	: Estradiol
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbon
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
SOD	: Süperoksid dismutaz
TMHQ	: Trimetilhidrokinon
ET	: Embriyo transferi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Sigara dumanı katran fazı, serbest radikal oluşumu ve toksisite mekanizması .....	12
<b>Şekil 2.2.</b>	Moleküler oksijenin indirgenmesi .....	23
<b>Şekil 2.3.</b>	Reaktif oksijen partikülleri kaynakları.....	24
<b>Şekil 3.1.</b>	Fareleri sigara dumanına maruz bıraktığımız kafesin görünümü .....	32
<b>Şekil 3.2.</b>	Yüksek doz anestezi ile ötenazi uygulanmış swiss albino fareler .....	34
<b>Şekil 3.3.</b>	Laparotomi ile farelerin uteruslarının çıkarılması.....	34
<b>Şekil 3.4.</b>	Swiss albino cinsi farelerin uterusu .....	35
<b>Şekil 4.1.</b>	Kontrol grubuna ait uterus dokusu yarı ince kesitleri .....	42
<b>Şekil 4.2.</b>	A, B: Kontrol grubuna ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	43
<b>Şekil 4.3.</b>	Kontrol grubuna ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	44
<b>Şekil 4.4.</b>	Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait uterus dokusu yarı ince kesitleri ....	45
<b>Şekil 4.5.</b>	Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitleri .....	46
<b>Şekil 4.6.</b>	Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitleri .....	47
<b>Şekil 4.7.</b>	Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait uterus dokusu yarı ince kesitleri .....	48
<b>Şekil 4.8.</b>	Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	49
<b>Şekil 4.9.</b>	Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	50
<b>Şekil 4.10.</b>	Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu yarı ince kesitleri.....	51

<b>Şekil 4.11.</b> Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	52
<b>Şekil 4.12.</b> Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	53
<b>Şekil 4.13.</b> Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait tuba uterina dokusu yarı ince kesitleri.....	54
<b>Şekil 4.14.</b> Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitleri .....	55
<b>Şekil 4.15.</b> Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitleri .....	56
<b>Şekil 4.16.</b> Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait tuba uterina dokusu yarı ince kesitleri .....	57
<b>Şekil 4.17.</b> Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	58
<b>Şekil 4.18.</b> Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitleri.....	59

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Sigara dumanında bulunan önemli toksik bileşikler .....	13
<b>Tablo 2.</b> Sigarada bulunan kanserojen maddeler.....	16
<b>Tablo 3.</b> Antioksidanlar .....	25
<b>Tablo 4.</b> Major antioksidanların yapısı ve etkisi .....	26
<b>Tablo 5.</b> İstatistiksel analiz.....	40

# 1. GİRİŞ

İmplantasyon dinamik bir süreçtir. Bu süreç, embriyonun hazırlanmış endometriyum epiteline yaklaşması, tutunması ve endometriyal stromaya yayılmasını içerir. Başarılı bir implantasyon, blastokist ve reseptif endometriyum arasında karşılıklı etkileşimin sonucudur. Endometriyum reseptif olana kadar belirli morfolojik değişiklikler geçirerek gelişir. Endometriyal reseptivite, in vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi (ET) tedavilerinin başarısında önemli bir faktördür (1).

Blastokist sadece endometriyumun morfolojik ve moleküler değişiklikleriyle karakterize olan reseptif fazında implante olabilir. İmplantasyon boyunca uterin boşluğa uzanan epitelyal hücrelerin apikal membranları mikrovillüslerini kaybeder, geniş ve düz membran uzantıları gelişir. Endometriyal yüzeydeki bu uzantılar implantasyon penceresinin ince yapı belirteçleri olarak tanımlanmış olup pinopodlar olarak bilinirler. Pinopod ekspresyonlarında değişimlerin eşlik edebildiği, bozulmuş veya prematür endometriyal olgunlaşma, IVF sikluslarında implantasyon oranlarında azalmaya sebep olabilir. Ayrıca, maternal endometriyal hücreler, direk olarak ovaryan steroidlerle, indirek olarak çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerle düzenlenirler. Blastokist implantasyonunu destekleyen endometriyum farklılaşması progesteron ve östrojen tarafından ayarlanır. Yine de blastokist implantasyonunda endometriyum reseptivitesi sağlayan bu moleküler mekanizmalar netleşmemiştir. Her ne kadar hormonların pinopod oluşumu üzerine olumlu veya olumsuz etkileri araştırılmış olsa da çevresel faktörlerin bu oluşum üzerine olan etkileri halen tam olarak bilinmemektedir (2).

Sigara dumanı içerisinde bilinen en az 4700 bileşik vardır. Bu bileşenlerin çoğu farmakolojik olarak aktif, toksik, mutajenik ve karsinojeniktir. Sigaranın üreme sistemini etkilediğine dair birçok kanıt bulunmaktadır (3,4,5).

Sigaranın in vitro fertilizasyon sikluslarında fertilizasyon oranını azalttığı; oosit sayısını azalttığı, gebelik oranlarını düşürdüğü, düşük oranlarını artırdığı gösterilmiştir (6,7).

Sigara kullanımı aynı zamanda erken menopoza ve over rezervinin azalmasına neden olmaktadır (7).

Nikotin metaboliti olan kotinin nukleus ve stoplazmadaki proteinlere bağlanarak folikül matürasyonunu ve oositin mayotik oluşumunu bozar (8,9).

Sigarada bulunan ağır metaller olgunlaşan oositlerin fonksiyonunu inhibe ederek normal mayotik hücre bölünmesini bozarlar. Buna bağlı olarak tam matürasyona ulaşan oosit sayısının düşük kalmasına ve kromozomal anomalilerin görülmesine neden olurlar (10)

Sigara dumanındaki kimyasallar, reproduktif fonksiyon kaybını ve folliküler yetmezliği hızlandırmaktadır. Ortalama bazal FSH düzeyleri, içmeyenlere oranla belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (11). Sigaranın tubal mukozada sillier aktiviteyi bozduğu gösterilmiştir. Bu nedenle pelvik inflamatuvar hastalık için risk faktörü olduğu ve tubal faktörlü infertilite ile birliktelik gösterdiği belirtilmiştir (12,13).

Sigara kullanımı ile semen kalitesinde azalma, ejakülat volümü ve total sperm sayısı düşük bulunmuştur. Anormal morfolojide artma saptanmıştır. Leyding hücresi sekretuar yetmezliğine, epididimal sperm matürasyonunda ve spermin oositi penetre etme kapasitesinde defektlere neden olmaktadır. Anöploidi sıklığı ve DNA hasarı artmaktadır (14).

Sigaranın fertilité üzerine olan olumsuz etkileri daha çok; over rezervi, oosit sayısı-kalitesi, tubal fonksiyonlar ve sperm kalitesi değerlendirilerek gösterilmiştir. Bununla birlikte sigaranın endometriyum ve endometriyal reseptivite üzerine olası etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen metabolitleri üretilir. Serbest radikaller hücrelerde membran lipitleri, proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerine çok sayıda farklı moleküller yolu ile oksidatif hasara neden olmaktadır (6,15).

Sigara dumanının katran fazı; kinon, semikinon, hidrokinon, gaz fazı ise karbon ve oksijen merkezli serbest radikalleri yüksek konsantrasyonlarda içerir (16). Başka

moleküllerle elektron alışverişine girerek onların yapısını bozan moleküllere “serbest radikaller” denmektedir. Çeşitli patolojik durumlarda yapımı artan bu ürünler, hücrel makromoleküller ile reaksiyona girerek hücre hasarı oluştururlar (17,18). Akla bu oksidatif hasarın bir antioksidanla engellenip engellenemeyeceği gelmektedir.

E vitamini ya da alfa tokoferol insan dokusunda etkisini, erken dönemde serbest radikalleri bağlayarak, hücre membranlarını serbest radikallerin zararından koruyarak yapmaktadır. Biyolojik membranlarda bulunan yağda çözünen ve zincir kırıcı özelliği olan en önemli antioksidandır (19).

Oral antioksidanlar sigara tiryakilerindeki ve erkek faktörlü infertil hastalardaki sperm kalitesini arttırmaktadırlar. Aynı zamanda semeninde yüksek düzeyde reaktif oksijen radikalleri bulunan sağlıklı erkekler ile geçmişte yapılan invitro fertilizasyon sikluslarından düşük fertilizasyon oranı gösteren fertil normospermik erkeklerdeki fertilizasyon potansiyelini arttırmışlardır (20,21,22,23).

Kadınlarda uygulanan oral antioksidan tedavisiyle ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Erkeklere benzer olarak oral antioksidanların over, folikül sıvısı, tuba uterina gibi hedef alanlara ulaşip ulaşmadığı konusu henüz net olmamakla beraber nikotin metabolitlerinin bu bölgelere ulaşabildiği belirtilmektedir. Antioksidan tedavi ile ilgili optimal ilaç ve dozlar net değildir (24).

Sonuç olarak; kadınlarda sigara kullanımının infertiliteye neden olduğunu gösteren verilerin yanısıra fertilizasyon ve gebelik oranlarına hiç etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da vardır. Aynı zamanda vitamin ve minerallerin üreme fonksiyonu üzerindeki etkileri tartışma konusudur. Günümüzde bu farklı bulguların doğrulanmasına, sigara dumanının ve antioksidanların olası etkilerinin ortaya konmasına gereksinim vardır. Bu çalışmada, sigara dumanının ve antioksidan E vitamininin, fertilitede önemli rolü bulunan, implantasyon penceresinin bir göstergesi olan endometrial pinopod oluşumu üzerine olası etkilerini deneysel olarak hayvan modelinde göstermeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. ENDOMETRİYAL RESEPTİVİTE VE İMPLANTASYON

İnsan gelişimi bir oositin fertilize olması ile başlar. Fertilizasyon, birbirleri ile ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisi olup tek hücreli embriyo olan zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz plağında anne-baba kromozomlarının bir araya gelmesi ile sonlanır. Fertilizasyondan yaklaşık altı gün sonra blastokist sıklıkla iç hücre kitlesine yakın bölgeden (embriyonik kutup) endometrial epitele tutunur (25). Östrojen ve progesteronun stromal hücreler üzerine bir dizi etkisiyle şekillenen desidual hücreler, blastokistin implantasyonunda çok önem taşır. Dönüşüm sonucunda geniş, soluk ve glikojenden zengin olan bu hücrelerin hala kesin fonksiyonları bilinmemesine rağmen, embriyonun beslenmesi için elverişli, uygun bir çevre sağladıkları bilinmektedir (26). Sağlıklı embriyo gelişiminde çok önem taşıyan endometriyum; hormonal değişikliklere hassas ve kompleks bir dokudur (2).

İnfertilite çiftlerin %15-30' unu ilgilendiren bir problemdir. Günümüzde infertil çiftlerin tedavisinde yardımcı üreme tekniklerinden en sık olarak In Vitro Fertilizasyon (IVF) ve Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) kullanılmaktadır. İyi kalite embriyo transferine rağmen gebe kalmadaki başarısızlık IVF uygulamalarında önemli bir klinik problemdir. Embriyo implantasyon oranı %25-30 aralığındadır (27). İmplantasyon boyunca endometriyumun kalitesinin anlaşılması için bazı kriterler vardır. Steroidlerin etkisiyle ortaya çıkan mikroskobik görüntülerin yanı sıra noninvaziv yöntemlerle belirlenen endometriyal kalınlık ve morfolojinin değerlendirilmesi gibi makroskobik kriterlerde vardır. Ancak hala bu değerlendirmeler subjektif olup tartışılmaktadır (2).

İn vitro fertilizasyonun başarısını sınırlayan major faktör implantasyon yetersizliğidir. Bir blastokist, implantasyonun başlangıcı için, reseptivite kazanmış bir endometriumla etkileşime ihtiyaç duyar (28). IVF için ovaryan stimülasyonda kullanılan seks steroidlerinin yüksek konsantrasyona ulaşması endometrial



reseptivitenin azalmasına neden olabilir. Bu durum implantasyon oranını düşüren bir neden olarak değerlendirilebilir (29).

### **2.1.1. Endometriyal Reseptivite**

Tıp alanında son ilerlemelere rağmen insan infertilitesine katkıda bulunan uterin reseptivitenin oynadığı rol henüz netleşmemiştir. Ancak implantasyon başarısızlığının IVF gebelik oranlarında başarıyı etkileyen en önemli etmenlerden biri olduğu bilinmektedir (30,31).

Endometriyumun ultrason, endometriyal biyopsi ve uterin sekresyonların analizi gibi diğer tekniklerle klinik değerlendirmesi üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır. Çok sayıda protein ve moleküller endometriyal gelişmeyi etkileyebilir, ancak onların implantasyon sürecine katkısı ve klinik kullanıma geçişi, yeterince anlaşılamamıştır. İnsan endometriyumu fertilitate belirleyici bir faktör olarak düşünülebilir (32). İnsan embriyosunun implantasyon süreci, endometriyum ve embriyo arasında uygun bir diyaloga ihtiyaç duyar. Anne açısından reseptif endometriyum bir önkoşul gibidir (33). İmplantasyon; blastokist ve endometriyal tabakalar arasında kendiliğinden gelişen dinamik bir süreç olmasına rağmen implantasyon penceresi boyunca endometriyumun hazırlanması tamamen maternal kaynaklıdır. Aksine sağlıklı kadınların infertilitesinin en büyük sebebi, üreme tıbbının henüz çözümlenememiş olan implantasyon başarısızlığıdır. Gerçekte, IVF 'de implantasyon oranı %25 civarındadır (27). Yetersiz uterin reseptivite implantasyon başarısızlığının yaklaşık üçte ikisinden sorumludur (1). IVF de tekrarlayan implantasyon başarısızlığı kompleks bir konudur ve tamamen anlaşılamamıştır (34). Embriyonik anöploidi uterin kavite anomalileri ve değişmiş endometriyal reseptivite, potansiyel sebepler olarak rapor edilmiştir (35). Embriyo, transfer öncesi morfolojik olarak bazı kriterlere uygun olmalıdır. Ancak buna rağmen anöploidi olabilir ve implantasyonu etkileyebilir (36).

Transformasyon ve stromal desidualizasyon oluşan sekretuar faz endometriyumunda, belirleyici hormon progesteron iken, proliferatif fazın dominant hormonu östrojendir (37). İmplantasyonda; ovaryan steroidlere yanıt olarak oluşan

uterin duyarlılık; prereseptif, reseptif ve nonreseptif şeklinde üç fazda programlanır. Bilindiği gibi blastokist, endometriyumun benzersiz morfolojik ve moleküler değişimleri ile karakterize reseptif fazda implante olur (38).

### **2.1.2. Reseptivitenin Morfolojik Belirteçleri: Pinopod**

Birçok çalışma ovulasyon sonrası altıncı ve sekizinci günler arasında, uterin reseptivitenin dar bir penceresi içinde blastokist implantasyonunun önemini vurgular. Endometriyum; reseptif olana kadar belirli morfolojik değişiklikler geçirir. Bu morfolojik değişiklikler ilk olarak 1950' lerde Noyes ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Reseptif olan bu kısa ve kesin periyod; 48 saatten daha azdır. Bu süreç endometriyum epitelyal hücrelerinin apikal membranları üzerinde gelişen geniş ve düz uzantıların oluştuğu bir dönemi kapsayıp, implantasyon penceresi olarak adlandırılır (39). Endometriyumun reseptif durumuna ek olarak uterusun nötral ve saldırgan dönemlerinde olduğu düşünülmektedir. Nötral dönemde embriyo uterus içinde yaşayabilmekte, saldırgan dönemde ise aktif olarak yok edilmektedir. Hayvanlarda reseptif dönemin dışında yapılan uterus lavajlarında embriyotoksik ajanlara da rastlanmıştır (40).

İmplantasyon döneminde uterus boşluğuna uzanan epitelyal hücrelerin apikal membranları mikrovillüslerini kaybeder, geniş ve düz membran uzantıları gelişir. Pinositik fonksiyonları olduğu düşünülerek bu uzantılara, 1973' te Enders ve Nelson pinopod adını vermişlerdir (41). Daha sonraları genel bir terim olarak uterodome denilen pinopodların birçok moleküllerin ekspresyonunu yaptığı tesbit edilmiştir (42).

Bazı araştırmacılar, uterin reseptivite gelişimi ve pinopod ekspresyonunun kesinlikle progesteron bağımlı olduğu bunun yanı sıra yüksek doz östrojenin hem pinopod formasyonunu hemde blastokist implantasyonunu inhibe edeceğini rapor etmişlerdir. İmplantasyon penceresi, 28 günlük tipik menstrüel siklusun 20-23. günleri ile sınırlıdır (38). İlk olarak kemirgenlerde bulunan bu pinopod denilen oluşumların insanlarda implantasyon zamanında uterin salgıyı azalttığı düşünülmüş ama kesin bağlantı bulunamamıştır. Maksimum pinopod formasyonu olduğunda, endometriyum

lumen epitelyal hücrelerinde heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörünün yoğun bulunduğu ve pinopodlarla birlikte implantasyonda önemli rol oynadıkları düşünülmüştür (43). Dahası pinopod ekspresyonu, implantasyon penceresini lokalize etmede ve endometriyal reseptivitenin değerlendirilmesinde faydalı bir belirteç olabilir (44,45). Aslında epitelyal yüzeydeki bu silia benzeri uzantılar şeklinde görülen pinopodlar ışık mikroskobu ile de görülebilir (46). Ancak tarayıcı elektron mikroskobu ile kesin varlığı ve evresi tesbit edilebilmektedir (42,47). Endometriyal pinopodlar spesifik bir implantasyon belirteci olabilir. Ayrıca pinopodların sayısı hastalar arasında farklıdır ve embriyo transferinden sonra pinopod sayısı ve implantasyon arasında güçlü bir bağlantı olduğu bulunmuştur (48-49). Son yıllarda bazı araştırmacılar tarafından, pinopodlara her canlı türünde pinositoz yapılmadığından dolayı uterustaki kubbeler anlamında uterin-dome tanımının kullanımı tercih edilmektedir.

### **2.1.3. Reseptivitenin Biyokimyasal Belirteçleri**

Doğal sikluslarda gelişen embriyo ve olgunlaşan endometriyum arasında kendiliğinden oluşan bir uyum vardır. IVF sikluslarında azalmış implantasyon oranlarından ovo-endometriyal uyumsuzluk sorumludur. Östrojen ve progesteronun fizyolojik birçok rolünün taslağı çıkarılmasına rağmen bu moleküler ağ ve ortalama faaliyetleri büyük oranda bilinmez. Bu moleküller, sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinazlar (MMP), adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks komponentleri ve homeoboks element içeren genlerdir (50). Hücre Adezyon Molekül ailesi; integrinler, kadherinler, selektinler ve immünglobulinlerdir.

İntegrinler; transmembran glikoproteini olup, embriyolojik gelişmenin hücre-matriks ve hücre-hücre yapışmasını içeren önemli fizyolojik olaylarının çoğuna katılır.  $\alpha 5\beta 3$  integrin ve onun ligandı osteopontin, trofoblastla ilk etkileşimde, endometriyum lumen epitelyum yüzeyinden immunohistokimya ile pozitif tesbit edilmiştir. Epitelyal lokalizasyon ve ekspresyonuna bakarak  $\alpha 5\beta 3$  embriyonik tutunma için potansiyel bir reseptör olabilir (51). İntegrinler, en iyi çalışan adezyon moleküllerindedir. İntegrin  $\beta 3$  ekspresyonu; bir IVF programının başarısını tahmin etmek için faydalı olabilir (52). İntegrin  $\beta 3$  ekspresyonunun artması endometriyal reseptivite için bir işarettir. Literatüre

bakılınca,  $\alpha 5\beta 3$  integrin klinik için oldukça umut vericidir (36). İntegrin ve pinopodların ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı hormonal stimulyasyon protokolleriyle değişmez (53).

Selektinler lökosit transendotelyal trafiğinde çok önemlidir. L-selektin damarlanmada lökositlerin yapışmasında gereklidir.

Kadherinler, kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon mekanizmasından sorumlu glikoproteinlerin bir grubudur. Menstruel siklusun özellikle orta-sekretuar fazında insan endometrial epitelinde progesteronla kalsitonin salınımı uyarılır. Kalsitonin implantasyonda potansiyel bir düzenleyicidir. Artmış hücre içi kalsiyum salınımını izleyen endometriyal kalsitonin artışı E-kadherin ekspresyonunu düzenleyebilir ve blastokist yerleşiminde etkili olabilir.

İmmunglobulinler; endometriyumun hem stroma hemde epitelyal hücrelerinden salındıkları için patofizyolojide önemlidirler. İntersellüler adezyon molekülü-1; iki farklı seviyede aktive olarak endometriozis patogeneğinde rol oynar. Bu molekölün yüksek yapışma potansiyeli de endometriozisin sık tekrarlama nedenini açıklar (54).

Musinler (MUC); adezyon sağlayan moleküllerin aksine anti adeziv etkili bir gruptur. Musin Ailesinden olan MUC1, embriyo implantasyon için doğru yer ve doğru zamanı bulana kadar embriyoyu kovan bir moleküldür. Bu durumda lokal aktivasyon mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Embriyonun MUC1 engelini aşmak için eksprese ettiği tetikleyici faktörler olabilir (55).

Sitokinler, çok sayıda fizyolojik role sahip küçük multifonksiyonel glikoproteinlerdir. Bu moleküllerin davranışları vücuttaki implantasyon ve immün fonksiyonla ilgili çoğu süreçle bağlantılıdır. Sitokinler ve kimokinler implantasyon bölgesinde trofoblast farklılaşmasında rol oynar. İmplantasyon ve plasentasyonda önemli bir potansiyele sahiptir (56). İnterlökinlerden (IL); IL-1,IL-6,IL-10,IL-11,IL-15 VE IL-18, (LIF) lösemi inhibitör faktör, koloni uyarıcı faktör (KUF), tümör nekroz faktör(TNF) ve transforming growth faktör (TGF) bu geniş ailenin en kritik öneme sahip üyeleridir (38). LIF ekspresyonu luteal fazda maksimumdur ancak, bu düzenlemede steroid hormonlarının etkisinin nasıl olduğu bilinmemektedir. IL-1 başarılı

bir gebelik oluşumunda çok önemli rol oynayabilir. Bu sistem insan endometriyumunda menstrüel siklus boyunca hem glandüler hem de stromal hücrelerde tesbit edilmiştir (57). Endometriyal dokudaki IL ekspresyonunda değişimlerin olması, infertil vakalarla bağlantılı bulunmuştur (36). İnsan endometriyumunda IL-6 ekspresyonunun luteal faz boyunca en yüksek seviyelere ulaşması geçici bir durum olarak değerlendirilir (58). IL-6 reseptörünün blastokist, trofoblast ve endometriyum tarafından eksprese edildiği ortaya çıkarılmıştır.

Prostaglandinlerin (PG) başarılı embriyo implantasyonundaki rolü son zamanlarda çok tartışılan bir konudur. Bilindiği gibi başarılı IVF sonuçları embriyonun kalitesiyle yakından ilgilidir. Son çalışmalarda prostosiklinlerin embriyonun invitro gelişimini çok ileri düzeylere götürdüğü ve implantasyon potansiyelini zenginleştirdiği bulunmuştur. Ancak PGI2 ile ilgili mekanizmalar henüz açık değildir. Peroksizom proliferatör aktive reseptör(PPAR-ξ) implantasyon bölgesinde PGI2'nin etkisiyle ortaya çıkar. İmplantasyon öncesinde embriyolar reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle incelenmiştir ve bu embriyoların PPAR-ξ eksprese ettiği görülmüştür (59). Ekzojen PG uygulaması embriyo implantasyonunu doğru zamanda yeniden düzenleyebilir (60). PG' ler implantasyon penceresinde zamanlama aşamasında önemlidir. Blastokist implantasyonunda zamanlamada gecikme embriyonun serviks duvarına tutunmasına anormal plasentasyona ve fetal emilime neden olabilir. PG desteği kısmen normal bir fenotipi yeniden yapılandırabilir (31).

Embriyo pasif değildir, hatta yapışmasını ve kendi akibetinin düzenlenmesini sağlayabilir. Son zamanlarda ko-kültür teknikleriyle endometrial hücreler ve stroma geliştirilmiş olup donör embriyolar kullanılarak in vitro şartlarda ko-kültür endometriyumunun değerlendirilmesi sağlanabilmiştir. Bu şekildeki in vitro yaklaşım embriyo-endometriyum arası kompleks etkileşimi daha iyi anlamamıza katkıda bulunacaktır (61). Bu tartışılardan sonra geriye bir soru kalmaktadır; embriyo implantasyonu yardımcı üreme tekniklerinde gerçekten en son bariyer mi dir? Şu an ki bilgilerimize göre kesinlikle bir bariyerdir ancak bunun yanı sıra implantasyon bariyerine eşit veya daha fazlasıyla önemli başka bariyerlerde olduğunu göz ardı etmemek gerekir (62).

Pre-implantasyon sürecinde gelişen embriyo ve implantasyon için endometriyumun hazırlığı, bu konunun iki ana belirteci olmuştur. Olayların daha iyi anlaşılması kadın fertilitésinin düzenlenmesine ve infertilite problemlerini hafifletmeye yardım edecektir. Önceki çalışmalarda, açıklanamayan infertilitenin, birçok değişik endometriyal proteinin baskılanmasından sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Yeni yaklaşım, düzenlenmesi bozulmuş endometriyal proteinlerin direk tedavisiyle implantasyonun geliştirilmesidir. İmplantasyon penceresine giden endometriyal gelişmede çok sayıda değişik faktörün birlikte uygun işbirliğine ihtiyaç vardır. Ayrıca çoğu çalışmanın insan sisteminde gerçekleştirilmesi zor olduğundan fonksiyonel deneyimler eksiktir. Dahası, tanımlayıcı deneyler için bilinenler hala oldukça sınırlıdır. In vitro çalışmalar veya hayvan deneyleri, endometriyumda implantasyon sürecinin hücresel çatısının ve mekaniğinin daha iyi anlaşılmasını sağlayamamaktadır. Blastokist ve endometriyum arasında karşılıklı etkileşim, implantasyon için zorunludur. Tutunma reaksiyonu boyunca, blastokistin tutunduğu yerde endometriyal vasküler geçirgenlik artarak lokalize olur. Böylece birçok etik ve pratik anlamdaki zorluklara rağmen insan implantasyon mekanizmasının anlaşılmasına dair bazı sinyal yollarının tanınması ve adım adım özelliklerinin ortaya konulması ve bunları etkileyen faktörlerin tesbit edilmesi bundan sonraki sürecin hedefi olmalıdır.

## **2.2. SİGARAYI OLUŞTURAN MADDELER ve FARKLI SİSTEMLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

### **2.2.1. Sigara Dumanı**

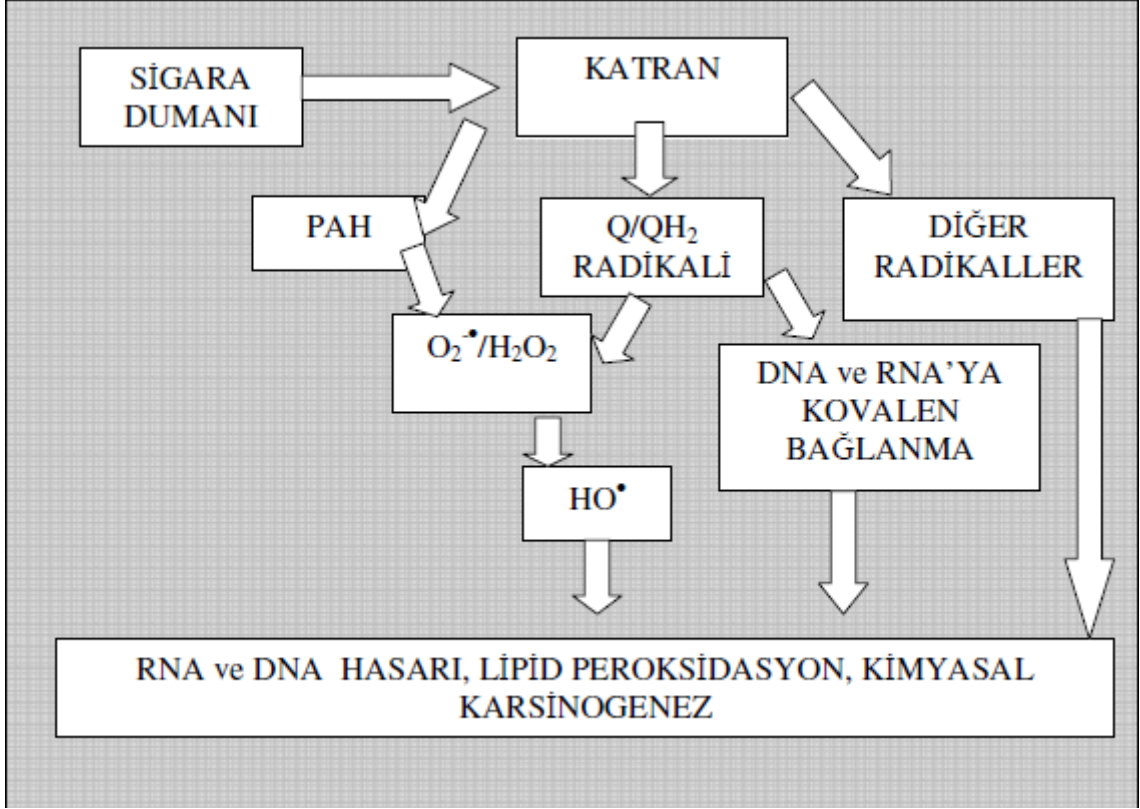
Sigara “Nicotina Tabacum” olarak adlandırılan tütün bitkisinin kurutulmuş yapraklarından elde edilir. Sigara içilmesi sırasında tütün yapraklarının yanması ile çok sayıda yanma ürünü meydana gelir. Sigara dumanı içerisinde bilinen en az 4700 bileşik vardır. Bu bileşenlerden çoğu farmakolojik olarak aktif, toksik, mutajenik, karsinojeniktir. Bunlar arasında oksidanlar, prooksidanlar, serbest radikaller, redükleyici ajanlar, formaldehid, asetaldehid, akrolein gibi aldehit ve ketonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, karboksilik asitler, steroidler, nitrozamin sayılabilir (3,4,5).

Sigaradan çekilerek inhale edilen dumana ana duman, bekleme esnasında havaya karışan dumana, yan duman denir. Ana duman ve yan duman çevresel tütün dumanını oluşturur. Çevresel tütün dumanının %85'i yan dumandan, %15'i ise ana dumandan oluşur. Yan duman içerisindeki bileşenler ana dumana göre daha yüksek konsantrasyondadır; fakat havada daha büyük volüm içerisinde dilüe olurlar (63).

Sigara, aktif olarak içen kişinin sağlığını olumsuz etkilediği gibi, aynı ortamda bulunan diğer bireylere de birçok olumsuz etki yapmaktadır. Pasif içicilerin aldığı yan duman, sigara içenler tarafından inhale edilen dumanda tanımlanan tüm karsinojenleri içermekte ve sigara filtresinden de geçmediğinden ana dumandaki karsinojen ağırlığının 100 katı kadarını içinde bulundurmaktadır. Pasif içicilerde de aterosklerotik lipoproteinlerin arttığı, antiaterojenik lipoproteinlerin azaldığı ve koroner arter hastalığına bağlı ölüm oranının yüksek olduğu saptanmıştır (64,65,66).

### **2.2.2. Sigara Dumanının Katran Fazı ve Gaz Fazı**

**Sigara Dumanının Katran Fazı:** Sigara dumanı 0.1 µm'den büyük çaplı partiküllerin %99.9'unu tutan "standart glass-fiber" filtresinden geçtiğinde filtrede tutulan kısmı katran fazı olarak tanımlanır. Katran fazı stabil ve kompleks bir karışımdır. Katran fazı, pek çok organik bileşimin yanı sıra kinon ve polisiklik aromatik hidrokarbon radikalleri gibi stabil radikalleri içerir. Sigaranın katran fazında bulunan kinon/hidrokinon radikalleri oksijeni indirgeyerek süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali (OH) oluşumuna yol açarak toksisiteye neden olur (Şekil 2.1), (4,67,68).



**Şekil 2.1.** Sigara dumanı katran fazı, serbest radikal oluşumu ve toksisite mekanizması

**Sigara Dumanının Gaz Fazı:** Filtrenin içinden geçebilen materyaldir. Sigara dumanı katran fazının içerdiği bileşikler ve radikaller stabil olmasına rağmen gaz fazı labildir. Yanma sonucu kendi kendine oluşan karbon ve oksijen merkezli serbest radikalleri yüksek konsantrasyonlarda içermektedir. Bu radikaller çok kısa ömürlüdür. Gaz fazının diğer önemli ve radikal oluşumuna sebep olan içeriği ise azot monoksit (NO)'tir ve 300-500 ppm gibi yüksek oranlarda bulunur. Azot monoksit, reaktivitesi çok daha fazla olan azot dioksite (NO<sub>2</sub>) yavaşça okside olur (67,69).



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

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

### **Sigara Dumanı -Gaz Fazı Bileşikleri**

*Karbon Monoksit:* Karbon monoksit (CO), tütünde yer alan organik bileşiklerin kısmi oksidasyonu sonucu oluşur. Renksiz, kokusuz bir gazdır. Sigara dumanında yaklaşık %2.9-5.1 oranında bulunur. CO, kanda hemoglobin demirine bağlanarak, karbon monoksi hemoglobin (HbCO) bileşimini oluşturur ve hemoglobinin diğer hem

bölgelerinin oksijeni yüksek ilgiyle bağlamasına neden olur. Bu durum saturasyon eğrisini sola çevirerek, hemoglobinin dokulara oksijen bırakma kapasitesini kısıtlar (70).

*Karbon Dioksit:* Tütündeki organik bileşiklerin yanması ile oluşan ve sigaranın gaz fazında yer alan bir bileşiktir. Karbon dioksitin ( $CO_2$ ) bir bölümü karbamat olarak taşınır.  $CO_2$  bağlanması hemoglobinin T (Taut) veya deoksi şeklini stabilize ederek oksijene ilgisini azaltır (71).

*Azot Oksitleri:* Sigara dumanı 500 ppm kadar azot monooksit (NO) içerir. Sigara dumanındaki azot oksitleri kanda toksik etki yapan methemoglobini (Met-Hb) oluştururlar. Nitrik oksit 6-10 saniye gibi kısa etki gösterir ve oksidasyona uğrayıp azotdioksite ( $NO_2$ ) dönüşür (71).

*Uçucu Nitroz Aminler:* Tütün ürünleri önemli miktarlarda N-nitrozo bileşiklerini içerirler. Tütüne özgü nitroz aminler, tütünde 1.000-10.000  $\mu g/kg$  oranında bulunurlar. Hayvan çalışmalarında kanserojen oldukları gösterilmiştir (72).

### **Sigara Dumanı -Katran Fazı Bileşikleri**

*Katran:* Sigara dumanı katranında oldukça yüksek derişimlerde yer alan aktif metil florantenlerin tümör başlatıcı aktiviteye neden oldukları saptanmıştır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlardan Benzo (a) Piren'in sigara dumanında yer alan potent kanserojen maddelerden biri olduğu hayvan deneyleri ile gösterilmiştir. Uçucu olmayan çeşitli aromatik nitrozaminler ve aromatik aminlerin de mesane kanserinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Sigara dumanının içeri çekilmesi ile sigarada bulunan kadmiyumun %10- 20'si vücut tarafından absorbe edilmekte ve çeşitli dokularda birikerek toksik etki göstermektedir (Tablo 1),(72).

*Nikotin:* Nikotin alkaloid yapısında renksiz uçucu bir sıvıdır. Kullanılan tütüne göre, bir sigaradaki nikotin miktarı 20 mg'a kadar çıkabilirken, vücuda alınan nikotin miktarı, sigaranın cinsine, inhalasyon derinliğine ve süresine göre 0.05-2 mg arasında değişebilir. Absorbsiyonu sonucu dolaşıma giren nikotinin %25'i yedi saniye gibi

sürede beyine ulaşır. Bütün vücut sıvılarına dağılım gösterebilen nikotin, gebelerde plasentadan fetal dolaşıma ve emziren annelerde süte kolaylıkla geçer. Nikotin karaciğerde major metaboliti olan kotinine dönüşür. Kotinin'in yarılanma ömrü yaklaşık 19 saattir ve böbreklerden atılır.

Nikotinin uzun süre sigara veya diğer şekillerle alınması yalnızca psişik değil, aynı zamanda fiziksel bağımlılığa da yol açar. Nikotin, santral sinir sistemi üzerine psikostimülan etki eder. Ayrıca hem nöromusküler kavşakta hem de otonomik gangliyonlarda stimulus iletimini önce uyarır, arkasından bloke eder. Nikotin vazopressin, adrenokortikotrop hormon, katekolamin gibi hormonların düzeyinde artış yaparak damarlarda vazokonstrüksiyona neden olmaktadır (73,74).

### **2.2.3. Sigaranın Biyolojik Sistemlere Etkisi**

Sigaranın Kardiyovasküler Yapılara Etkileri: Sigara kullanımı ve koroner kalp hastalıkları arasındaki ilişki ilk olarak 1940 yılında yayınlanmıştır. Bu tarihten beri sigaranın kardiyovasküler hastalık riskini, inmeyi, ani ölümü, kalp krizini, periferik damar hastalıkları ve aort anevrizması riskini artırdığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Günde içilen sigara sayısı ile orantılı olarak total kolesterol seviyesinin arttığı, yüksek dansiteli lipoprotein konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiştir (75,76,77). Miyokard infarktüsü geçirdikten sonra sigara kullanmaya devam edenlerde ise bırakanlara oranla tekrarlayan miyokard infarktüsünden ölüm iki kat yüksek bulunmuştur. Sigara içenlerde içmeyenlere göre 1.5-3 kat daha fazla beyin damar hastalığı görülmektedir (78). Sigara içmenin, özellikle nikotin ve karbonmonoksit aracılığı ile vasküler endotele zarar verdiği ve endotelial hasarın da aterosklerozun gelişiminde birinci sebep olduğu gösterilmiştir. Sigara artmış kalp atımı ve kan basıncı, azalmış myokard oksijen dağılımına neden olur. Karbonmonoksit damar endotelinin lipidlere geçirgenliğini artırır.

Nikotin çok güçlü bir trombosit agregasyonu inhibitörü olan PGI<sub>2</sub> sentezini azaltır. Bu durum TXA<sub>2</sub> üretimini artırır. Böylece tromboz riski artar. Sigara koroner spazmın da major bir risk faktörüdür (79,80,81).

Sigaranın kronik kullanımına bağlı kemik iliğinde kan hücresleri ve diğer kan faktörlerinin artışı hiperkoagülobilite ile seyredebilir. Özellikle ekstremite venöz yapılarında varis, venöz yetmezlik gibi problem olan hastalar venöz trombozlar ve komplikasyonları ile karşılaşabilirler (79,80,81).

Sigaranın Kanser Oluşumuna Etkisi: Sigara en önlenbilir kanser nedenidir. Sigaranın etyolojide yer aldığı kanserler akciğer, trakea, bronş, larenks, farenks, oral kavite ve özafagus kanserleridir. Ayrıca pankreas, böbrek, mesane, serviks, ve kolorektal kanserler ile de ilişkisini ortaya koyan çalışmalar vardır (Tablo 2), (82,83,84).

**Tablo 2.** Sigarada bulunan kanserojen maddeler

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

Sigaranın Solunum Sistemine Etkisi: Solunum sistemi dış çevreden her nefeste dumanlar, gazlar v.b. birçok madde ile temas eder. Sigara içimi ile ortaya çıkan siliaların sayısında ve frekansında azalma, viskoelastisitesi ve volümü artmış mukus tabakası ile mukosilier klirensin bozulması sonucu irritan inhaler partiküllerden, mikroorganizmalardan bronşial lümenin temizlenmesi bozulmakta ve enfeksiyon riski artmaktadır (85,86,87). Sigara içimine devam edilmesi ile hava yollarını kaplayan pseudostratifıye silli epitelde önce skuamoz metaplazi daha sonra karsinoma in situ hatta invaziv bronkojenik karsinomaya kadar içilen sigara sayısına bağlı olarak yapısal değisiklikler meydana gelmektedir (88).

Sigaranın İmmün Sisteme Etkileri: Sigara T hücrelerinin çoğalımını baskılamakta; doğal öldürücü hücreler (natural killer) ve alveolar makrofaj fonksiyonlarını etkilemekte; IgG ve IgA'nın serum düzeylerinde düşüklüğe neden olmaktadır (89).

Sigaranın Endokrin Sisteme Etkileri: Sigara içimi büyük oranda endokrin değişikliklerle ilişkilidir. Bu durum ciddi periferik etkiler kadar santral sinir sisteminde hipotalamik gonadotropin salınımı değişikliğine kadar gidebilmektedir. LH piki azalmakta, serum prolaktin ve tiroksinin oluşumunu etkilemektedir. Ayrıca adrenal fonksiyonlar üzerine de etkisi vardır (90).

Sigaranın, hormonal parametreler üzerine etkileri olması nedeni ile üreme üzerine etkileri vardır. Çalışmalarda menstruel siklusun ikinci veya üçüncü gününde tanımlanan E2 seviyeleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bodis ve ark. tarafından nikotinin in vitro insan follikül hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır (91). Nikotinin E2 sekresyonunda doza bağlı bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber, erken dönemdeki yüksek E2 seviyelerinin de ovaryan cevaptaki bozukluğa ve daha düşük oosit elde edilmesine sebep olabileceğini bildirmişlerdir (92). Diğer bir gözlemlerde prolaktin seviyelerinin genellikle sigara içen kadınlarda belirgin şekilde düşük olmasıdır. Berta ve ark. nikotinin, merkezi dopamin salınımını etkileyerek prolaktin sekresyonunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir (93). Fizyolojik olarak doğum sonrası prolaktin seviyesi artışı ile erken gebeliği önleyen FSH / LH mekanizması düzenlenir. Bu nedenle, kuramsal olarak daha düşük prolaktin seviyesi fertilité oranları üzerinde pozitif etkiye sahiptir. Ancak, literatürde fertilitenin düşük prolaktin seviyelerinden negatif olarak etkilendiğini gösteren çalışmalarda mevcuttur (94).

Bazı çalışmalarda, sigara dumanı ekstraktlarının granüloza hücresi aromataz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Granüloza hücresi aromataz aktivitesinin ise gebelik potansiyeli ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Granüloza-luteal hücre fonksiyonunun inhibisyonu korpus luteum yetmezliğine yol açabildiğini gösteren bulguya göre, sigara dumanına maruz kalan kadınlardaki yüksek oranlı erken dönem gebelik kaybının altında yatan mekanizmalardan biri olabileceği düşünülmektedir (95,96).

## 2.3. SİGARANIN İNFERTİLİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

### 2.3.1. Sigaranın Kadın İnfertilitesi Üzerine Etkileri

Sigaranın infertiliteye neden olduğu tartışılan konulardandır. Üreme kompleks bir sistemdir ve bu sistemin içindeki yapılar birçok faktörden etkilenmektedir. Fertilité, hipotalamus-hipofiz-over aksı, gametler ve endometriuma kadar birçok sistemin normal çalışması sonucunda oluşur. Sigaranın bu sistemi etkilediğini gösteren bir çok veri bulunmaktadır (8,97,98). Sigara içen kadınlarda yapılan pek çok çalışmada ovaryan fonksiyonu bozulmuş olan genç kadınlarda (<38 yaş) fertilizasyon oranı, gebelik ve sigara içme alışkanlığı arasındaki ilişkiye ait hiçbir kanıt gösterilememiştir (6,99,100,101,102,103). Klomifen sitrat testiyle değerlendirilen normal ovaryan rezerve sahip olan ve sigara içen kadınların, sigara içmeyen kadınlarla benzer gebelik oranlarına sahip oldukları da bildirilmiştir (7). Fertil kadınlardaki spontan dizigotik ikiz görülme insidansındaki artış ile sigara içme alışkanlığı arasındaki ilişkiyi yüksek steroid hormon konsantrasyonuna bağlamışlardır (11). Sigara kullanan kadınlarda, fertilizasyon oranının ve gebelik oranlarının düştüğünü bildiren yayınlar mevcuttur (6,101,104,105). Ek olarak sigara kullanımı erken menopoza ve ovaryan rezervin azalmasına neden olmaktadır (7).

Sigara dumanında bulunan kadmiyum, kotinin ve benzopirenin insan gamet hücrelerine etkileri gösterilmiştir. Bir sigarada yaklaşık 1.0-2.0 mg olan kadmiyum sigara dozuna bağlı olarak over, testis, epididim ve vezikülo seminalisde birikir. Nikotin metaboliti olan kotinin nukleus ve sitoplazmadaki proteinlere bağlanarak folikül matürasyonunu ve oositin mayotik oluşumunu bozar (8,9).

Trapp ve ark. tütünde bulunan bir madde olan rodanitin foliküler sıvıda da bulunduğunu kanıtladı (106). Zenzes ve ark. sigara içenlerin folikül sıvısında belirgin, anlamlı kadmiyum artışı bildirmişlerdir (107). Sigarada bulunan ağır metallerin, olgunlaşan oositlerin fonksiyonunu inhibe ederek normal mayotik hücre bölünmesini bozması ve tam matürasyona ulaşan oosit sayısının azalması ile kromozom anomolileri artışından sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Zenzes ve ark. bir diğer çalışmalarında ise günlük olarak içilen sigara sayısı ile folikül sıvısı ve serum kotinin seviyelerindeki artış arasında bir korelasyon gözlemişlerdir (10).

Her sigarada 6-40 ng olan polisiklik aromatik hidrokarbon grubundan Benzopiren'in, over hücrelerinde DNA hasarına yol açtığı, in vitro granuloza hücrelerinde de aromataz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (8,108).

Kemirgen ve insan çalışmalarına göre; sigara dumanındaki zehirli maddelerden biri olan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)' nun reproduktif sistem üzerine olumsuz etkiler yaptığı gösterilmiştir (105,109).

Sigara kullananlarda, kullanmayanlara göre konsepsiyona kadar olan sürenin uzadığı, infertilite prevalansının arttığı gösterilmiştir. 12 ayın üzerinde konsepsiyon gecikmesi yaşayan kadınların oranı, sigara içenlerde %16.4 iken, sigara içmeyenlerde %10.3 olarak bulunmuştur (110). Buna karşın üremeye hiçbir etkisi olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (100,111).

Sigara, gelişen oosit sayısını etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada, ağır sigara içicilerde (>20 sigara/gün) oosit sayısına etki açısından OR:0.828 ve oosit sayısında %17.2 azalma bulunmuştur (12). Sigara dumanındaki kimyasallar reproduktif fonksiyon kaybını ve foliküler yetmezliği hızlandırmaktadır. Ortalama bazal FSH düzeyleri sigara içenlerde içmeyenlere göre belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (11). Bir çalışmada bazal FSH düzeyleri sigara içmeyenlere nazaran aktif sigara içicilerinde %66 daha yüksek bulunmuştur (112). Başka bir çalışmada ise sigara içenlerde lüteal faz süresince üriner östrojen atılımı sigara içmeyenlere göre azalmış olarak saptanmıştır. Bu etki sigaranın granuloza hücresi aromataz aktivitesini inhibe etmesine bağlanmıştır (108).

Sigaranın tubal mukozada silier aktiviteyi bozduğu gösterilmiştir. Hem sigara içenler hem de sigarayı bırakmış olanların infertilite nedeni olarak hasarlı fallop tüpüne sahip olmaya daha yatkın oldukları bildirilmiştir. Sigara kullanımının pelvik inflamatuvar hastalık için risk faktörü olduğu ve tubal faktörlü infertilite ile birliktelik gösterdiği de bildirilmiştir (12,13).

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

bulunmuştur. Bu sonuçlara göre sigara içenlerde gelişen embriyolarda apoptozisin inhibe edildiği düşünülmüştür (113).

Sigara mayotik içciklenmeyi bozabilir. Oositlerdeki mayotik içciklenmenin ileri yaş, ileri oosit yaşı, ısı değişiklikleri gibi faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (8). Zenses ve ark. içilen sigara sayısı ile orantılı olarak 23 yerine 46 kromozom içeren diploid kromozomlu oosit oranının arttığını göstermişlerdir (114). Diploid oositler mayotik içciklenmede sorun olduğunda ortaya çıkarlar. Sigara dumanındaki alkaloidlerin, mayotik içciklenme olayında yer alan protein yapısındaki tubuline bağlandıkları gösterilmiştir. Augood ve ark. tarafından yapılan bir meta-analizde, literatürdeki olgu kontrollü ve kohort çalışmalar değerlendirilmiştir (110). Olgu kontrollü çalışmalarda, sigara içen 10928 kadında %26.6 infertilite saptanırken, sigara kullanmayan 19179 kadında %20 infertilite saptanmıştır. Sigara içenlerde infertilite için OR 1.60 (%95 CI 1.34-1.91) olarak bulunmuştur. Kohort çalışmalarda ise sigara içen 6990 kadında %23 infertilite saptanırken, sigara içmeyen 13069 kadında %14.2 infertilite saptanmıştır. Sigara içenlerde infertilite için OR 1.42 (%95 CI 1.27-1.58) olarak bulunmuştur. Bu bulgulara göre sigara içimi ve infertilite arasında çok yakın ilişkisi olduğu düşünülmüştür (8).

Sigara ve infertilite ilişkisini gösteren önemli sonuçlar, yardımcı üreme yöntemlerinin sigara ile ilişkisini araştıran çalışmalardan elde edilmektedir. Sigaranın IVF-ET' de fertilizasyon oranını düşürdüğü, oosit sayısını azalttığı, gebelik oranlarını olumsuz yönde etkilediği, düşük oranlarını arttırdığını bildiren çalışmalar vardır (7,115). Bir çalışmada sigara içenlerin gebe kalmak için içmeyenlere göre yaklaşık 2 kat fazla IVF siklusuna ve daha yüksek dozlarda gonadotropine ihtiyaç duydukları ileri sürülmüştür (116). Bunun yanında sigaranın fertilizasyon ve gebelik oranlarına hiç etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (117). Feichtinger ve ark.'nın 2314 IVF-ET siklusuna dayanan bir meta-analizinde sigara içmeyen kadınlarla karşılaştırıldığında sigara içen kadınların gebe kalmak için neredeyse iki kat IVF-ET siklüsüne gerek duydukları gösterilmiştir (RR:1.79) (%95 CI 1.24-2.59). Sigara içmeyenlerde (%21) sigara kullananlarda ise anlamlı şekilde daha düşük (%14) gebelik oranlarının bulunduğu rapor edilmiştir (116). Sigara içmeyenlere nazaran sigara içenlerde daha düşük ortalama oosit sayısı elde edilmiştir ( $p < 0.0001$ ). Sonuçta,



kadınlardaki sigara içme alışkanlığının over rezervini önemli ölçüde düşürdüğünü ve erken yaşlardaki ovaryan stimülasyona karşı yetersiz cevap vermelerine yol açtığı düşünülmüştür (11).

### **2.3.2. Sigaranın Erkek İnfertilitesi Üzerine Etkileri:**

Bazı araştırmacılara göre sigara, sperm dansite ve motilitesini bozmakta fakat morfolojiyi etkilememektedir (118). Bazılarına göre sigara dansite, motilite ve morfolojiyi bozmaktadır (119). Yine bazılarına göre sigaranın hiçbir sperm parametresi üzerine etkisi yoktur (120). Diğer taraftan çeşitli çalışmalarda da sigara dumanına maruz kalmanın sperm sayısına veya sperm motilitesine etkisi olmadığı gösterilmiştir (121,122,123,124). Vine tarafından yapılan bir metaanalizde ise, sigara kullanımının semen kalitesi üzerine etkisi incelenmiş, uzun süreli sigara kullanımının semen kalitesini etkilediği gösterilmiştir. Fertil olgularda yapılan 9 çalışmadan 7'sinde, infertil vakalarda yapılan 19 çalışmadan 6'sında semen kalitesinde önemli azalma olduğu bildirilmiştir (125).

Osser ve ark. infertil 250 olguda, sigara içenlerde ejakulat volümünün ve total sperm sayısının anlamlı olarak düşük olduğunu bulmuşlar, motilite ve morfolojide ise anlamlı fark bulamamışlardır (126). Yamamoto ve ark.'nın ratlarda yaptığı bir çalışmada, sigara dumanına maruz kalmanın, Leyding hücresi sekretuar yetmezliği ve epididimal sperm matürasyonu ve spermin oositi penetre etme kapasitesinde defektlere neden olduğu bildirilmiştir. Günde 20 sigaradan fazla içen erkeklerde XX anöploidi sıklığı, içmeyenlere göre fazla bulunmuştur (127). Belcheva ve ark. erkekte sigara kullanımı ile DNA fragmantasyonuna sahip spermatozoa yüzdesinin arttığı, bununla birlikte bu DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Sigara içenlerin sperm DNA fragmantasyonundaki bu ilave artış seminal ROS düzeyinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (128).

Sigara dumanının testis mikrosirkülasyonu ve oksijenizasyonu üzerine etkileri vardır ve sperm fonksiyonlarını bu mekanizmalarla bozabilir (129). Sigara içimi ile testosteron seviyesinin yükselmesi, düşmesi gibi hormon değişiklikleri görülebilir.

Östradiol seviyelerinin sigara içenlerde düştüğü gösterilmiştir (130). Yapılan bir metaanalizde sigara kullanımının, sperm konsantrasyonunu %13 düşürdüğü bulunmuştur (131).

Sigara dumanındaki metabolitlerden bazıları seminal reaktif oksijen radikallerinin (ROS) düzeyini artırabilir. ROS oksidasyon nedeni ile sperm DNA'sı ve membran fosfolipidleri için zararlıdır. Sigara içilmesi semendeki lökosit infiltrasyonunu artırabilir. Lökositler ejakulattaki major ROS kaynağıdır (132,133).

Sigara dumanına maruz kalmak Leydig ve Sertoli hücrelerinde sekreteruar yetmezlikle sonuçlanmakta ve epididimal sperm maturasyon süresinin bozulması ile spermatozoaların oositleri penetre etme kapasitesinin azalmasına yol açabilmektedir. Ayrıca ebeveynin sigara dumanına maruz kalması embriyonik implantasyon yeteneğini de etkilemektedir (124). Sigaranın metaboliti olan kadmiyumun, deney hayvanlarında testiküler hasara yol açtığı ve sperm fonksiyonlarını değiştirdiği gösterilmiştir.

Sigaranın fertilité üzerine olan olumsuz etkileri daha çok; over rezervi, oosit sayısı-kalitesi, tubal fonksiyonlar ve sperm kalitesi değerlendirilerek gösterilmiştir. Bununla birlikte sigaranın endometrium ve endometrial reseptivite üzerine olası etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

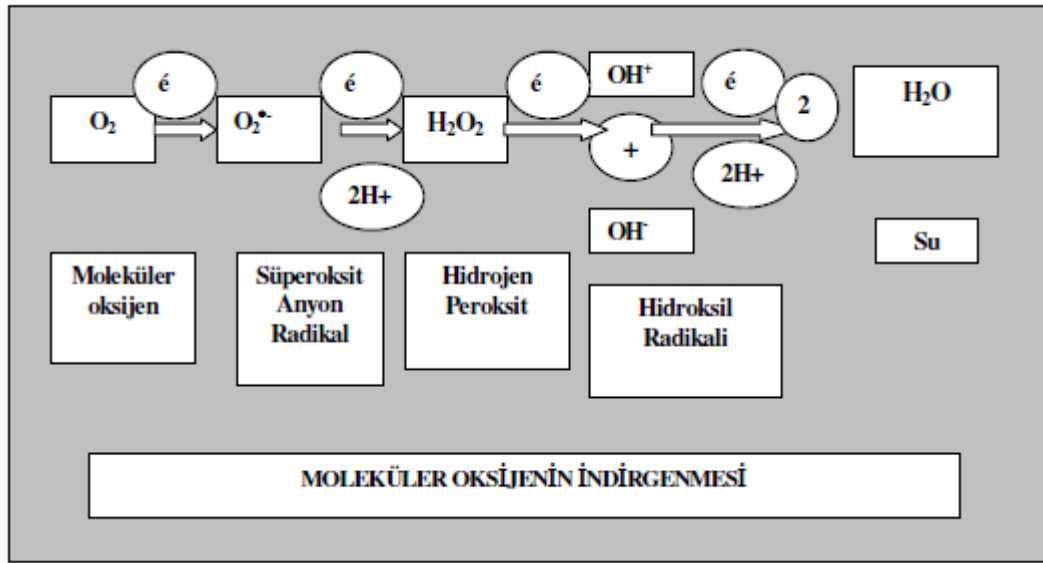
## **2.4. SİGARA, OKSİDATİF STRES, ANTİOKSİDAN SİSTEM VE REPRODÜKTİF SİSTEM İLİŞKİSİ**

### **2.4.1. Serbest Radikaller**

Başka moleküller ile elektron alışverişine girerek yapıyı bozan moleküllere “serbest radikaller” denmektedir. Çeşitli patolojik durumlarda yapımı artan bu ürünler, hücresel makromoleküller ile reaksiyona girerek hücre hasarını oluştururlar (17,18,134).

## 2.4.2. Reaktif Oksijen Radikalleri (Reactive Oxygen Species-ROS)

Reaktif oksijen radikalleri, moleküler oksijenden türemiş olup dış yörüngelerinde bir adet çiftlenmemiş elektron ( $e^-$ ) içeren, atom ya da moleküllerdir (135,136). Moleküler oksijenin tek elektronla indirgenmesi sonucu  $O_2^-$  ortaya çıkar. SOD enziminin katalize ettiği bir reaksiyon ile  $O_2^-$   $H_2O_2$  'ye dönüşür.  $H_2O_2$  'den mitokondri içinde "Fenton reaksiyonu" ile "hidroksil radikali" ( $OH^-$ ) oluşmaktadır. Hidroksil radikali ROS ürünleri arasında en toksik olanıdır ( Şekil 2.2) (137).

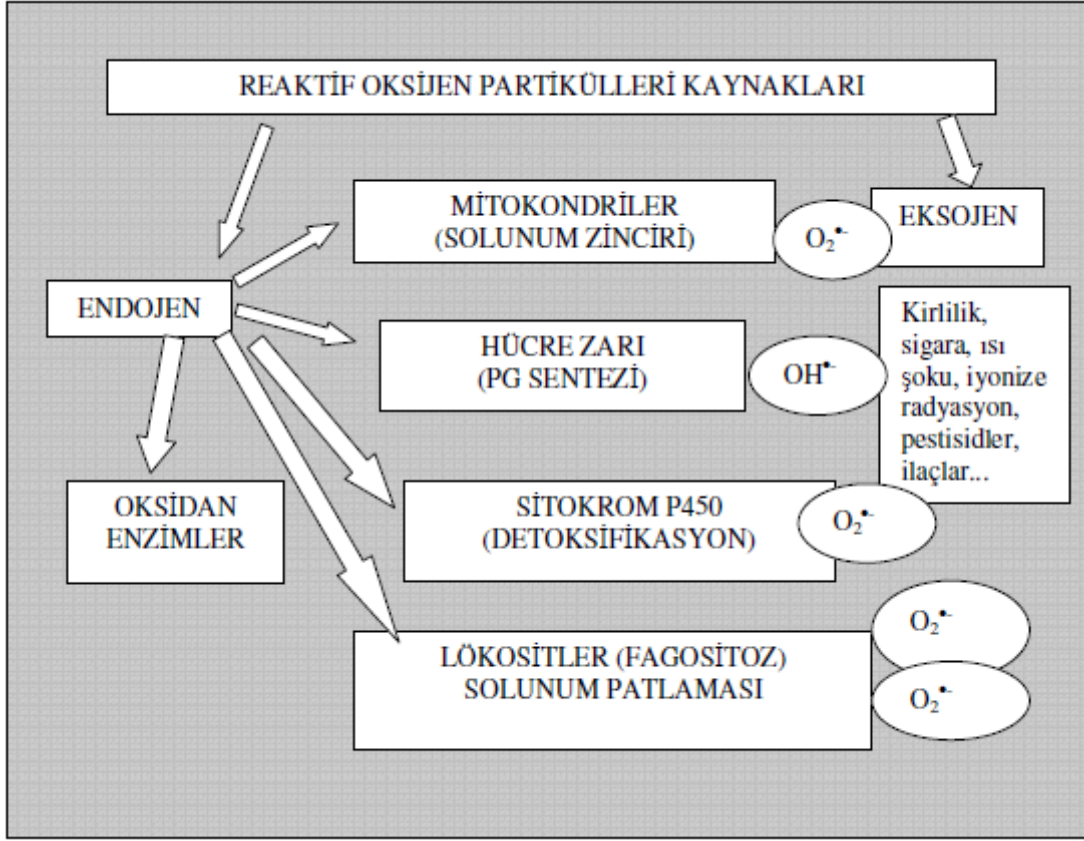


Şekil 2.2. Moleküler oksijenin indirgenmesi

## 2.4.3. Hücrelerde Serbest Radikal Üretimi

Normal şartlarda organizmadaki serbest radikallerin ana kaynağı mitokondri veya endoplazmik retikulumdaki elektron transport zincirinden olan elektron kaçıdır. Serbest radikallerin yaptığı hasara en duyarlı olan moleküller lipidlerdir. Proteinler ve nükleik asitler ROS saldırısına poliunsatüre yağ asitlerine oranla daha az duyarlıdır. Hücre membranlarının poliunsatüre yağ asitlerince zengin olması nedeni ile kolaylıkla ROS' dan etkilenirler. Poliunsatüre yağ asitlerinin oksidatif destrüksiyonu sonucu bir zincir reaksiyonu başlar ve bu durum "lipid peroksidasyonu" olarak adlandırılır. Lipid

peroksidasyonu membran lipidlerini etkilemesi nedeni ile membran işlevini bozar ve doku hasarına neden olur (Şekil 2.3) (138,139).



Şekil 2.3. Reaktif oksijen partikülleri kaynakları.

#### 2.4.4. Serbest Radikallere Karşı Hücresel Defans

Belirli düzeyi aşmış olan oksidanlara doğrudan etki ederek onları inaktif hale getiren bu maddelere “antioksidanlar” denmektedir (Tablo 2.3). Antioksidanlar hücre zarında veya intrasellüler sıvıda bulunabilecekleri gibi enzim veya non-enzim yapısında olabilirler ve genellikle serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya daha önce oluşan partikülleri etkisiz hale getirerek etki gösterirler (18).

**Tablo 3.** Antioksidanlar

ANTIÖKSİDANLAR	
DOĞAL ANTIÖKSİDANLAR	ANTIÖKSİDAN İLAÇLAR
<b>ENZİMLER:</b> SOD, Katalaz, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon Redüktaz, G6PDH, Sitokrom C oksidaz... <b>MAKROMOLEKÜLLER:</b> Seruloplazmin, Transferin, Ferritin, Hemoglobin, Myoglobin <b>MİKROMOLEKÜLLER:</b> Vit. E, Vit. C, Vit. A, Glutasyon, N-asetil sistein, Ürat, Glikoz, Bilürübin.	Rekombinant h-SOD Ebselen Aminosteroidler Demir çelatörleri Sitokinler Ksantin oksidaz inhibitörleri Mannitol Barbitüratlar Flavonoidler...

**Antioksidanlar dört farklı mekanizma kullanarak etki ederler:**

(1) *Çöpçü etki (Scavenging effect)* : Oksidanları tutarak zayıf bir molekül haline getirip etkisizleştirmedir (dogal antioksidan enzimler, trakeobronsiyal mukus ve küçük moleküller ).

(2) *Söndürücü etki (Quencher effect)* : Serbest radikallerle reaksiyona girerek bir hidrojen aktarmak suretiyle aktivitelerinin söndürülerek inaktif hale getirilmesidir (Vitaminler, flavonoidler).

(3) *Onarım etkisi (Repair effect)*: Serbest radikallerin hasar verdiği biomoleküllerin birikip hücre metabolizmasına ve viabilitesine hasar vermeden önce temizlenmesidir.

(4) *Zincir kırıcı etki (Chain breaking effect)* : Hemoglobin, seruloplazmin, ağır mineraller, oksidanları bağlar ve zincirlerini kırar (18,136).

Oluşan ROS' a karşı organizma kendini korumak için süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimlerini kullanır. Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit radikalinin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler. Katalaz hidrojen peroksidi parçalar. Glutasyon peroksidaz enzimi ise redükte glutasyonu kullanarak hidrojen peroksiti parçalar.

Hücre membranında bulunan en önemli zincir antioksidan  $\alpha$ -tokoferoldür. Lipid peroksil radikaliyle etkileşerek lipid zincir reaksiyonunu sonlandırır.  $\alpha$ -tokoferol

yanında yine önemli antioksidanlar olarak askorbik asit,  $\beta$ -karoten, likopen ve retinol stearat sayılabilir (137,140).

**Tablo 4.** Major antioksidanların yapısı ve etkisi

ANTIOKSİDAN	YAPISI	YERİ	ETKİSİ
SOD	CuZn-SOD Mn-SOD Cu-SOD	Sitozol-nükleus Mitokondri Plazma	$O_2^{\bullet}$ 'in $H_2O_2$ 'ye dismutasyonu
KATALAZ	Tetramerik Hemoprotein	Peroksizomlar	$H_2O_2$ 'nin dismutasyonu
GSH PEROKSİDAZ	Selenoprotein	Sitozol-mitokondri	$H_2O_2$ 've lipit peroksitlerin redüksiyonu
GSH REDÜKTAZ	Dimerik Protein	Sitozol-mitokondri	GSSG'ninGSH'ya dönüşümü
VİTAMİN E	Yağda eriyen vit.	Lipit membranlar Ekstrasellüler sıvılar	Lipit peroksitleri inaktivasyonu peroksidasyon zincirinin kırılması
VİTAMİN C	Suda eriyen vit.	Hücre içi-dışı sıvılar	$O_2^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ indirekt scavengeri, Vit E rejenerasyonu
GSH	Tripeptid	Hücre içi ve alveoller	$O_2^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ 'e direkt etkili enzimler için substrat

Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest ve reaktif oksijen radikalleri üretilir. Serbest radikaller hücrelerde membran lipidleri, proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerine çok sayıda farklı moleküller yoluyla oksidatif hasara neden olurlar (15).

#### 2.4.5. ROS ve Reprodüktif Sistem

**Kadın Reprodüktif Sistemi ve ROS:** Oksidatif stres, aşırı ROS üretimi veya antioksidan savunma mekanizmasının hasara uğraması sonucunda ortaya çıkar (141). Oksidatif stres memelilerdeki tüm hücrelerde hasara yol açar. Oksidatif stresin dişi üreme sistemi üzerindeki etkisi çok az araştırılmış bir konudur. Agarwal ve ark. yaptıkları çalışmalarında, peritoneal sıvılardaki ROS seviyeleri ile farklı dişi infertilite problemleri arasındaki ilişkiyi tanımlamaya çalışmışlardır (142). Endometriyozis ve idiopatik infertilite olgularının peritoneal sıvılarında ROS saptamışlardır. Endometriyozis ve kontrol gurubu olguları arasındaki ROS seviyesinin farklılığı anlamlı

olmadığı halde, idiopatik infertilite olguları ile kontrol grubu arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur. Bu bulgular, ROS' un idiopatik infertilitede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Başka bir çalışmada, foliküler sıvıdaki ROS seviyeleri ile oosit matürasyonu ve gebelik arasındaki ilişki araştırılmıştır (143). Araştırmacılar foliküler sıvı ROS seviyelerinin yardımcı üreme tekniklerindeki başarıyı öngörmeye kullanılabilecek potansiyel bir belirteç olduğunu bildirmişlerdir.

Jozwick ve ark. serum ve pre-ovuluar foliküler sıvıdaki oksidatif stres belirteçlerinin seviyelerini karşılaştırmışlar ve foliküler sıvıda daha düşük düzeylerin bulunduğunu bulmuşlardır. Çalışmalarında gebe ve gebe olmayan kadınların foliküler sıvılarındaki ROS seviyeleri arasında hiçbir anlamlı farklılık bulunmamıştır. Fertilizasyon oranı ile ROS seviyeleri arasında da ilişki bulunmadığını saptamışlardır (144). Oyawoye ve ark. IVF vakalarında foliküler sıvıda ROS seviyelerini araştırmışlar ve başarılı şekilde fertilize ve transfer edilen oositlerdeki oksidatif stres belirteci seviyelerinin, belirgin şekilde düşük olduğunu bildirmişler ve ROS' un dişi üreme sisteminde önemli bir role sahip olduğunu ifade etmişlerdir (145).

Uterustaki ROS üretimi, steroid hormonların varlığı ile ilişkilidir. Uterusta estradiol, peroksidaz aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Peroksidazların etkili bir bakterisidal çevre oluşturduğu ve estrogen düzeylerinin kontrolüne etki yaptığı düşünülmektedir. Peroksidazlar  $H_2O_2$  'yi substrat olarak kullanmaktadır.  $H_2O_2$  düzeyleri ise in vitro şartlarda estrogen varlığında artış göstermektedir.  $H_2O_2$  'nin hem enzimatik hem de non enzimatik yollarla prostaglandinlerin üretiminde, doğum eyleminde ve prematür eylemde rolü olabileceği düşünülmektedir (146,147,148).

Süperoksit dismutaz (SOD)'ın ovülasyonda rolü olduğu da düşünülmektedir. Ayrıca ROS' un fosfolipazları aktive ederek ovülasyon için gerekli olan prostaglandin sentezine katkıda bulunduğu ve bunun yanında  $H_2O_2$  'nin foliküler atrezi gelişiminde rolü olabileceği sanılmaktadır (149,150). Foliküldeki peroksidasyon yoğunluğu serumdan çok daha düşük seviyede gözükmekte olup oosit çevresinde etkili bir antioksidan savunmasının bulunduğuna işaret etmektedir (144). Folikül sıvısında biriken östrojenlerin de antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu düşünülmektedir

(151). Ayrıca folikül sıvısında glutatyon peroksidaz aktivitesi yüksekliği ile oosit fertilizasyon oranı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (152).

Gametlerin tuba uterinadaki fertilizasyon sahasında maruz kaldıkları oksidatif stres derecesi veya insan embriyosunun tüpten uterin implantasyon sahasına ilerlerken karşılaştığı oksidatif stres derecesi henüz tanımlanmamıştır; çünkü henüz bu çevredeki gerçek antioksidan durumu bilinmemektedir (24).

Korpus luteum memelilerdeki progesteron üretiminden ve erken gebeliğin idamesinden sorumludur. Ovaryan dokudaki ROS üretiminin sonucu olarak luteal hücre plazma membranı içinde lipit peroksidasyonu olur. Bu durum gonadotropin reseptörlerinin gözle görülür kaybı, siklik AMP oluşumunda azalma ve regresyon fazında korpus luteumun steroidogenez yeteneğinin azalmasıyla da birliktelik gösterir (153,154).

Kadınlarda oral antioksidan tedavi ile ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Erkeklerde olduğu gibi oral antioksidanların overe, folikül sıvısına, tuba uterinaya ulaşım ulaşmadığı net değildir. Bununla birlikte, nikotin metabolitlerini kapsayan toksik maddelerin bu bölgelere ulaştığı bilinmektedir. Böylece foliküler savunmanın aşıldığı optimal ilaç ve dozlar bilinmemesine rağmen antioksidan tedavi ile kompanse edilen belirli şartların varlığı öne sürülebilir (24). Reprodüktif anlamda oral antioksidanların güvenli doz eşiği bilinmemektedir. Yüksek dozlardaki retinoitler embriyotoksik olabilirler ve nöral oluk veya tüp, kas iskelet sistemi ve ürogenital anomalilere yol açan teratojenik etkiler gösterebilirler. Yüksek dozlardaki askorbik asit, ovaryan steroidogenezin inhibisyonuyla birliktelik gösterir (24). ROS' un endometrioste rolü olabileceği ve ayrıca ileri evrelerinde azalmış fertilité ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir (155).

## **2.5. E VİTAMİNİ**

E vitamini ilk kez 1972 yılında Evans ve Bishop tarafından bulunmuştur. Esansiyel ve yağda eriyen bir vitamindir. Vitamin E, alfa, beta, gamma ve delta tokoferoller ile



tokotrienollerden oluşan 8 ayrı maddenin grup adıdır. Alfa tokoferol en yüksek biyolojik aktivitesi olan vit E bileşimidir (156,157,158). Reaktif oksijen partiküllerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücut tarafından antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Alfa tokoferol ( E vitamini) biyolojik membranlarda bulunan yağda çözünen ve zincir kırıcı özelliği olan en önemli antioksidandır (19,159,160).

E vitamini, insan dokusunda etkisini erken dönemde serbest radikalleri bağlayarak, hücre membranlarının korunması ile etki göstermektedir. Membran fonksiyonu ve yapısında önemli rol oynayan E vitamini hücre membranındaki doymamış yağ asitlerini koruma özelliğindedir. Vitamin E'nin alımı immün cevabı güçlendirmektedir. Trombositlerin siklooksijenaz aktivitesini azaltarak trombosit agregasyonunu düzenler. Ayrıca nükleik asid ve protein metabolizmasında, mitokondrial fonksiyonlar ve hormonal üretimde rolü olduğu gösterilmiştir. Vitamin E, Glutatyon peroksidaz enziminin bir parçası olan selenyumun kaybedilmemesinde ve vücutta A vitamininin parçalanmasının engellenmesinde de önemli rol oynar (161,162).

Hayvan çalışmalarında E vitamininin, anti kanserojen etkileri ile kanser hücrelerini seçici biçimde tahrip ederek, kanser oluşma sıklığını ve gelişimini azalttıkları bildirilmiştir (163).

E vitamininin trombosit kümelenmesini azalttığı ve trombosit kümelenmesini artıran prostaglandinlerin yapımını inhibe ettiği gözlenmiştir. Vitamin E aynı zamanda prostasiklin yapımını arttırmaktadır. Trombositler üzerine olan etkisi ile, ateroskleroz geliştirme eğilimini azaltmaya yardımcı olabilmektedir (164,165).

E vitamininin deney hayvanlarında beyin, omurilik, kalp, ve karaciğer gibi organlardaki iskemik doku hasarını önlediği gösterilmiştir (166). E vitamini ve diğer antioksidanların koroner kalp hastalığında önemli düzeyde koruyucu ajanlar olduğu gösterilmiştir (167).

Serbest radikallerin yaşlanma üzerine etkilerini, yeterli bir antioksidan koruması için optimal antioksidan alınımı ile engelleyerek, uzun ve sağlıklı bir hayat sağlayabileceğini gösteren araştırmalar vardır. Kan akımı ölçümlerinde, antioksidan

alan olguların beyinlerinde kan akımının arttığı gözlenmiştir. E vitamini alımının katarakt oluşumunu engellemediği ancak başlamasını ve gelişimini yavaşlattığını düşündürülen bulgular vardır (168,169,170).

### **2.5.1. Vitamin E'nin Emilimi ve Taşınması**

Vitamin E intestinal yağ absorpsiyonu ile beraber absorbe olmaktadır. Tokoferol barsaklardan emilerek lenfatik sisteme ulaşır ve şilomikronların bir komponenti olarak kana geçerek, düşük dansiteli lipoprotein şeklinde taşınır. E vitamini emilimi, yağ emiliminin düzeyi ile doğrudan ilişkilidir (156,171).  $\alpha$ -tokoferol (%87) insan plazmasındaki en önemli tokoferoldür. Özellikle adipoz doku, adrenal, hipofiz, testis, trombositler, kalp dokusu, kas, karaciğer, over, uterusu yüksek miktarlarda bulunur. Normal populasyonda plazma düzeyi 0,5-1,6 mg/dl 'dir (172,173).

### **2.5.2. Vitamin E Eksikliği**

Normal sindirim, emilim veya diyetle alınan yağın taşınması gibi fizyolojik durumlarda serum E vitamini düzeyleri düşmektedir (Çölyak, bilier atrezi, kistik fibrozis, abetalipoproteinemi, intestinal rezeksiyon v.b.). Kronik malabsorpsiyon sendromu vakalarında, prematüre bebeklerde ve total parenteral beslenme tedavisi görenlerde dışardan E vitamini desteği yapılmalıdır. Eksikliğinde platelet agregasyonun artması, kanser, ateroskleroz, Alzheimer, Parkinson, kardiovasküler, nöromusküler disfonksiyon ortaya çıkabilmektedir (19,172,173,174,175).

### **2.5.3. Vitamin E Toksisitesi**

Kronik olarak yüksek dozlarda alındığında özellikle trombositlerin adezyon ve agregasyonunu azaltarak, K vitaminine bağlı pıhtılaşma faktörlerinin inhibisyonu ile toksisite görülebilmektedir (176,177).

#### **2.5.4. Vitamin E Kaynakları**

Özellikle soya, ayçiçeği, mısır, fındık yağları gibi bitkisel yağlar ve tahıllar E vitamini açısından zengindir. Sentetik E vitamini ise rasemik alfa-tokoferol veya dl-alfa-tokoferol stereoisomerlerin bir karışımı olup trimetilhidrokinon'un (TMHQ) izofital ile kimyasal olarak birleşmesi ile elde edilir. E vitamini eksikliği genel olarak plazma E vitamini düzeyleri 0,5 mg/dl'den düşük olan bireylerde söz konusudur. Diyetle alınan günlük 10-30 mg E vitamini, serum düzeylerinin normal sınırlarda tutulması için yeterlidir (172,173,178).

#### **2.5.5. E Vitamini Antioksidan Özelliği**

E vitamini predominant olarak yağ dokusunda bulunmakla birlikte plazma, eritrosit, trombosit gibi pek çok yerde birikebilir. E vitamini peroksitlenmiş poliansatüre yağ asidinin peroksil serbest radikaline, hidrojen transfer ederek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu kırmaktadır. Eritrosit membranını  $H_2O_2$ ' ye karşı korur. Lökositlerde araşidonik asitin lipooksijenasyonunu yönlendirir. Akut dönemde lipit peroksidasyonu ile açığa çıkan peroksilipit, lipofilik özelliğinden dolayı membranda erimiş halde bulunan vitamin E ile reaksiyona girer. Glutasyon, lipit hidroperoksit ile reaksiyona girerek onu etkisiz hale getirir (171,176,179). Düzeyi artan lipithidroperoksit, serbestleşen  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ , ile reaksiyona girerek daha güçlü radikallere dönüşebilmektedir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

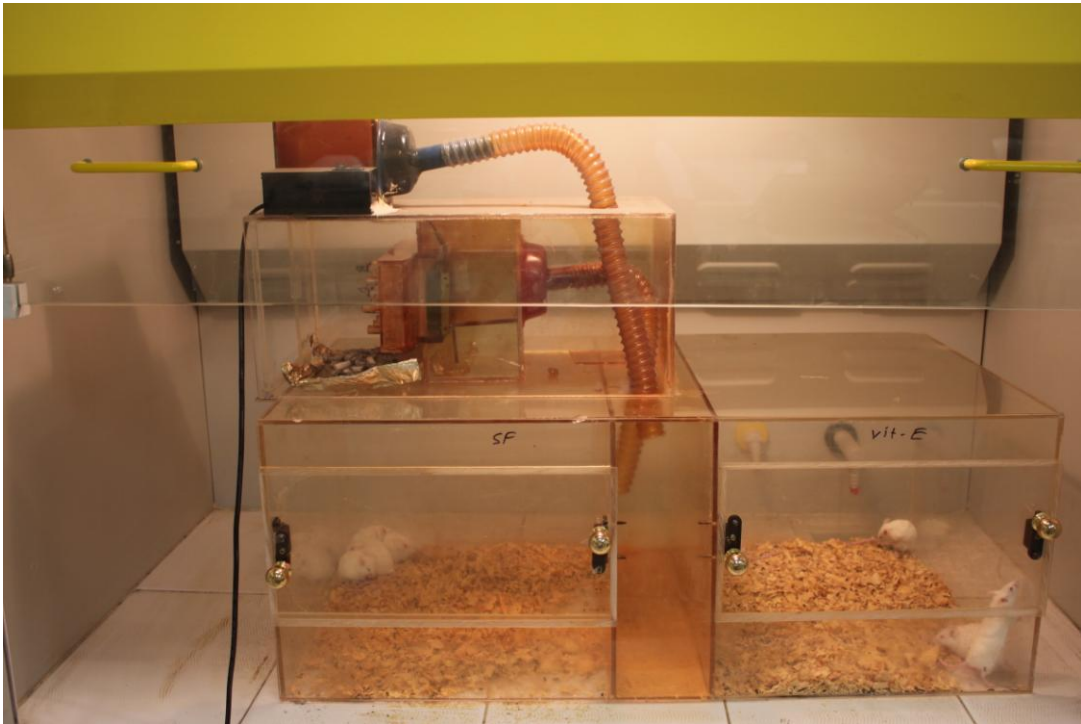
Çalışma, Fatih Üniversitesi desteği ile Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan onay alınarak yapıldı (Proje Numarası: P53011017). Deney için 12-14 haftalık swiss albino cinsi, ortalama ağırlıkları  $25,19 \pm 4,34$  gr. olan fareler seçildi. Fareler, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, GÜDAM' dan temin edildi. Çalışmada 18 dişi, dişi fareleri çiftleştirmek için ise 12 erkek fare kullanıldı. Deney süresi 10 hafta idi. Dişi fareler 6 şarlı gruplar halinde ayrı kafeslerde tutularak üç deney grubu oluşturuldu.

Deney Grupları:

A grubu : Kontrol dişi fareler (n=6)

B grubu : Sigara dumanına maruz bırakılan dişi fareler (n=6)

C grubu : Sigara dumanı ile beraber antioksidan (Vitamin E ) verilen dişi fareler (n=6)



**Sekil. 3.1.** Fareleri sigara dumanına maruz bıraktığımız kafesin görünümü

Deney hayvanlarını kafesleri ile beraber içine yerleştirmek ve sigara dumanına maruz bırakmak amacıyla, 150X120X80 cm boyutlarında şeffaf plastikten, ön tarafında 2 adet kapağı ve 15X15 cm boyutlarında penceresi (açılıp kapanabilir) bulunan, pencerenin iç tarafında 20X10 cm boyutlarında bölmesi bulunan (kül tablası ve sigara makinasını yerleştirmek için), tabanında da 3 cm çaplı 15 adet deliği bulunan yan yana 2 adet kafes yapıldı. Kafeslerin tabanına açılan deliklerle fazla olan sigara dumanının dışarıya yönlenmesi sağlandı. Böylece ortamdaki sigara dumanı miktarının aşırı değişimi engellendi.

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

A kafesi, 10 hafta süreyle sigara dumanına maruz bırakıldı. A kafesinin pencere bölümünün arkasında bulunan bölmeye kül tablası ve sigara makinesi yerleştirildi. Her gün saat 09.00' da başlayarak 20 dk aralarla sigara yakılarak sigara makinesine konuldu. Böylece A kafesinde bulunan fareler günlük olarak, 10 hafta süresince 20 sigara/gün sigara dumanına maruz bırakıldılar. Antioksidan (vitamin E) alması planlanan deney hayvanlarına her gün aynı saatte (st:15.40) başlayarak 50 mg/kg'dan intraperitoneal (i.p.) E vitamini (Evigen, Aksu Farma; 300 mg dl-Alfa Tokoferol Asetat) enjeksiyonu yapıldı. Diğer gruplara aynı dozda %0.9 NaCl intraperitoneal (i.p) enjeksiyon yapıldı. 10 hafta sonunda 12 adet erkek swiss albino cinsi fare çiftleştirilmede kullanıldı. Dişi farelerden smear alınarak implantasyon için uygun siklus günü belirlendi. Yüksek doz alfamin-alfazin kullanılarak farelere ötenazi uygulandı.



**Şekil 3.2.** Yüksek doz anestezi ile ötenazi uygulanmış swiss albino fareler

Laparotomi yapılarak uterusları çıkarıldı.



**Şekil 3.3.** Laparotomi ile farelerin uteruslarının çıkarılması



**Şekil 3.4.** Swiss albino cinsi farelerin uterusu

Endometrial pinopod üzerine etkinin elektron mikroskobu ile değerlendirilmesi Gazi Üniversitesi Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalında yapıldı.

Farelere intraperitoneal E vitamini ve serum fizyolojik enjeksiyonu için bu maddeler uygun dozlarda PPD enjektörlerine çekilerek hazırlandı. Yardımcı tarafından fare ense ve kuyruğundan karın kısmı yukarı gelecek şekilde tutuldu. Barsaklara zarar vermemek amacıyla penset yardımıyla cilt yukarı kaldırılarak 45° açıyla enjeksiyon yapıldı.

Sigara makinesi şeffaf renkte 2 bölmeli plastikten yapıldı. Makinenin ortasında duracak şekilde bir fan yerleştirildi. Gövde kısmına dikdörtgen şeklinde sigaraların yerleştirileceği bir aparat takıldı. Böylece yakılan sigaranın fan yardımıyla ortama verilmesi sağlanmış oldu.

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

## Elektron Mikroskopik Yöntem

Tespit:

Sorenson' un fosfat solüsyonu:

Sol. A: Potasyum fosfat monobazik ( $KH_2PO_4$ )..... 0.098gr

Distile su..... 100ml

Sol. B: Sodyum fosfat dibazik ( $Na_2HPO_4 \cdot 4.2H_2O$ )..... 1.188gr

Distile su..... 100ml

18.2ml Sol. A + 81.8ml Sol. B = 100ml (pH: 7.4)

### **Gluteraldehit tespit solüsyonunun hazırlanması:**

9.2cc Sorenson fosfat tamponu + 0.8cc Gluteraldehit = 10cc

Dokular, bu solüsyona 30 dakika etkin bırakılıp sertleşmeleri sağlandıktan sonra, 1mm küplük parçalara bölünüp ve 1 saat daha gluteraldehit solüsyonunda bekletilerek ilk tespitleri sağlandı.

Osmiyum Tetroksit tespiti:

Osmiyum tetroksit ( $OsO_4$ )..... 0.1gr

Distile su.....5cc

Bir kısım Sorenson fosfat tamponu + Bir kısım osmiyum tetroksit

Dokular bu şekilde hazırlanmış %1 'lik osmiyum tetroksit solüsyonuna 1 saat etkin bırakıldılar. Böylece tespitleri ve boyanmaları sağlanmış oldu.



### Dehidrasyon ve blok oluşturulması:

Dokular osmiyumla tespitten sonra, fazla suyun uzaklaştırılması için, artan derecelerdeki etil alkol serilerinden geçirildiler.

%50'lik alkol.....	10 dakika
%60'lık alkol.....	10 dakika
%70'lik alkol.....	10 dakika
Uranil asetat.....	30 dakika (1gr uranil asetat + 50ml %80'lik alkol, karışım hazırlandıktan sonra süzülerek 10 dakika bekletildi)
%80 'lik alkol.....	2 kez yıkandı ve 10 dakika bekletildi
%90 'lık alkol.....	10 dakika
%96 'lık alkol.....	10 dakika
%100 'lük alkol.....	15 dakika
Propilen oksit.....	30 dakika
Propilen oksit + gömme materyali.....	30 dakika (gömme materyalinin doku içine geçişi sağlandı)

Daha sonra dokular;

Araldit CY 212.....	10cc
DDSA.....	10cc içinde 1 gece 40°C 'de bekletildiler.

Bir gün sonra,

Gömme materyali:

Araldit CY 212.....	10cc
DDSA.....	10cc
BDMA.....	0.4cc
Dibütil fitalat.....	1cc

Bu karışıma alınan dokular 2 saat rotatörde oda ısısında, 2 saat 40°C 'de etüvde bekletildiler. Son olarak dokular aynı karışım ile 00 numara jelatin kapsüle gömüldüler. Blok içindeki havanın çıkması için 1 saat oda ısısında bekletilen kapsüller, polimerizasyon için 24 saat 45 derecede, 48 saat 60 derecede etüvde bekletildi. Süre sonunda etüv kapatılarak dokular etüv içinde kendi hallerine soğumaya bırakıldılar.

Hazırlanan bloklarda LKB Leica ultramikrotom ile 1µ'luk kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Bilgisayar donanımlı foto-ışık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Germany) ile incelenen kalın kesitler resimlendirildi ve belirlenen bölgeler işaretlenerek formvar kaplı bakır gridler üzerine 0.2-0.5µ'luk ince kesitleri alındı. Alınan kesitler kontrast sağlamak için, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EM 900 elektron mikroskopta değerlendirilerek resimlendirildiler.

### **3.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

İstatistiksel değerlendirme SPSS 15.0 versiyonu ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Veriler normal dağılıma uymadığından sonuçlar median (IQR) şeklinde verildi. Bağımsız verilerin incelenmesinde Kruskal Wallis ve ikili kıyaslamalarda Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi. Yapılan power analizinde alpha 0.05, beta 0.20 ve effect size 0.80 alındığında %80 güç elde etmek için gerekli minimum toplam vaka sayısı 18 olarak hesaplandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. UTERUS ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULARI

Kontrol grubuna ait yarı ince kesitlerde uterus epiteli ve lamina propria ışık mikroskopik düzeyde normal yapılarında izlendi. Yer yer bezlerin, yüzey epiteline benzer bir epitel ile dōşeli olduğu ayırt edildi. Stromada kan damarları yaygın olarak bulunuyordu. İnce kollajen lif demetleri ve arada bağ doku hücreleri dikkati çekti (Şekil 4.1). Elektron mikroskopik düzeyde ise, kontrole ait endometriyum dokusunda prizmatik epitel hücreleri, çekirdek yerleşimleri ve apikal yüz özelleşmeleriyle normal yapılarında belirgin olarak ayırt edildi. Çekirdek genelde bazale yerleşik ve oval biçimliydi, kromatin çekirdek zarı altında yoğunlaşmıştı. Sitoplazmada yuvarlak ya da oval, yoğun matriksli kristalleri ile belirgin mitokondriyonlar izlendi. Kısa yer yer genişlemiş ve içleri az yoğun salgı maddesiyle dolu granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve serbest ribozomlar ayırt ediliyordu. Hücrelerin yan yüzlerden belirgin bağlantı birimleri dikkati çekiyordu. Bunlar bazale yakın intedigitasyonlar şeklindeydi ve apikalde sıkı ve ara bağlantılar birbirlerini izliyordu. Apikal yüzde kısa mikrovilluslar ve yer yer belirgin pinopodlar görüldü. Pinopodlar genelde hücrelerin sitoplazma ve hücre zarlarının yaptığı, ribozomlar dışında organelden yoksun genişlemeler şeklindeydi (Şekil 4.2. A-B,3).

Sigara uygulaması yapılmış gruba ait yarı ince kesitlerde epitel yapısı, ışık mikroskopu düzeyinde kontrole eşdeşti. Lamina propria'da kan damarları gelişkindi ve bez epiteli normal yapıda ayırt edildi (Şekil 4.4). İnce yapı düzeyinde ise epitel hücreleri prizmatik şekilli ve çekirdekler hücre şekliyle uyumluydu. Ancak sitoplazmik yapının oldukça yozlaştığı gözlemlendi. Mitokondriyonlarda şekil bozukluğunun yanı sıra kristalarda silinme ve matrikste açıklık ve mitokondriyal ödem saptandı. Granüllü endoplazmik retikulum tubulusları yer yer geniş, içi az yoğun madde ile dolu olarak görüldü. Bazı alanlarda sekonder lizozomlar da ilgiyi çekiyordu. Hücre yan yüz özelleşmeleri kontrole benzerdi ancak mikrovillusların yer yer birbirleri ile birleştikleri ve kontrole oranla kısalıp ve kütleştikleri dikkati çekti (Şekil 4.5,6).

Sigara ve E vitamini uygulaması yapılan grubun yarı ince kesitlerinde epitel ve bağ dokusu ışık mikroskopik düzeyde, normal yapıda izlendi. Kan damarı da normal yapılarında izlendi (Şekil 4.7). Elektron mikroskopik değerlendirmede, ince yapı düzeyinde, genel yapının biraz daha kontrol grubuna benzediği görülmesine karşın mitokondriyon yozlaşması, krista kaybı ve ödemi devam ediyordu, lizozom dağılımı, granüllü endoplazmik retikulum genişlemeleri sigara grubuna benziyordu. Hücre yan yüz bağlantıları normaldi, mikrovillus dağılımı sigara grubu ile karşılaştırıldığında biraz daha özgün ancak halen daha geniş kısa ve küttü. Bu grupta mikrovillusların birleşerek pinopodlara benzer yapılar oluşturduğu dikkati çekiyordu (Şekil 4.8,9).

#### 4.2. PİNOPOD SAYISI

Gruplar pinopod sayısı açısından kıyaslandığında tüm gruplar arasında fark olduğu tesbit edildi ( $p < 0.001$ ). Kontrol grubunda yüksek olan pinopod sayısının sigara içen grupta oldukça azaldığı tesbit edildi ( $p = 0.002$ ). Sigara+E vitamini grubunda ise sigara içenlere göre pinopod sayısının anlamlı şekilde fazla olduğu görülürken ( $p = 0.002$ ), kontrol grubundaki pinopod sayısına göre ise oldukça az olduğu gözlemlendi ( $p = 0.002$ ). Gruplara göre pinopod sayılarının dağılımı Tablo 5’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** İstatistiksel analiz

	Kontrol	Sigara	Sigara+E	P değeri
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	
Toplam pinopod sayısı (n)	149±6	11±3	67±4	<0.001*

\*Tüm gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut.

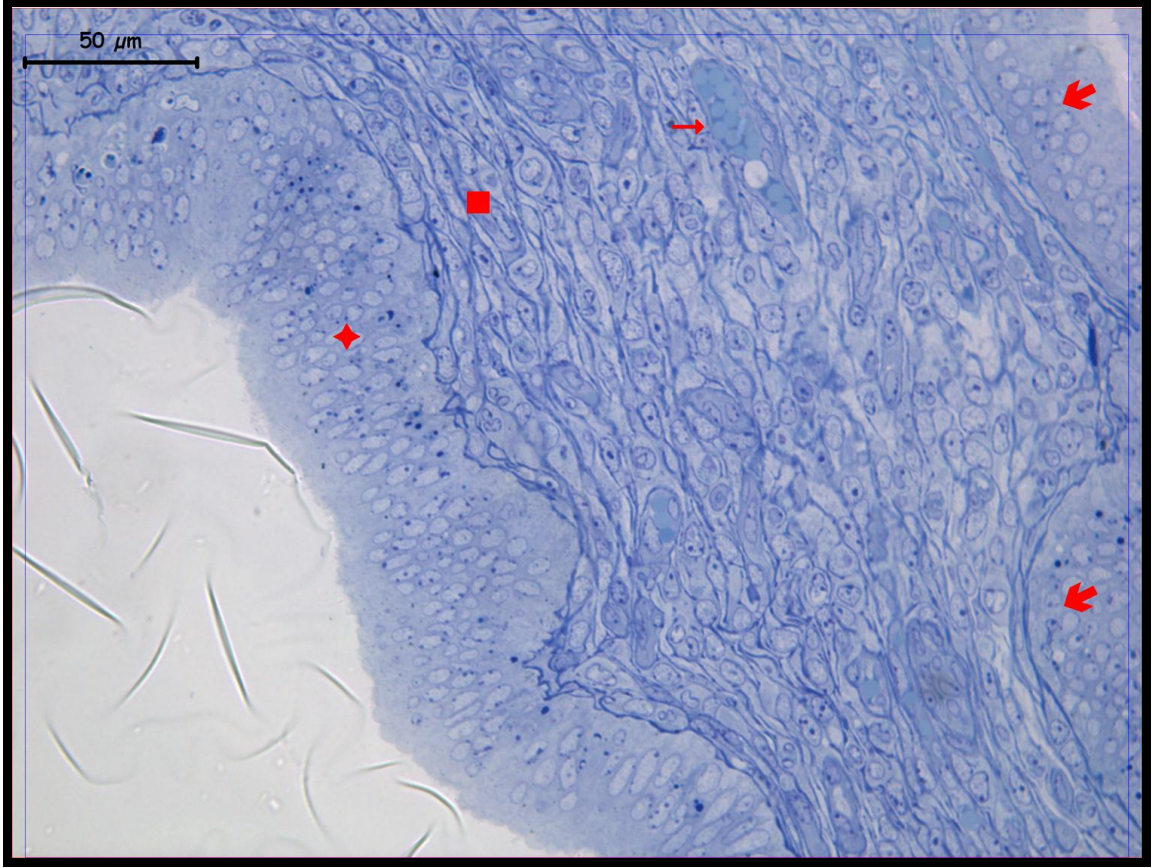
#### 4.3. TUBA UTERİNA ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULARI

Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu yarı ince kesitlerinde, ışık mikroskopik düzeyde, yüzey epitel ve kinosilyalar normal yapıda izlenirken bağ dokunun yer yer

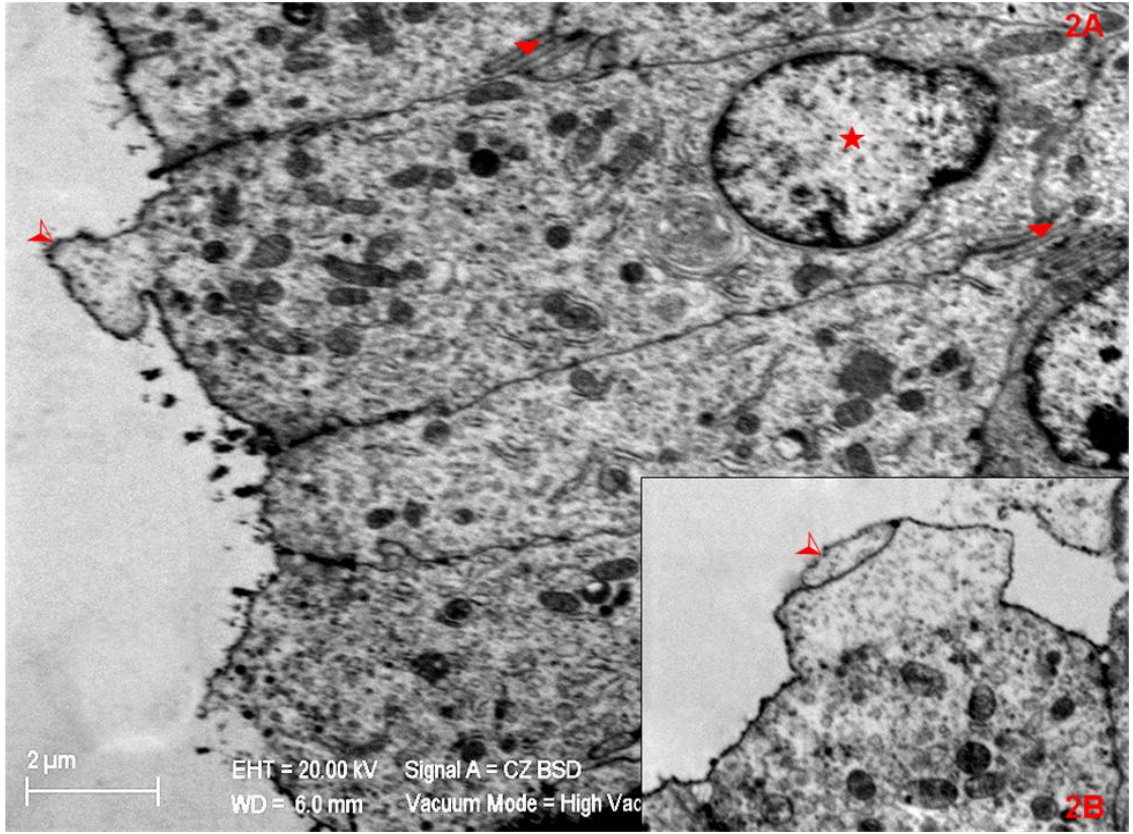
epitel çıkıntılarının içine sokulduğu, lamina propria'da ince kollagen lif demetleri ve bağ doku hücrelerinin belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10). Sigara uygulaması yapılmış gruba ait yarı ince kesitlerde epitel hücrelerinin bazallerinde yaygın, irili ufaklı vakuollerin varlığı ayırt edildi. Lamina propria normal yapı sergiliyordu (Şekil 4.13). Sigara ve E vitamini uygulaması yapılan grubun yarı ince kesitlerinde yapının kontrole eşdeğer olduğu dikkati çekti (Şekil 4.16).

Kontrol grubu, sigara uygulanmış grup, sigara ve E vitamini uygulanmış grupların elektron mikroskopik incelemelerinde ise, tüm grupların birbirleri ile eşdeğer ince yapı özellikleri sergiledikleri izlendi. PEG ve silyalı hücreler, her üç grupta da normal yapıdaydı (Şekil 4.11,4.12,4.14,4.15,4.17,4.18).

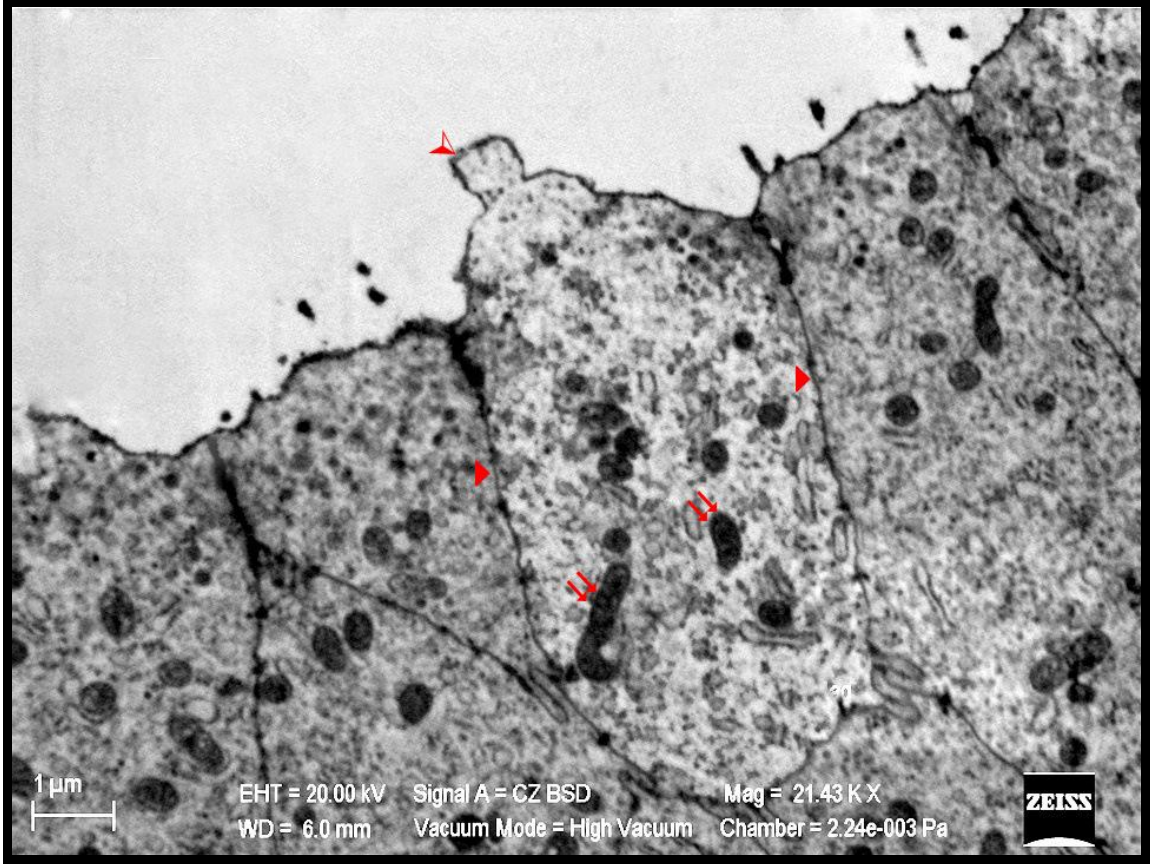
Sonuç olarak, sigara kullanımının uterus'da özellikle epitel üst yüz farklanmalarının yapılarını bozması ve pinopodların oluşumlarını engellemesi nedeniyle implantasyonda başarısızlığa neden olabileceği düşünüldü. Sigara tüketimi ile birlikte E vitamini kullanımının ise pinopod yapısını korumada yetersiz kalması nedeniyle, "bu amaçla" kullanımında yeteri kadar güçlü bir antioksidan olmadığı görüşündeyiz. Bunun tersine, sigara grubunda, tuba uterina yapısında, yarı ince ve ince kesitlerde bir dejenerasyon gözlemediğimiz ve E vitamini ve kontrol grupları ile karşılaştırdığımızda benzer ince yapı özellikleri gördüğümüz için, sigaranın bu organ üzerinde dejeneratif bir etkiye neden olmadığı ve sigara tüketimi nedeniyle gelişebilecek olası bir infertilitenin tuba uterina değilde uterus epitel hasarından kaynaklanabileceği kanısındayız.



**Şekil 4.1.** Kontrol grubuna ait uterus dokusu yarı ince kesitlerinde epitel (◆), lamina propria (■), uterus bezleri (→ ) ve damar (→) yapıları görülüyor (Toluidin mavisi)

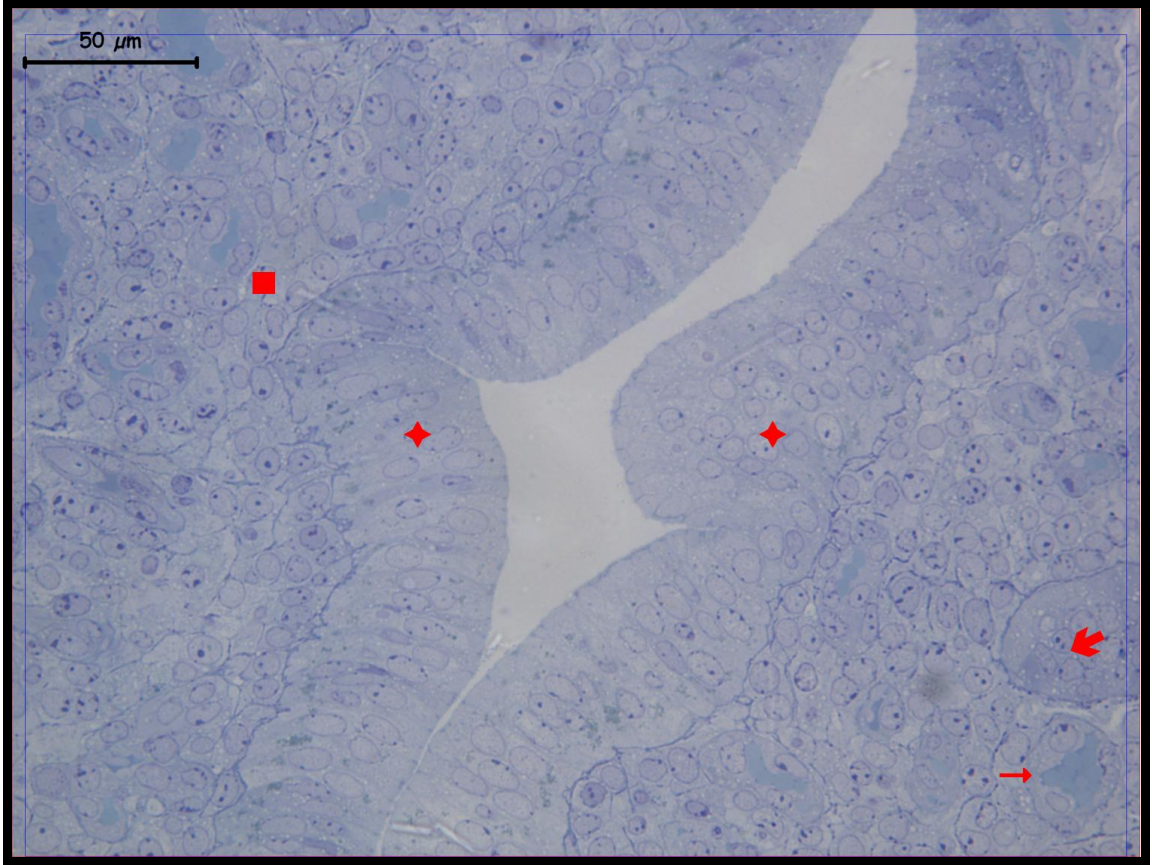


**Şekil 4.2.** A, B: Kontrol grubuna ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitlerinde pinopod (➤), çekirdek (★) ve yan yüz bağlantı birimleri (▸) izleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)

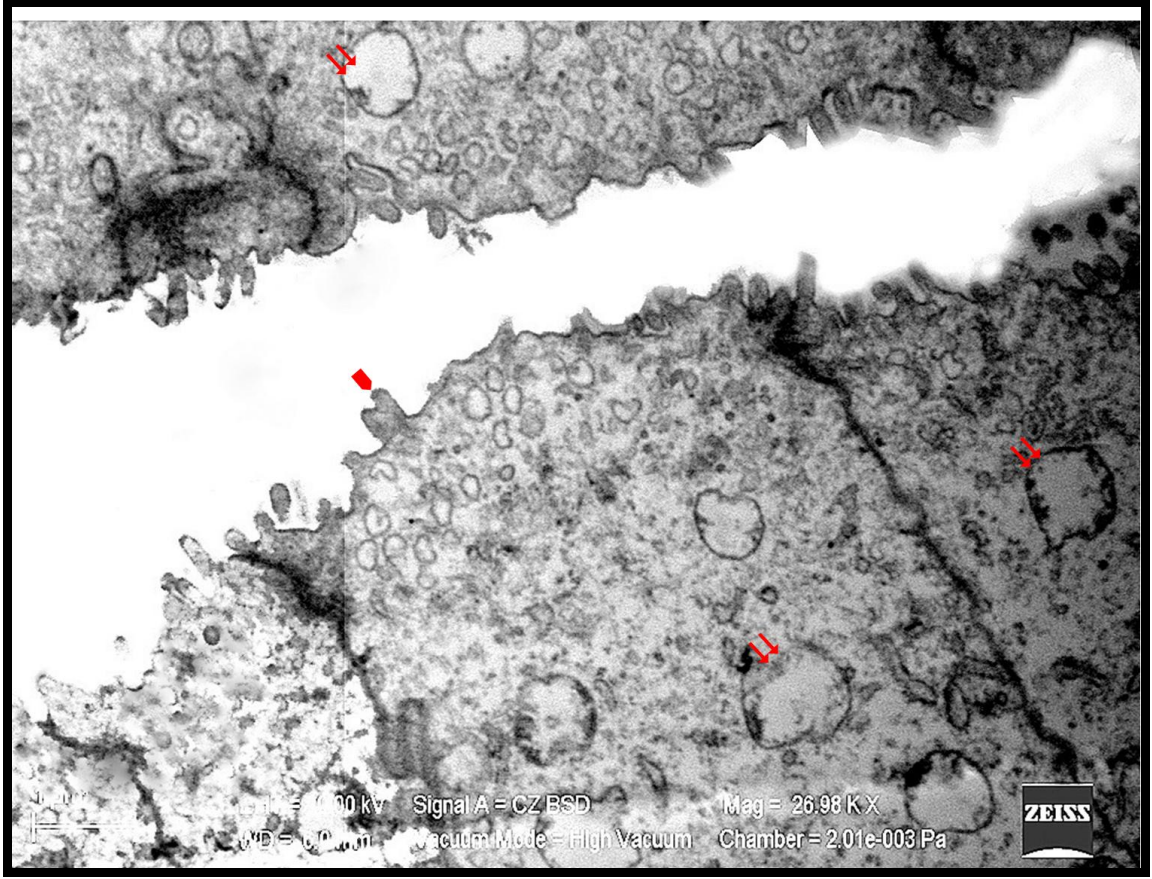


**Şekil 4.3.** Kontrol grubuna ait uterus dokusu elektron mikroskobik kesitlerinde pinopod (➤) yapısı, mitokondriyonlar (⇒) ve yan yüz bağlantı birimleri (▶) görülüyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)

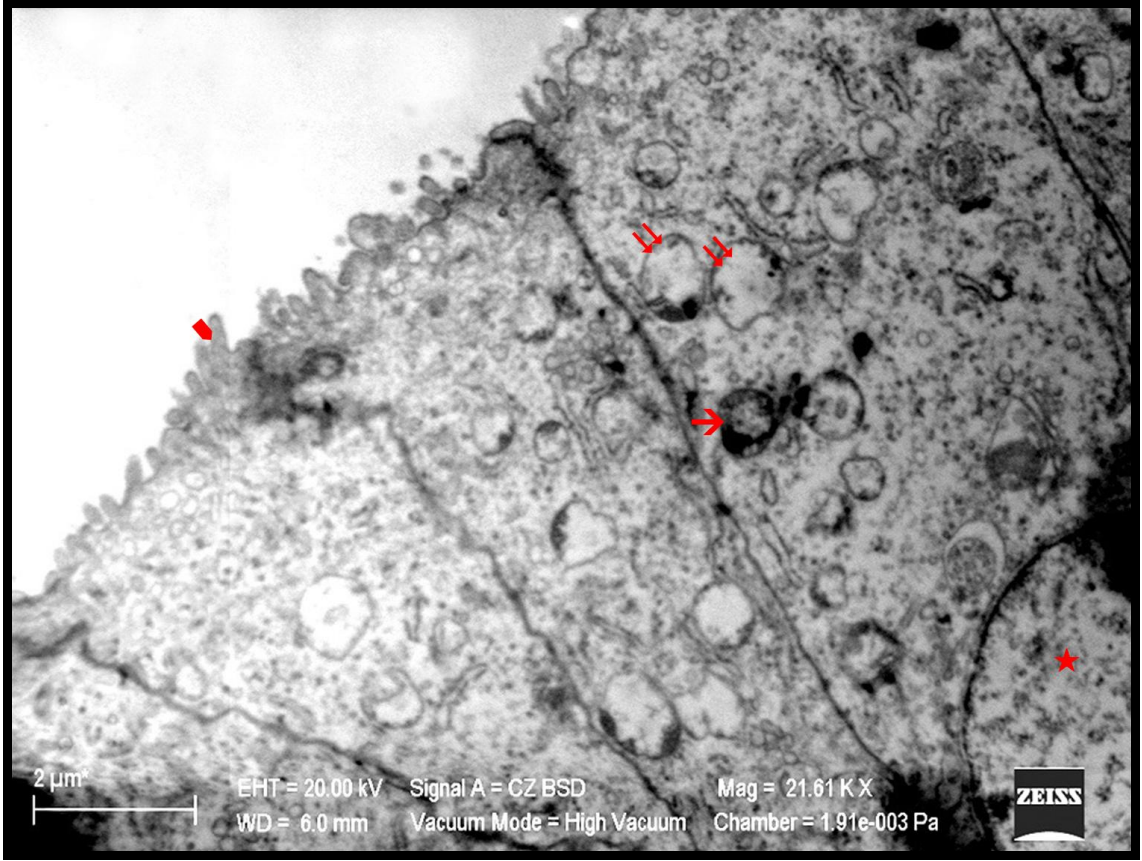




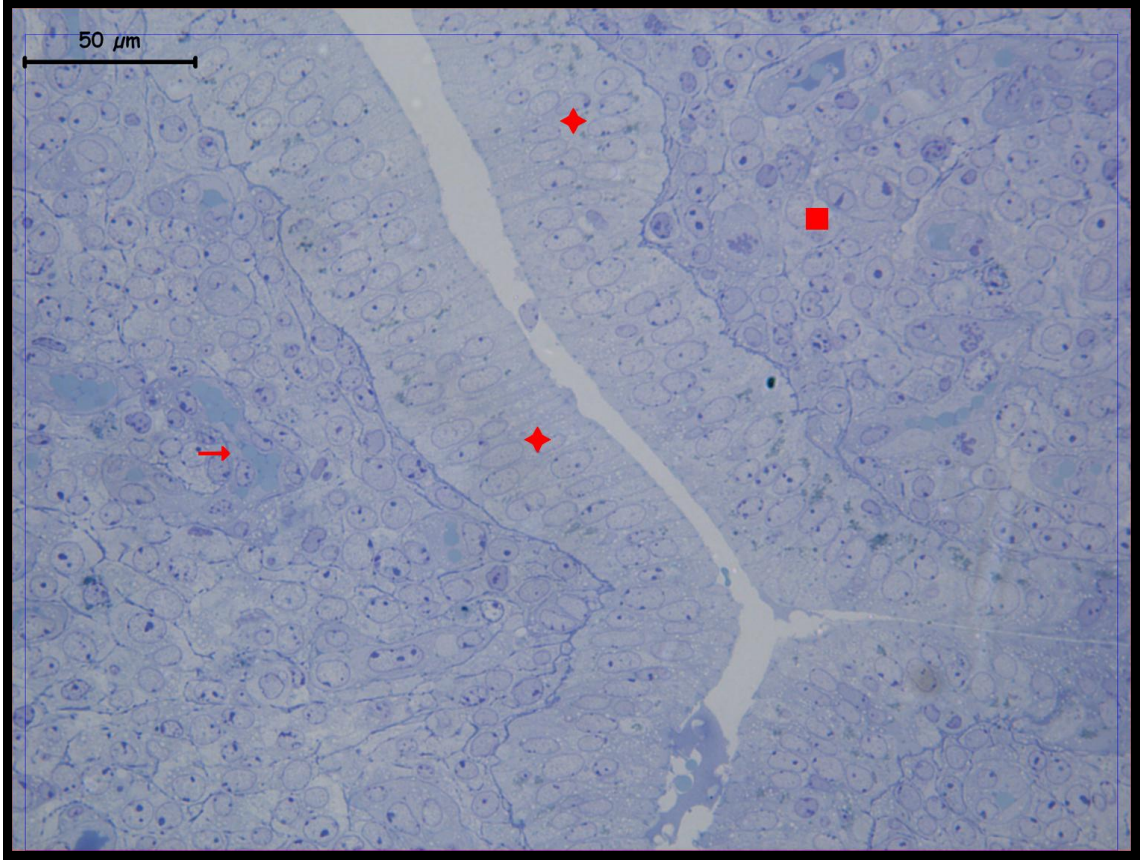
**Şekil 4.4.** Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait uterus dokusu yarı ince kesitlerinde epitel (◆), lamina propria (■), uterus bezleri (➔) ve damar (➔) yapıları görülüyor (Toluidin Mavisi)



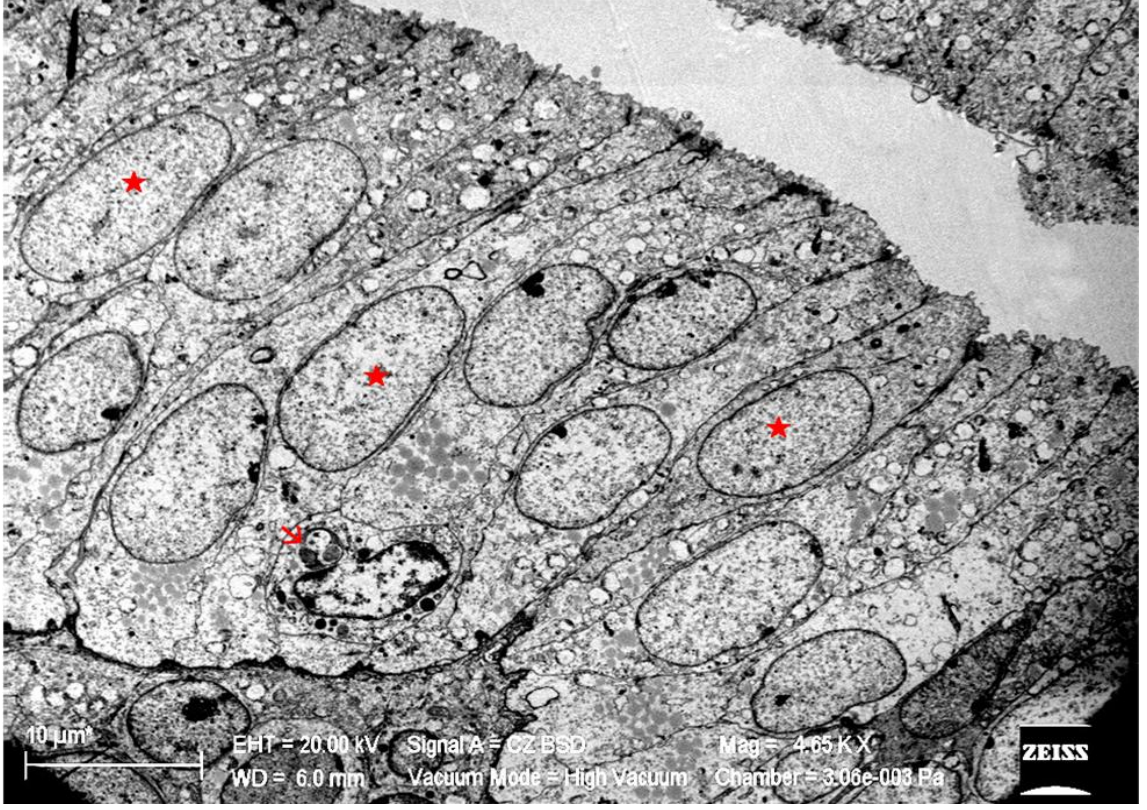
**Şekil 4.5.** Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskobik kesitlerinde mitokondriyon (⇔) ve yer yer birleşmiş mikrovilluslar (➤) görülüyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)



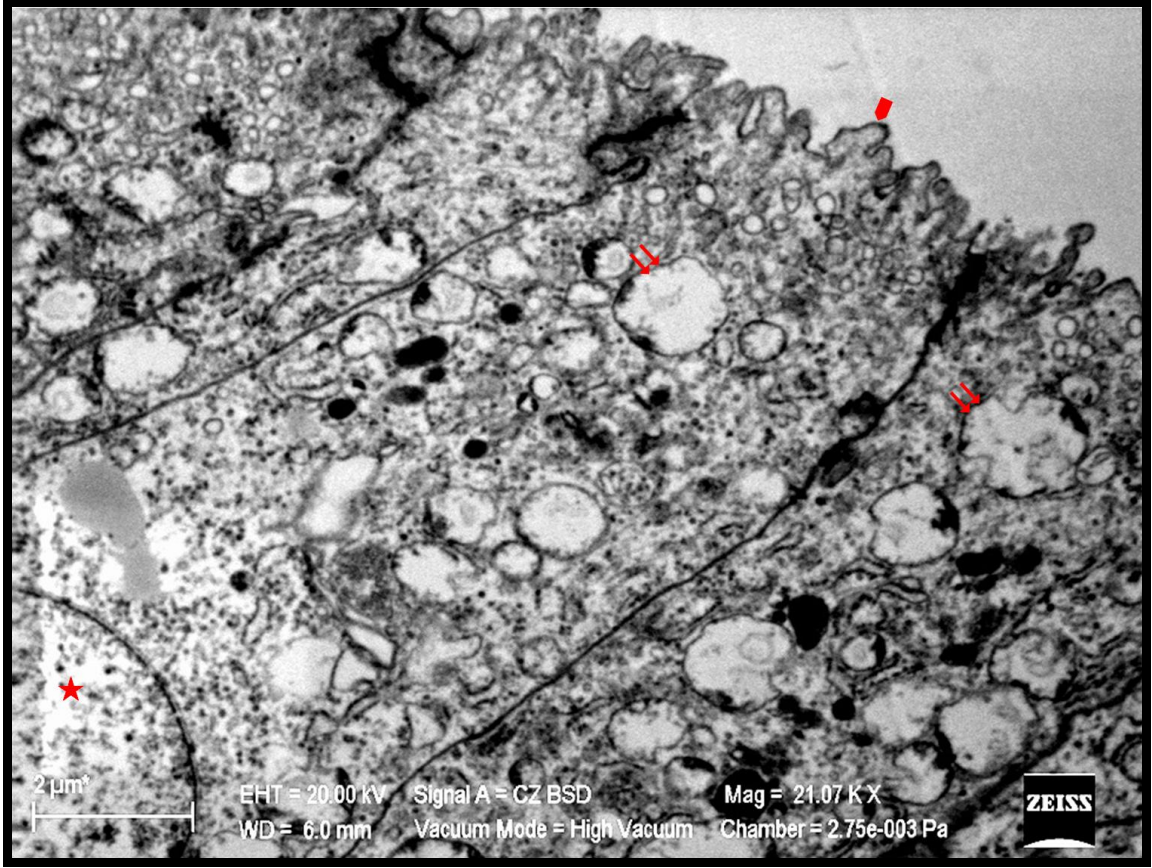
**Şekil 4.6.** Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskobik kesitlerinde mikrovillus (▴), mitokondriyon (⇔), yer yer sekonder lizozom (→) ve çekirdek (★) izleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)



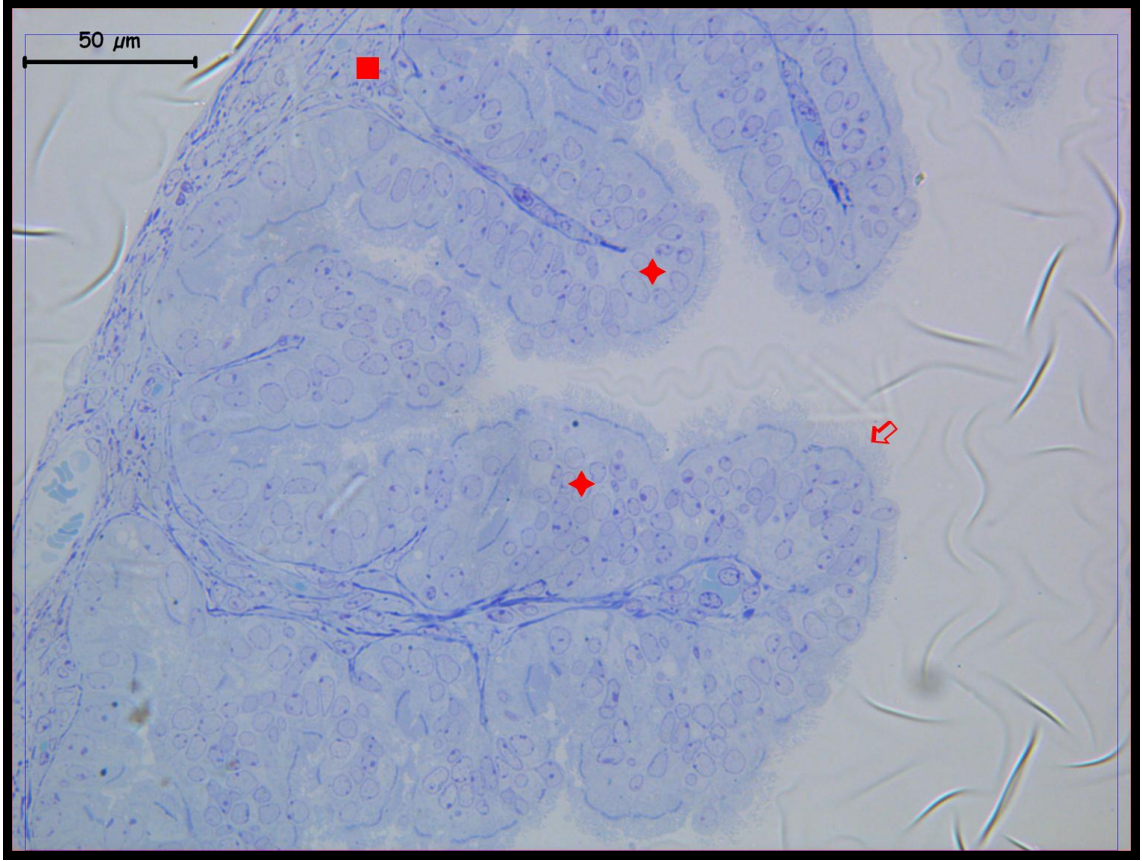
**Şekil 4.7.** Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait uterus dokusu yarı ince kesitlerinde epitel (◆), lamina propria (■) ve damar (→) yapıları görülüyor (Toluidin mavisi)



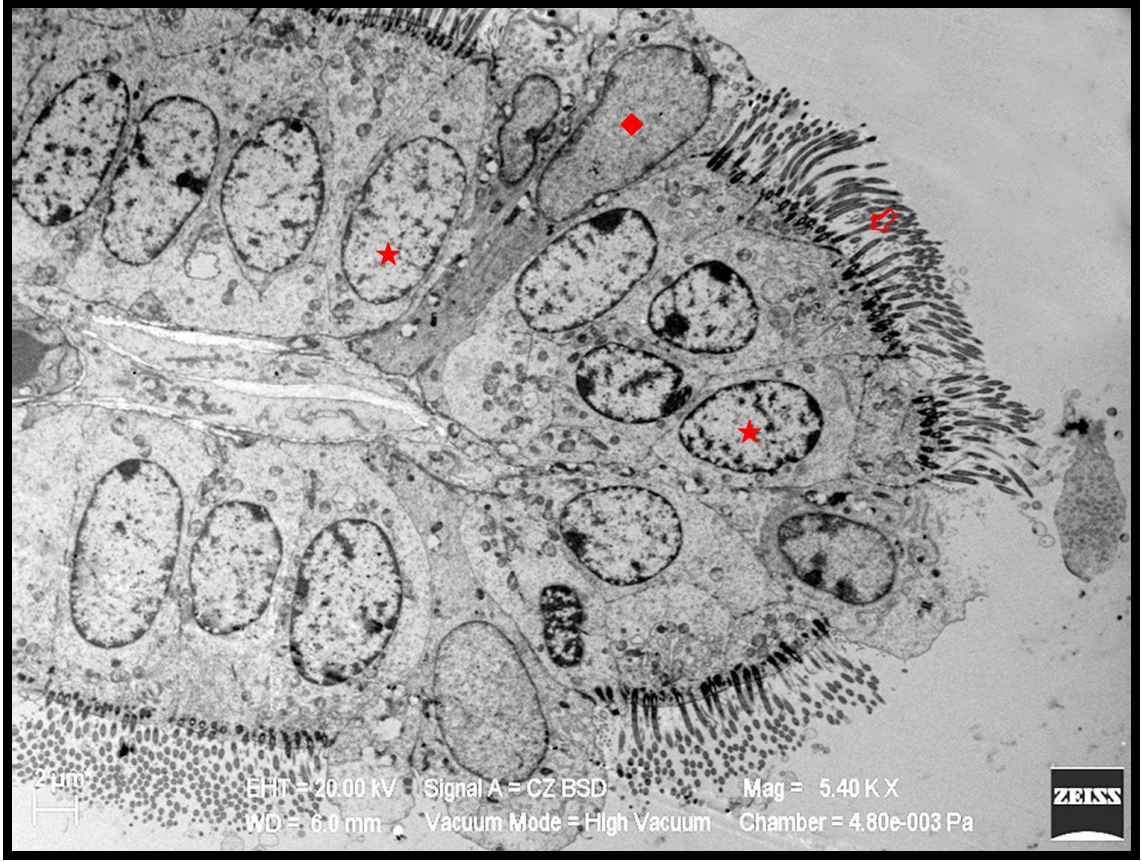
**Şekil 4.8.** Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitlerinde çekirdek (★) ve lizozomlar (→) izleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)



**Şekil 4.9.** Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait uterus dokusu elektron mikroskopik kesitlerinde mikrovillus (▀), mitokondriyon (⇔) ve çekirdek (★) izleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)

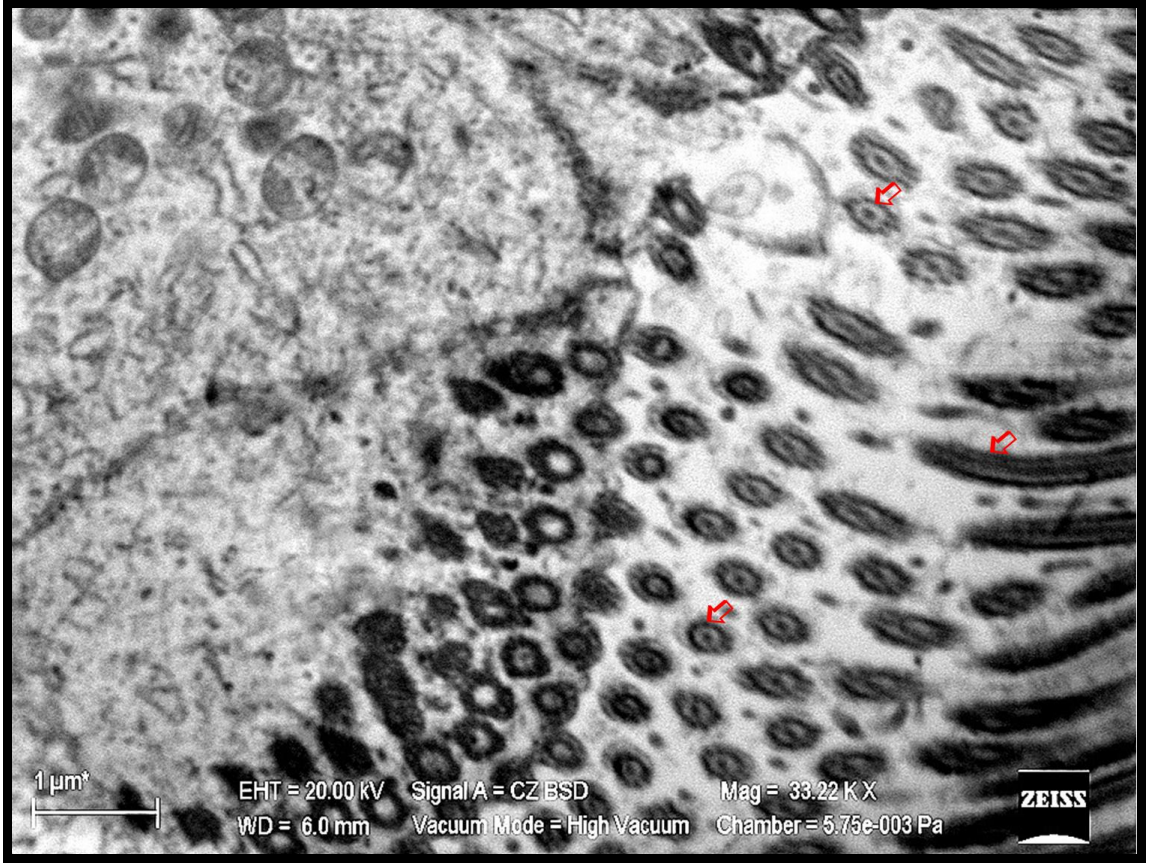


**Şekil 4.10.** Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu yarı ince kesitlerinde epitel (◆), lamina propria (■) ve kinosilya (⇒) yapıları görülüyor (Toluidin mavisi).

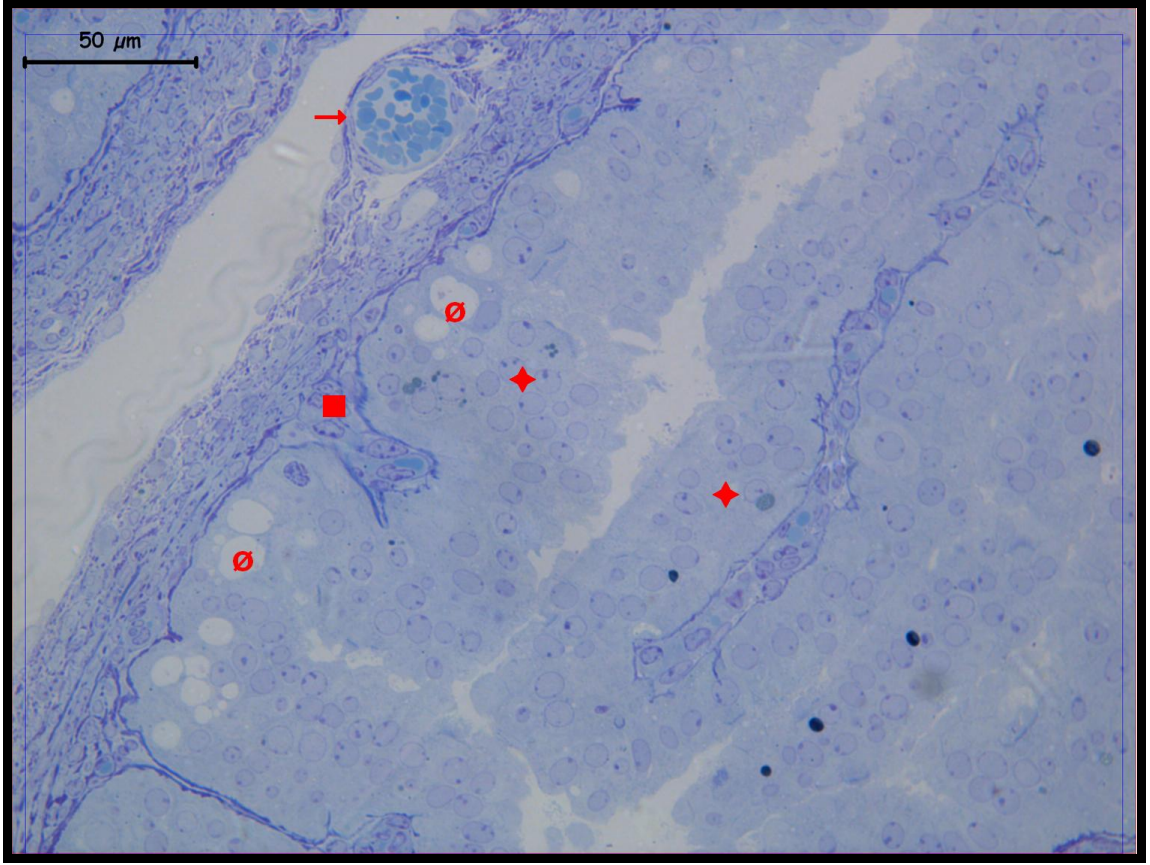


**Şekil 4.11.** Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu elektron mikroskobik kesitlerinde silyalı hücre çekirdeği (★), silyasız hücre çekirdeği (◆) ve silyalar (⇒) izleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)





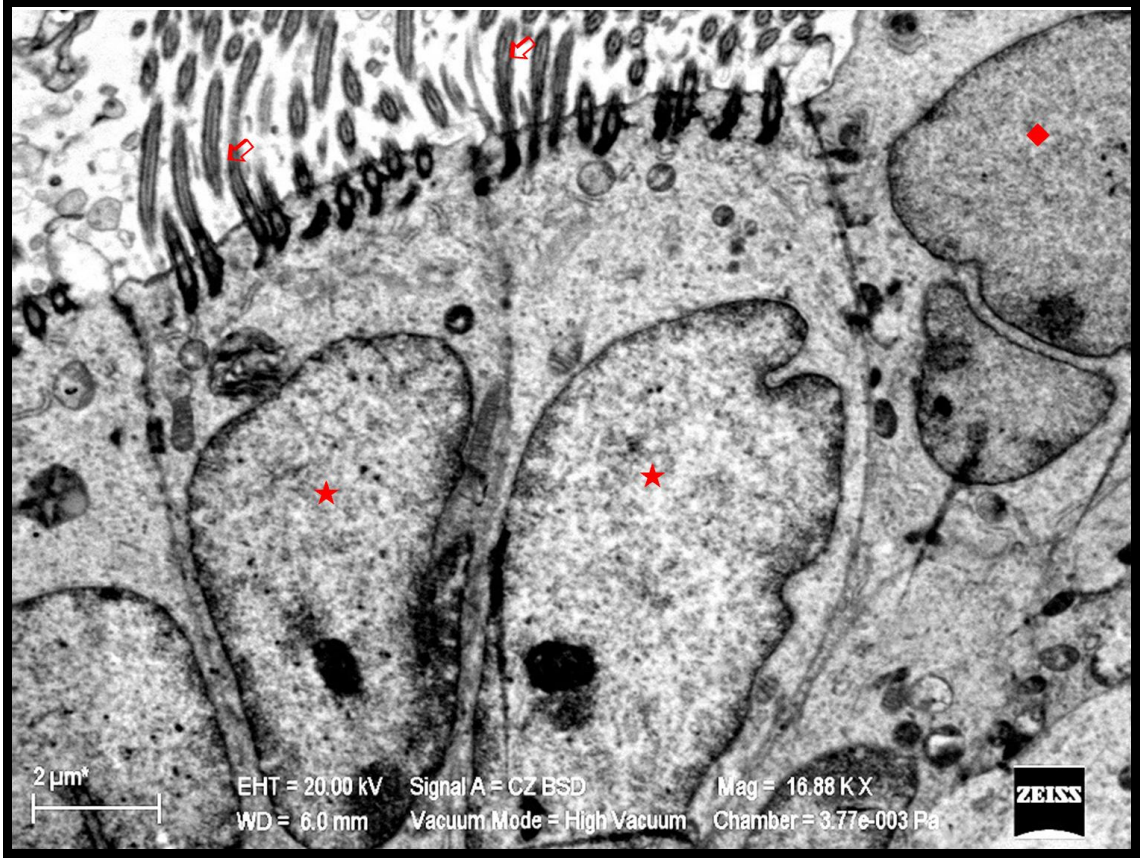
**Şekil 4.12.** Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu elektron mikroskobik kesitlerinde silyalar (⇒) gözleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)



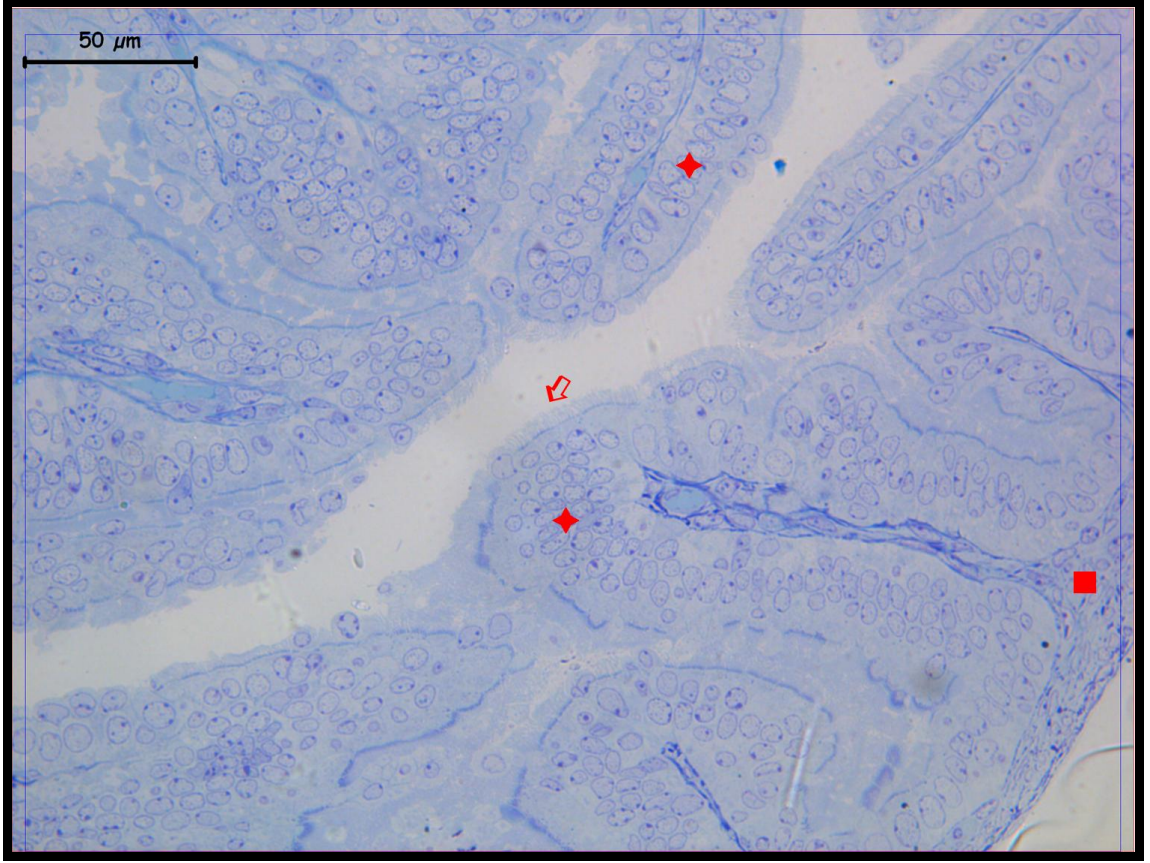
**Şekil 4.13.** Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait tuba uterina dokusu yarı ince kesitlerinde epitel (◆), lamina propria (■), vakuoller (ø) ve damar (→) yapıları görülüyor (Toluidin mavisi).



**Şekil 4.14.** Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitlerinde silyalı hücre çekirdeği (★), silyasız hücre çekirdeği (◆) ve silyalar (⇒) izleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)



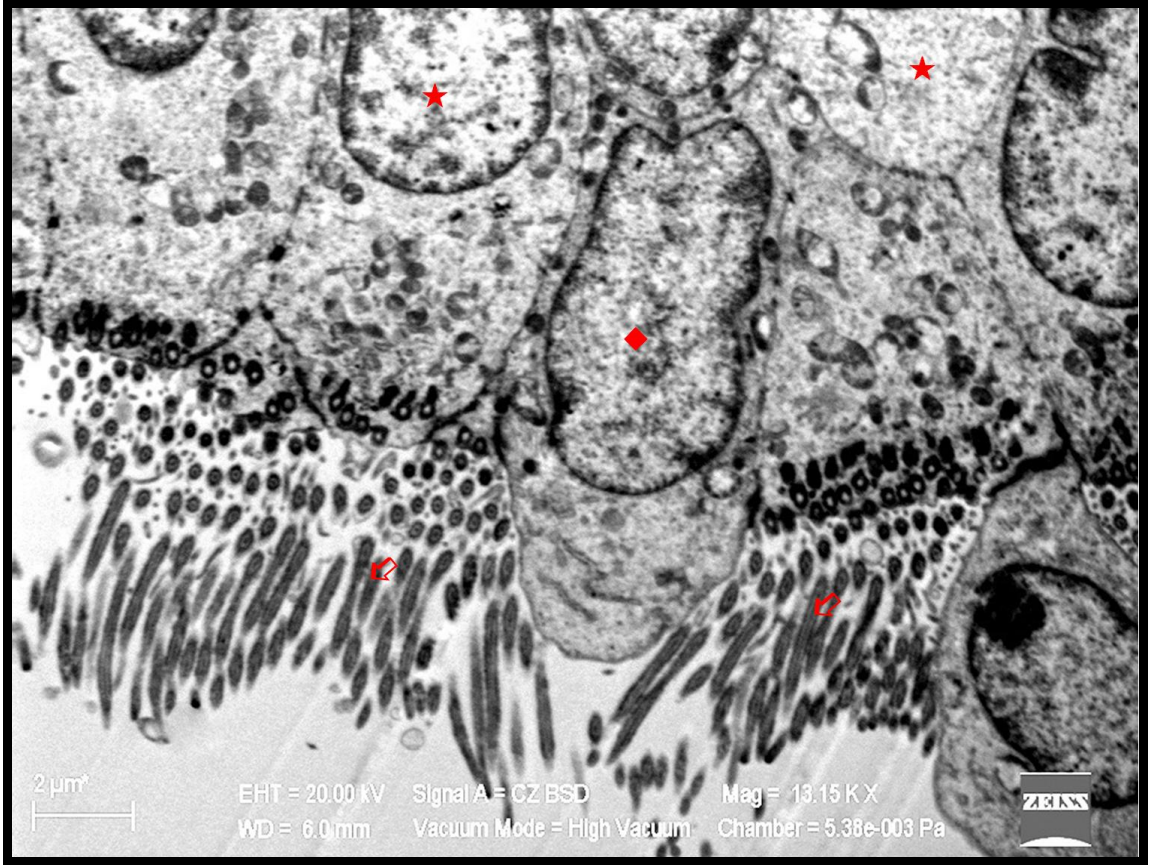
**Şekil 4.15.** Sigaraya etkin bırakılmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitlerinde silyalı hücre çekirdeği (★), silyasız hücre çekirdeği (◆) ve silyalar (⇒) gözleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)



**Şekil 4.16.** Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait tuba uterina dokusu yarı ince kesitlerinde epitel (◆), lamina propria (■) ve silyalar (⇒) görülüyor (Toluidin mavisi)



**Şekil 4.17.** Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskobik kesitlerinde silyalı hücre çekirdeği (★), silyasız hücre çekirdeği (◆) ve silyalar (⇒) gözleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)



**Şekil 4.18.** Sigaraya etkin bırakılmış ve E vitamini uygulanmış gruba ait tuba uterina dokusu elektron mikroskopik kesitlerinde silyalı hücre çekirdeği (★), silyasız hücre çekirdeği (◆) ve silyalar (⇔) izleniyor (Uranil asetat – Kurşun sitrat)

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda öne çıkan önemli bulgulardan ilki, sigara dumanına maruz bırakılan Swiss albino cinsi farelerde sigara dumanının endometriyumda pinopod gelişimi üzerine olan olumsuz etkisidir. Pinopod sayısı 20 KX büyütme alanında kontrol grubunda (1.grup)  $149 \pm 6$  iken sigaraya maruz kalan çalışma grubunda (2.grup)  $11 \pm 3$  olarak bulunmuştur. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırdığında sigara dumanına maruz kalan grupta pinopod gelişim oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaktaydı ( $P=0,002$ ).

Sigaranın fertilizasyon üzerine etkilerini, IVF-ET sikluslarında araştıran, özellikle implantasyon oranları üzerine farklı sonuçların saptandığı birçok rapor yayınlanmıştır. Bazı çalışmalarda fertilizasyon oranı, implantasyon oranı, gebelik oranları ile sigara içme alışkanlığı arasında her hangi bir ilişki bulunmazken bazı çalışmalarda sigara içimi ile implantasyon oranları arasında olumsuz bir ilişkiye rastlanmıştır (3,111).

Hughes ve ark.'nın, sigaranın erkek ve kadın hastalarda IVF-ET sonuçlarına etkisini inceledikleri çalışmalarında, sigara içen ve içmeyen gruplar arasında fertilizasyon, implantasyon ve gebelik oranlarının benzer olduğunu saptadılar. Ancak çalışmalarında aktif sigara içenlerde gonadotropin dozunun daha yüksek ( 24.7 ampul; 19.8 Ampul ) ve tedavi süresinin sigara içmeyenlere göre daha yüksek (10.2 gün ;9.2) olması gruplar arasında fark tesbit edilememesinin nedeni olabilir (102).

Pattinson ve ark.'nın, daha önceden tedavi almamış, IVF-ET tedavisi için başvuran 447 çifti retrospektif olarak inceledikleri çalışmada, sigara içen ve içmeyenlerde, sikluslarda implantasyon oranı arasında istatistiksel anlamlı fark saptamadılar. Fakat spontan düşük insidansı sigara içenlerde daha yüksek (%42.1; %18.9 ) ve dolayısıyla IVF siklusu başına doğum oranı sigara içen grupta anlamlı oranda düşük bulundu ( 11/124, %9.6; 40/236, %17) (100).



Sterzik ve ark.'nın, yaşları 23-29 arasında değişen ve ilk defa IVF programına başvuran ovulatuvar fonksiyonlu, normal tubal faktörlü 197 kadın hastadan oluşan bir kohort çalışmasında sigaranın IVF tedavisi ile elde edilen fertilizasyon ve gebelik oranları üzerine etkisini incelediler (103). Sonuçlar incelendiğinde fertilizasyon, implantasyon ve gebelik oranlarında farklı gruplar arasında anlamlı fark bulamadılar. Kadının sigara içmesi fertilizasyon potansiyeli üzerinde klinik olarak tesbit edilebilen bir bozulmaya yol açmadığını saptadılar.

Soares ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, yaptıkları çalışmada, sigara içen ve içmeyen olgularda implantasyon oranları arasında belirgin fark olduğunu saptamışlardır (180). Sigara içen grupta implantasyon oranları belirgin olarak düşük bulunmuştur( $p<0.01$ ). Bununla birlikte yine aynı çalışmada günlük içilen sigara miktarının artması ile implantasyon oranındaki düşüş arasında da ilişki bulunmuştur. Fazla sigara içen grupta az sigara içen gruba göre implantasyon oranları daha düşük olarak tesbit edilmiştir ( $p<0.01$ ).

Yukarıdaki bazı çalışmalarda klinik açıdan implantasyon oranlarının sigara etkisiyle değişmediği, bazılarında ise sigara içimi ile implantasyon oranlarında belirgin düşüşler olduğu bildirilmiş olmakla beraber, implantasyon alt markerları incelenmemiştir. Bizim çalışmamızda ise implantasyon oranları incelenmemiştir, ancak implantasyonda etkili olan pinopod gelişimi araştırılmış ve sigaraya maruziyetin pinopod gelişimini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır. Sigara içenlerde implantasyon oranlarının azalmasında pinopod sayısındaki azalma önemli bir faktör olabilir.

Tüm literatür gözden geçirildiğinde sigaranın endometrial reseptivitede etkili olan pinopod gelişimi üzerine olan etkisini inceleyen çalışma bulunamamıştır. Dolayısıyla bizim çalışmamız bu konuda yapılmış ve literatüre geçecek ilk çalışmayı oluşturmuştur. Ancak sigaranın etkilerini inceleyen ve özellikle implantasyonda etkili olan alt markerların da irdelendiği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada öne çıkan ikinci önemli bulgu, intraperitoneal verilen E vitamininin sigaranın pinopod oluşumu üzerindeki olumsuz etkilerini azaltığının tesbit edilmesidir. Sigara içen grup (grup-2) ile sigara içen ve E vitamini verilen (grup-3)

grupta pinopod gelişimi karşılaştırıldığında, (grup-3)'te pinopod gelişiminin daha fazla olduğu tesbit edildi ( $p<0.01$ ).

Vitamin ve minerallerin üreme fonksiyonu üzerindeki etkileri yoğun araştırmalara konu olmuştur. Özellikle vitamin A prekürsörü olan Beta karotenin üreme fonksiyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca Vitamin E ve Selenyumun, kalsiyum, fosfor ve Vitamin D'nin diyetle alınımının üreme fonksiyonu üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (181).

Kadınlarda uygulanan oral antioksidan tedavisiyle ilişkili çok az veri bulunmaktadır. Erkeklerde olduğu gibi oral antioksidanların over, folikül sıvısı, tuba uterina gibi hedef sahalara ulaşip ulaşmadığı belirsizdir. Bununla birlikte, nikotin metabolitlerini kapsayan toksik maddeler bu bölgelere ulaşmaktadırlar; böylece foliküler savunmaların aşıldığı ve optimal ilaçlar ve dozlar bilinmemesine rağmen antioksidan tedavisiyle kompanse edilen belirli şartların bulunduğunu öne sürmek mantıklıdır (24).

Igarashi, oral yolla günlük 400 mg askorbik asit verilmesinin anovuluar kadınlarda klomifenin ovulasyon indükleyici etkisini artırdığını tesbit etmiştir (182). Antioksidan tedavinin, oosit yaşlanmasının, hücre dışı ortamda (in vitro) fertilizasyon hücresel fragmentasyon ve blastokist dönemine kadar gelişim üzerindeki negatif etkisini engellediği bildirilmektedir (183). Ancak anti-oksidan tedavinin ve özellikle E vitamininin endometriyum ve endometriyal reseptivite üzerine olan etkisi henüz belirsizdir.

Bazı çalışmalarda, oral antioksidan kullanımının sigara tiryakilerinde, erkek faktörlü infertilite hastalarında, semeninde yüksek düzeyde ROS bulunan erkeklerde, IVF sikluslarından düşük fertilizasyon oranı gösteren fertil normospermik erkeklerde olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak özellikle kadınlarda uygulanan oral antioksidan tedavisiyle ilgili veriler yetersiz gözükmektedir. Bununla birlikte günümüzde yardımcı üreme laboratuvarlarında antioksidan kullanımı konusunda in vitro insan sperm örnekleri için en uygun suplement tipini veya etkisini tanımlayacak hiçbir geniş skalalı prospektif çalışma bulunmamaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, implantasyonda etkili olan ve bir endometriyal reseptivite belirteci olan pinopod gelişiminde sigaranın anlamlı düzeyde olumsuz etkilerinin olduğu, E vitaminin ise sigaranın olumsuz etkilerini anlamlı düzeyde engellediği tesbit edildi. Bu nedenle infertil hastalar başta olmak üzere tüm kadınlar sigaranın bu olumsuz etkileri konusunda bilgilendirilmeli, sigarayı bırakmaları teşvik edilmelidir. Sigarayı bırakamayan kadınlarda, E vitamininin pnopod oluşumu üzerindeki olumlu etkisinden faydalanılmalıdır. Yapılacak yeni çalışmalarla bu çalışmadaki sonuçların pekiştirilmesine ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ledee- Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL. Concentration of leukemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002;17:213-8.
2. Maugey-Laulom B, Commenges-Ducos M, Jullien V, Papaxanthos-Roche A, Scotet V, Commenges D. Endometrial vascularity and ongoing pregnancy after IVF. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio* 2002;104:137-43.
3. Golding JF.: Smoking. In: Brewis RAL, Gibson GJ, Geddes DM. *Respiratory Medicine*. London. WB Saunders Company, 1990: 445-460.
4. Janoff A, Pryor WA, Bengali ZH.: Effects of Tobacco smoke components on cellular and biochemical processes in the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 136: 1058-1064.
5. Tüberküloz S. Tütün. *Yeni Tıp Dergisi* 1988; 63-67.
6. Elenbogen A, Lipitz S, Mashiach S. The effect of smoking on the outcome of in vitro fertilization embryo transfer. *Hum Reprod* 1991;6:242-244.
7. Shara F Beatse S, Leonardi M. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidence by the clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 1994; 62:257-262.
8. Mumcu G: Sigaranın fertilitate ve gebelik üzerine etkileri. Özyardımcı N, editor. *Sigara ve sağlık*, Bursa 2002; 257-280.
9. Racowsky C, Hendrics RC, Baldwin KV. Direct effects of nicotine on the meiotic maturation of hamster oocytes. *Reprod Toxicol* 1989; 3:13-21.
10. Zenses MT, Reed TE, Wang P, Klein J: Cotinine a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluid of women in in-vitro fertilization therapy. *Fertil Steril* 1996;66:614-619.

11. El-Nemr A., Al-Shawaf T., Sabatini L., Wilson C., Lower A.M. and Grudzinskas J.G: Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. 1998; 13(8): 2192-2198.
12. Van Voorhis BJ, Dowson JD, Dale MS. The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles. *Obstet Gynecol* 1996;88:785-791.
13. Knoll M, Talpot P. Cigarette smoke inhibits oocyte cumulus complex pickup by the oviduct in vitro independent of ciliary beat frequency. *Reprod Toxicol* 1998; 12:57-58.
14. Yamamoto Y, Isoyama E, Sofikitis N, Migayawa I: Effect of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urol Res* 1998; 26:45-48.
15. Park EM, Park YM, Gwak YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* 1998;25,79-86.
16. Cruch DF., Prior W.A, Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicologic implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64,111-126
17. Carroll EW. Cellular adaptation, injury and death and wound healing. *Stead. Pathophysiology*. Lippincott, Philadelphia, 1998; 39.
18. Özdemir G. Reaktif Oksijen Partikülleri. Eskisehir OGÜTF yayını. 1995.
19. Horwitt M.K.: Interpretations of requirements for tiamin, riboflavin, niacin, tryptophan, vitamin E plus comments on balance studies and vitamin 6: *Am. J. Clin. Nutr.* 1986; 44; 973-985.
20. Dawson, C.B., Harris, W.A., Teter, M.C., et al.: Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil. Steril.* 1992;58: 1034.
21. Lenzi, A., Culasso, F., Gandini, L., et al.: Placebo-controlled, double-blind crossover trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum. Reprod.* 1993;8: 1657.

22. Kessopoulou, E., Powers, H.J., Sharma, K.K., et al.: A double blind randomized placebo controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive species associated male infertility. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 825.
23. Rolf, C., Cooper, T.G., Yeung, C.H., Nieschlag, E.: Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with highdose vitamin C and vitamin E: a randomized placebo controlled double blind study. *Hum. Reprod.* 1999;14, 1028.
24. Clare T. Taylor: Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2001; 10:189-198.
25. Moore KL, Persaud TVN. İnsan Gelişiminin Başlangıcı. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi, Altıncı İngilizce Baskıdan Çeviri Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; 1-47.
26. Roos MH, Kaye GI, Pawlina W. Female Reproductive System. *Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology,* Fourth Ed. Baltimore: Williams&Wilkins, 2003;743-63.
27. De los Santos MJ, Mercader A, Galan A, Albert C, Romero JL, Pellicer A. Implantation rates after two, three or five days of embryo culture. *Placenta* 2003;24:13-9.
28. Nikas G. Develioglu O, Toner P, Jones HW, Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999;14:787-92.
29. Macklon NS, Fauser BC. Impact of ovarian hyperstimulation on the luteal phase. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:101-8.
30. Nardo LG. Human embryo implantation failure and recurrent miscarriage; basic science and clinical. *Reprod Biomed Online* 2006;13:11-2
31. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006;12:731-46.

32. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006;12:617-30.
33. Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999;14:3-16.
34. Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy R, Keay SD. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG* 2005;112:773-80.
35. Urman B, Yakın K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *Reprod Biomed Online* 2005;11:371-81.
36. Haddad-Filho J, Cedenho AP, Katz SG. Endometrial expression of IL-1Rt1 in patients undergoing miscarriage or unsuccessful IVF cycles. *Reprod Biomed Online* 2007;14:117-24.
37. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PGA. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 2004;9:692-715
38. Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation, *Reprod Biomed Online* 2007; 14:102-9.
39. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 122(2):262-3.
40. Rogers P, Leeton J. Uterine receptivity and embryo transfer. Trounson AO, Gardner DK, *Handbook of in vitro fertilization*, 2nd Ed. CRC Press. 2000;499-528.
41. Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat* 1973;138:277-99.

42. Nardo LG, Sabatini L, Rai R and Nardo F. Pinopode expression during human implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio* 2002;101:104-8
43. Leach RE, Khalifa R, Armant R, Brudley A, Das SK, Dey SK, Fazleabas AT. Heparin-binding EGF-like growth factor modulation by antiprogestin and CG in baboon. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4520-8.
44. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod* 1999;14:99-106.
45. Nikas G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online* 2002;4:18-23.
46. Develioglu OH, Nikas G, Hsiu JG, Toner JP, Jones HW. Detection of endometrial pinopodes by light microscopy. *Fertil & Steril* 2000;74:767-70.
47. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren B-M. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil&Steril* 2001;76:782-91.
48. Nikas G, Psychoyos A. Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity. *Assist Reprod Rev* 1994;4:26-32
49. Nikas G, Psychoyos A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance. *Ann N Y Acad Sci* 1997;816:129-42.
50. Dey SK, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *EndocrRev* 2004;25:341-73
51. Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids* 2003;68:809-15.
52. Revel A. Implementation of integrin 3 level as predictor of implantation in an IVF program. ASRM/CFAS Annual Meeting, Montreal, Canada 2005.



53. Creus M, Ordi J, Fabregues F, Casamitjana R, Carmona F, Cardesa A, Vanrell JA and Balasch J. The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study. *Hum Reprod* 2003;18:683-93.
54. Defrere S, Van Langendonckt A, Moulin P, Befahy P, Gonzalez D, Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Donnez J. Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *Am J Reprod Immunol* 200;54:5-12
55. Thathiah A and Carson DD. MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochem J* 2004;382:363-73.
56. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005;11:613-30.
57. Kondera-Anasz Z, Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Jonca M. Concentrations of interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 soluble receptor type II(IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio* 2005;123:198-203.
58. Wolff M, Thaler CJ, Zepf C, Becker V, Beier HM, Strowitzki T. Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol* 2002;16:121-29.
59. Huang JC, Wun WSA, Goldsby JS, Wun IC, Noorhasan D, Wu KK. Stimulation of embryo hatching and implantation by prostacyclin and peroxisome proliferator-activated receptor activation: implication in IVF. *Hum Reprod* 2007;22:807-14.
60. Ye X, Hama K. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005;435:104-8.
61. Horne AW, White JO, Lalani EN. The endometrium and embryo implantation. *BMJ* 2000;321:1301-2.

62. Edwards RG. Human Implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reprod Biomed Online* 2006;13:887-904.
63. Basaran N. Hincal F.: Çevresel tütün dumanı ve pasif sigara içimi. *FABAD Form. Bil. Der.* 1990; 15:247-248.
64. Buns DM: Cigarette smoking. *Thoracic Oncology.* 1997;51-55.
65. Neal M.S., Hughes E.G., Holloway A.C., Foster W.G: Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes 2005;20 (9): 2531-2535.
66. DiCarlantonio G., Talpot P.:Inhalation of Mainstream Cigarette Smoke Retards Embryo Transport and Slows Muscle Contraction in Oviducts of Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Biology of reproduction* 1999;61:651-656.
67. Sohn Ho, Lim HB, Lee YG, Lee DW, Kim YT.: Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats. *Arch Toxicol* 1993; 67:667-673.
68. Lapenna D, Gionia SD, Mezzetti A, Ciofani G, Consoli A.: cigarette smoke, ferritin and lipid peroxidation. *Am J respire Crit Care Med* 1995; 151:431-435.
69. Bridges AB, Scott NA, McNeill GP, Pringle TH and Belch JJF. Circadian variation of white blood cell aggregation and free radical indices in men with ischaemic heart disease. *Eur Heart J* 1992; 13: 1632-1636.
70. Bush PG, Mayhew TM, Abromovich DR. A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. *Placenta.* 2000;21(3), 247-56.
71. Bab Z and Yan L.: ESR spin trapping studies on free radicals in gasphase of cigarette smoking. *Chin. Med. J.* 1991; 104, 591-594.
72. Brunnemann RD., Genoble L., and Hoffman D.: N-nitrosamines in chewing tobacco. An International comparison *J Agric Food Chem.* 1985;33, 1178-1185.

73. Koren G: Fetal Toxicology of environmental tobacco smoke. *Curr Opin Pediatr.* 1995; 7, 128-131.
74. Lambers DS, Clark KE: The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin Perinatol.* 1996; 20(2), 115-126.
75. English JP, Willius FA, Berkson J. Tobacco and coronary disease. *JAMA* 1940; 115:1327-1329.
76. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress: a report of the Surgeon General: executive summary. Rockville, Md: Department of Health and Human Services. CDC 1989; 89:8411.
77. Muscat JE, Harris RE, Haley NJ, Wynder EL. Cigarette smoking and plasma cholesterol. *Am Heart J* 1991;121:141-147.
78. Cavendr JB, Rogers WJ, Fisher LD et al. Effects of smoking on survival and morbidity in patients randomized to medical or surgical therapy in the CASS:10 year follow-up: Cass Investigators. *J. AM Coll Cardiol* 1992;20:287-294.
79. Principles of Surgery 6th ed. USA 1996; 1:927.
80. Rutherford Vascular Surgery 5 ed. Denver, Colorado: Saunders company 2000;10.
81. Snajdar RM, Busuttil SJ, Averbook A, Graham DJ et al. Department of surgery, June 2000 Case Western Reserve University Medical School, Cleveland, USA
82. Boyle P. Cancer, Cigarette smoking and premature death in Europe: A review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, Lung Cancer, October 1997; 17:1-60.
83. Hoffmann D, Djordjevic MV, Rivenson A, Zang E, Desai D, Amin S. A study of tobacco carcinogenesis. Relative potencies of tobacco-specific N-nitrosamines as inducers of lung tumour in A/J mice *Cancer Lett* 1993; 71:25-30.
84. SS Hect. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*; 1999; 91(14)14: 1194-1210.

85. Skrett Sj: Host Defences Against Respiratory Infection. *Med Clin North Am* 1994; 78(5): 941-946.
86. Todisco T, Baglioni S, Amir E, Palumbo R. Effect of Bamipylline on Tracheobronchial Mucus Clearance in Subjects With Smokers Simple Chronich Bronchitis. *Respiratory* 1995; 62:16-20.
87. Bennett WD, Chapman WF. Effectiveness Of Cough For Enhancing Mucus Clearance in Asymptomatic Smokers. *Chest*, 1992;102:412-416.
88. Sherman CB. The Health Consequences of Cigarette Smoking. *Med Clin North Am* 1992;76(2): 355-375.
89. Srivasta ED, Barton JR, O'mahony S, et al. Smoking, Humoral Immunity, and Ulcerative colitis. *Gut* 1991; 32: 1016-1019.
90. Murray L., Nusbaum MD., Myron Gordon MD, Devra Nusbaum at al. Smoke alarm: A review of the clinical impact of smoking on women. *Prim Care Update Ob/Gyns* 2000;7:207-214.
91. Bodis J, Hanf V, Torok A, Tinneberg H-R: Smoking and corpus luteum function. *Fertil Steril* 1996; 4:810-814.
92. Evers J, Slaats P, Land J, Durmoilin J, Dunselman G: Elevated levels of follicle stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:1010-1014.
93. Berta L, Fortunati N, Gennari P, Appendino M, Casella A, Frairia R: Influence of cigarette smoking on pituitary and sex hormone balance in healty premenopausal women . *Fertil Steril* 1991;56:788-789.
94. Weigert M, Hofstetter G, Kaapl D, Gottlich H, Krischker U et al.: The effect of smoking on oocyte quality and hormonal parameters of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Clinical Assisted Reproduction* 1999;16(6):287-293.

95. Neal M.S., Hughes E.G., Holloway A.C., Foster W.G: Sidestream smoking isequally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes 2005;20 (9): 2531-2535.
96. Neal M.S, Younglai E.V, Holloway A:C, Foster W.G. : Aromatase activity in granulosa cells as a predictor of pregnancy potential. Int Congr Series 2004;1271,139-142.
97. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod 1998; 13: 1532-1539.
98. Hull M, North k, Taylor H, Farrow A, Ford CNC, Delayed conception and active and passive smoking. Fertil Steril 2000; 74: 725-733.
99. Harrison, K.L., Breen, T.M. and Hennessey, J.F: The effect of patient smoking habit on the outcome of IVF and GIFT treatment. Aust. NZ Obstet. Gynaecol. 1990;30: 340–343.
100. Pattison HA, Taylor PJ, Pattison MH. The effect of cigarette smoking on ovarian function and early pregnancy outcome of in vitro fertilization treatment. Ferti Steril 1991; 5:780-783.
101. Rosevear, S., Holt, D.W., Lee, T.D. et al.: Smoking and decreased fertilisation in-vitro. Lancet. 1992; 340: 1195–1196.
102. Hughes, E.G., Yeo, J., Claman, P. et al.: Cigarette smoking and the outcomes of in-vitro fertilisation: measurement of effect, size and level of action. Fertil. Steril. 1994; 62, 807–814.
103. Sterzik, K., Strehler, E., Desanto, M. et al.: Influence of smoking on fertility in women attending an in-vitro fertilisation program. Fertil. Steril. 1996; 66: 810–814.
104. Maximovich, A. and Beyler, S.A.: Cigarette smoking at time of in-vitro fertilisation cycles initiation has negative effect on IVF, embryo transfer success rates. J. Assist. Reprod. Genet. 1995; 12: 75–77.

105. Zenses MT: Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update*.2000;6:122-131.
106. Trapp M, Kemeter P, Feictinger W: Smoking and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1986; 6:357-358.
107. Zenses MT., Krisnan S, Krishnan B, Zhang H, Casper RF: Cadmium accumulation in follicular fluid of women in-vitro fertilization-embryo transfer is higher in smokers. *Fertil Steril* 1995;64:599-603.
108. Barbieri RL, McShane M, Ryan KJ, Constituens of cigarette smoke inhibit human granulose cells aromatase. *Fertil Steril* 2000;74:725-733.
109. Borman SM, Christian PJ, Sipes IG and Hoyer PB: Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;167;191-198.
110. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1532-1539.
111. The Practice Committee of the American Society for Reproductive medicine: American Society for Reproductive medicine, Birmingham, Alabama. *Fertil Steril* 2004;82:62-67.
112. Cooper GS, Baird DD, Hulka BS, Weinberg CR, Savitz DA, Hughes CL. Folliclestimulating hormone concebrations in relation to active and passive smoking. *Obstet Gynecol*. 1995; 85:407-411.
113. Zenses MT, Reed TE. Cigarette smoking inhibits apoptosis human preembriyos. *Hum Reprod* 1996, Abstract book 1,153.
114. Zenses MJ, Wong P, casper RF. Cigarette smoking may effect meiotic maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 1995; 10:3213-3277.

115. Elenbogen A, Lipitz S, Mashiach S. The effect of smoking on the outcome of in vitro fertilization embryo transfer. *Hum Reprod* 1991;6:242-244.
116. Feichtinger W, Papalambrou K, Poehl M, Krischker U, Neumann K. Smoking and in vitro fertilization: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:496-499.
117. Klonff-Cohen H, Natarjan L, Maris R, Yoe B. Effects of female and male smoking on succes rates of IVF and gamete intra-fallopian transfer *Hum Reprod* 2001; 16:1382-1390.
118. Kulikaus V, Blaustein D, Ablin J. Cigarette smoking and it's possible effects on sperm. *Fertil Steril* 1985; 44(4):526-528.
119. Merino G, Lira SC, Martinez-Chequer JC. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch Andr* 1998; 41(1):11-15.
120. Holzki G, Gall H, Hermann J. Cigarette smoking and sperm quality. *Andrologia* 1991; 23(2): 141-144.
121. Sofitikis N, Miyagewa I, Dimitriadis D. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995; 154: 1030-1034.
122. Dikshit RK, Buch JG, Mansuri SM.: Effect of tobacco consumption on semen quality of a population of hypofertile males. *Fertil Steril*. 1987 Aug; 48(2): 334-336.
123. Lewin A. Gonen O, Orvieto R, Schenker JG.: Effect of smoking on concentration, motility and zona-free hamster test on human sperm. *Arch. Androl*. 1991 Jul-Aug; 27(1) : 51-54.
124. Kapawa A, Giannakis D, Tsoukanelis K, Kanakas N, Baltogiannis D, Agapitos E, et al. Effect of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia* 2004; 36: 57-68.

125. Vine MF: Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996;19:323-337.
126. Osser S.: Semen quality of smoking and non smoking men in infertile couples in a Swedish population. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1992;71:215-218
127. Robbins WA, Vine MF, Troug KY, Everson RB. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen* 1989;30:175-183.
128. Belcheva A, Ivanova K, Tzvetkova P, Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma integrity and DNA fragmentation. *Int.J ournal Andrology* 2004;27:296-300.
129. Collin O, Kilter S, Berg A. Tobacco smoke disrupts testicular microcirculation in the rat. *Int J Androl* 1995; 18:141-145.
130. Zineman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl* 2000;21:145-153.
131. Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1994;61:35-43.
132. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Human Reproduction* 2002;17:1554-1559.
133. Comhaire F.N, Mamoud A.M, Depuydt C.F, Zalata A.A, Christophe A.B. Mechanism and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999; 5:393-398.
134. Pryor WA.: Oxyradicals and related species. *Ann. Rev. Physiol.* 1986;48, 657-667.



135. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 15,222(1),1-15.
136. Halliwell B., Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 1985; 8(2): 89-193.
137. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993; 23, 481.
138. Sies H: Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91,131.
139. Cheeseman KH: Lipid peroxidation in biological systems: Halliwell B, Aruoma OI (ed): *DNA and Free Radicals*, Ellis Horwood, London 1993;76.
140. Antwerpen VL., Theron AJ: Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vit C, vit E and tissue injury. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 1992; 15, 53-65.
141. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG: Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002;78(6):1215–1224.
142. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA: Role of oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003;79:829–843.
143. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK: The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Wom Med* 2000;45(5):314–320.
144. Jozwik Ma, Wolczynski S, Jozwik Mi, Szamatowicz M: Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Rep* 1999;5(5):409–413.
145. Oyawoye O, Abdel GA, Garner A, Constantinovici N, Perret C, Hardiman P: Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: Relationship to outcome. *Hum Reprod.* 2003;18(11):2270–2274.

146. Klebanoff SS: Inactivation of estrogen by rat uterine preparations. *Endocrinology* 1985; 76, 301.
147. Ishikawa Y., Hirai K., Ogawa K: Cytochemical localization of hydrogen peroxide in the rat uterus. *J Histochem Cytochem* 1984; 32,674.
148. Cherouny P., Ghodgoankar J., et al: Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and contractions of the pregnant rat uterus. *Am J. Obstet Gynecol.* 1988;159,1390.
149. Miyazaki T, Sueoka A.M., Dharmarajan A.M., et al: Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesteron production by the in vitro perfused rabbit ovary. *J. Reorod Fertil.* 1991; 91:207.
150. Goto Y., Noda K.,Narimoto K., et al: Oxidative stres on mause embryo development in vitro. *Free Rad Biol Med.* 1992;13,47.
151. Yagi, K.: Female hormones act as natural antioxidants a survey of our research. *Acta Biochem. Pol.* 1997;44: 701.
152. Paszkowski, T., Traub, A.I., McMaster, D., et al., 1995. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta.*1995;236: 173.
153. Carlson J.C., Wu X.M., Sawada M: Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function. *Free Rad Biol Med.* 1993; 14,79.
154. Aten, R.F., Duarte, K.M., Behrman, H.R., 1992. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2a. *Biol. Reprod.* 1992;46: 401.
155. De Lamirande E., Gagnon C.: Reactive oxygen species (ROS) and reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 336, 185.
156. Bjorneboe A., Bjorneboe G., Drevon C. : Absorbtion, transport and distrubition of vitamn E. *J. Nutr.* 1990: 120; 233-242.

157. Brom J. Vitamins, Mineral and Nutrition. Crowe L. Medical biochemistry. Mosby, London. 1999; 114.
158. Mayes PA. Structure and function of the lipid-soluble vitamins. Harper's biochemistry. Barnes DA. McGraw-Hill, New York, 2000; 647-649.
159. Akkus \_ . Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza, 1995.
160. Turk CY, Halıcı M, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S: Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. The Journal of International Medical Research. 2004;32: 507-512.
161. Wartson R.R., Leonard T.K.: Selenium and vitamin A, E and C: Nutrients with cancer prevention properties. J. Am. Diet Assoc. 1986; 86, 505-510.
162. Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, Tuncel T, Tuncel P, Özbek R, Turan K,: Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbits. J Int Med Res 1996; 24: 419-424.
163. Shklar G., Shwartz J., Trikler D., Reid S.: Prevention of experimental cancer and immunostimulation by vitamin E. J. Oral. Pathol. Med. 1990; 19, 60-64.
164. Traber MG, Packer L. Vitamin E. Beyond antioxidant function . Am J Clin Nutr 1995; 62: 1501-1509.
165. Jialal I, Fuller CJ. Effect of vitamin E, vitamin C and beta carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. Can J Cardiol. 1995;11 Suppl:97-103.
166. Massey K.D., Burton K.P.: Alpha-tocopherol attenuates myocardial membrane related alterations resulting from ischemia and reperfusion. Am. J. Physiol. 1989;256,1192-1199.
167. Riemersma R.A., Wood D.A., Macintyre C.C.A., Elton R.A., Gey K.F., Oliver M.F.: Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamin A, C, E and caroten e . Lancet. 1991; 337, 1-5.

168. Leske MC, Chylack LT , He Q, Wu SY, Schoenfeld E, Friend J, Wolfe J.: Antioxidant vitamins and nuclear opacities: The longitudinal study of cataract. *Ophthalmology* 1998; 105:831-836
169. Clausen J., Nielson S.A., Kristensen M.: Biochemical and clinical effects an antioxidative supplementation of geriatric patients. *Biol. Trace Element Res.* 1985;20,135-151.
170. Ross W.M., Creighton M.O., Trevithick J.R.: Radiation cataractogenesis induced by neutron or gamma irradiation in the rat lens is reduced by vitamin E. *Scanning Microscopy.* 1990; 4, 641-650.
171. Brewster MA. Vitamins. Kaplan LA. Pesce AM. *Clinical Chemistry.* Mosby, Baltimore. 1996: 764-769.
172. Marcin L.J.: Vitamin E, In: *Handbook of vitamins.* Marcel Dekker. Inc New York and Basel 1984;99-145.
173. Carpenter D.: Vitamin E deficiency *Sem. Neurol.* 1985; 5, 283-287.
174. Spiekerman AM. *Vitamins and Nutritional assessment.* Mc Graww L. *Clinical chemistry.* Lippincott Williams and Wilkins., Philadelphia,2000; 543-544.
175. Stephens NG., Parsons A., Schofield PM. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996 Mar 23;347:781-786.
176. Donald B., McCormick PD., Grene HL. Vitamins Burtis CA., Ashwood ER. *Clinical chemistry.* WB Saunders Company, Philadelphia, 1999;1005-1007.
177. Takahashi O, Ichikawa H, Sasaki M.: Hemorrhagic toxicity of d-alpha tocopherol in the rat. *Toxicology.* 1990; 63(2): 157-165.
178. Horwitt M.K.: The promotion of vitamin E. *J. Nutr.* 1986;116, 1371-1377.

179. Murphy P.G., Davies M.J., Columb M.O.: Effect of propofol and thiopentone on free radical mediated oxidative stress of the erythrocyte. *Br. J. Anaesth.* 1996; Apr:76(4),536-543.
180. Soares SR, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Cigarette smoking affects uterine receptiveness. *Hum. Reprod.* 2007;22(2):543-7
181. Hurley, W.L., Deane, R.M.: Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J. Dairy Sci.* 1987; 72: 785.
182. Igarashi M.: Augmentative effect of ascorbic acid upon induction of human ovulation in Clomiphene-ineffective anovulatory women. *Int J Fertil.* 1977; 22: 168-173.
183. Tarin, J.J., Vendrell, F.J., Ten, J., Cano, A.: Antioxidant therapy counteracts the disturbing effects of diamide and maternal ageing on chromosomal distribution and segregation in Mouse oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 1998;4: 281.