

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**EMBRİYO KÜLTÜR ORTAMINDAKİ
HOMOSİSTEİN MİKTARININ ENDOMETRİOZİS
HASTALARINDA EMBRİYO KALİTESİNİ VE IVF
SONUÇLARINI ÖNGÖRMEDEKİ
BELİRLEYİCİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. METEHAN İMAMOĞLU

TEZ DANIŞMANI:

PROF.DR. M. LEVENT ŞENTÜRK

İSTANBUL, 2014

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM

ANABİLİM DALI

**EMBRİYO KÜLTÜR ORTAMINDAKİ
HOMOSİSTEİN MİKTARININ ENDOMETRİOZİS
HASTALARINDA EMBRİYO KALİTESİNİ VE IVF
SONUÇLARINI ÖNGÖRMEDEKİ
BELİRLEYİCİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. METEHAN İMAMOĞLU

İSTANBUL, 2014

TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. M. LEVENT ŞENTÜRK

Bu tez, İ.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No:40275)

ÖNSÖZ

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim sırasında bilgilerinden faydalandığım ve yardımlarını esirgemeyen Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Semih KALELİ'ye

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin hazırlanmasında her zaman destek olmuş olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Levent ŞENTÜRK'e,

Tez sürecimde karşılaştığım zorluklar ile ilgili yardımlarını hiçbir zaman esirgememiş olan hocam Sayın Prof. Dr. Ertan KERVANCIOĞLU'na,

Eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma ve uzmanlarıma,

Tezimin tüm aşamalarında yardımların hiçbir zaman esirgemeyen Üreme Endokrinolojisi Bilim Dalı'nın çok değerli embriyologları, hemşireleri, sekreterleri ve personeline,

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışmaktan keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire ve personellere,

Hayatım boyunca, her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Dr. Metehan İMAMOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. ÖNSÖZ.....	i
2. İÇİNDEKİLER.....	ii
3. KISALTMALAR.....	iii
4. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
5. GENEL BİLGİLER.....	3
6. MATERYAL VE METOD.....	25
7. SONUÇLAR.....	29
8. TARTIŞMA.....	40
9. ÖZET.....	46
10.İNGİLİZCE ÖZET.....	48
11.KAYNAKLAR.....	50

KISALTMALAR

AMH	Anti Müllerian Hormon
AUC	Eğri Altı Alan (<i>Area Under the Curve</i>)
CBS	Sistationin Beta Sentaz
Cys	Sistein
CL	Korpus Luteum
CYP450	Sitokrom P 450
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E2	Östradiol
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FSH	Folikül Stimulan Hormon
GSH	Tiyol glutatyon
GF	Büyüme Faktörü (<i>Growth Factor</i>)
GnRH	Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>)
GnRH-a	Gonadotropin Serbestleştirici Hormon Analog (<i>Gonadotropin Releasing Hormone Analogue</i>)
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropini (<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
Hcy	Homosistein
hMG	İnsan Menopozal Gonadotropini (<i>Human Menopausal Gonadotropin</i>)
HNMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans (<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i>)
HSG	Histerosalpingografi

H/S	Histeroskopi
IL	Interlökin (<i>Interleukin</i>)
i.m.	İntramüsküler
IUI	İntra Uterin İnseminasyon
IVF	In Vitro Fertilizasyon
KOH	Kontrollü Over Hiperstimülasyonu
KS	Klomifen Sitrat
LH	Luteinizan Hormon
LUF	Luteinize Rüptüre Olmamış Folikül
MIS	Mülleryen İnhibe Edici Faktör (<i>Müllerian Inhibiting Substance</i>)
MR	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	Metyonin Sentaz
MTHFR	Metil Tetrahidrofolat Reduktaz
NO	Nitrik Oksit
NKD	Negatif Kestirim Değeri
OCCC	Oosit Korona Kumulus Kompleks (<i>Oocyte Corona Cumulus Complex</i>)
OHSS	Over Hiper Stimulasyon Sendromu
PCO	Polikistik Over
PG	Prostaglandin
PKD	Pozitif Kestirim Değeri
RCOG	Royal College of Obstetrics and Gynecology
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROC	Receiver Operating Characteristic

ROS	Reaktif Oksijen Türleri (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rhCG	Rekombinant İnsan Koryonik Gonadotropin (<i>Recombinant Human Chorionic Gonadotropin</i>)
r-Hfsh	Rekombinan İnsan Folikül Stimulan Hormonu (<i>Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone</i>)
rhLH	Rekombinant Lüteinizan Hormon
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TSH	Tiroid Stimulan Hormon
TVUSG	Transvajinal Ultrasonografi
u-hCG	Üriner İnsan Koryonik Gonadotropini (<i>Urinary Human Chorionic Gonadotropin</i>)
u-hFSH	Saflaştırılmış İnsan İdrar Folikül Stimulan Hormon (<i>Urinary Human Follicle Stimulating Hormone</i>)
VKI	Vücut Kitle İndeksi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (<i>World Health Organization</i>)

1.GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkileyen bir sağlık problemidir. İnfertilite tedavisi amacıyla geliştirilmiş üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) başarısı, hastaların uygun olarak değerlendirilmesine, uygun tedavi ve tekniklerin planlanıp kullanılmasına ve hasta uyumuna bağlıdır. ÜYT'de tedaviye bağlı komplikasyonları asgari düzeyde tutarak gebelik elde etme başarısını arttırmak için çalışmalar sürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, üreme potansiyeli yüksek olan embriyonun seçilmesini sağlayarak gebelik elde etme oranlarını arttırmak üzerine odaklanmış durumdadır. Embriyonun ortama bıraktığı metabolik artıklarının (metabolomikler) ölçülmesi ve değerlendirilmesi ile metabolik potansiyelinin ve genel olarak kalitesinin değerlendirilebileceği hipotezi üzerine yapılmış araştırmalar bulunmaktadır.

Endometriozis, endometriyum bez ve stromasının uterus kavitesi dışında farklı yerlerde bulunmasıdır. Pelvik ağrı ve infertilite semptomlarıyla karakterizedir. İnfertil kadınlarda laparoskopi ile saptanan endometriozis prevalansı fertil kadınlardan fazladır (%21-47 ye karşı %5). İleri evre olan kadınlarda endometriozis büyük çoğunlukla bozulmuş pelvik anatomi yada tubal tıkanıklık ile ilişkilidir. Hafif endometriozisli kadınlarda infertiliteden sorumlu olabilecek herhangi bir mekanizma hakkındaki bilgiler netleşmemiştir. Tubal adezyona neden olmamış minimal endometriozisin infertilite nedeni olup olmadığı netlik kazanmamıştır.

Homosistein metiyonin metabolizması esnasında oluşan, yapısında sülfür bulunduran bir aminoasittir. Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, Homosistein'nin çeşitli düzeylerde damar endotelinde fonksiyon bozukluğuna neden olduğu kabul edilmektedir. Bunun dışında hiperhomosisteinemi oosit ve embriyo kalitesini kötüleştirebilir, aynı zamanda erkek infertilitesi, gebelik komplikasyonları ile ilişkisi olabileceği bildirilmiştir.

Endometriozis ve infertilite arasında tam olarak bir neden sonuç ilişkisi kurulamamış olmakla birlikte, infertilite ile ilişkili olduğunu öne süren pek çok çalışma bulunmaktadır.. Endometriozisin oosit ve embriyo kalitesini ne yönde etkilediği konusunda ise farklı görüşler mevcuttur. Çalışmamızın amacı, endometriozis tanısı olan ve olmayan hasta grupları arasında embriyo kültür ortamı homosistein düzeyini karşılaştırarak, elde edilen embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları açısından her iki grup arasındaki olası farklılıkları bu bilgiler ışığında değerlendirmektir. Ek olarak, endometriozisli hastaların kendi aralarında homosistein düzeyleri ve gebelik sonuçları arasında bir ilişki arayarak; ÜYT tedavisi sürecinde kaliteli embriyo seçimi için homosistein düzeyinin bir araç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi de planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Endometriozis

Etiyoloji-Tarihçe

Endometriozis ilk olarak John Sampson tarafından klinik ve histolojik olarak incelenerek kaleme alınmıştır. Sampson pelvisteki periton üzerindeki endometriozisin, over kaynaklı endometriozisin ekilmesi sonucu olduğu görüşünü savunarak 1927 yılında “Periton boşluğuna endometrium dokusunun menstrüel kanama ile yayılması sonucu periton endometriozisi” olarak yayınlamıştır [1]. Endometriozis etiyopatogenezi ile ilgili olarak ileri sürülen görüşler şu şekilde sıralanabilir:

Retrograd Akım ve İmplantasyon Teorisi

Sampson’un görüşlerini destekleyen ve yaygın olarak kabul edilen bu teoride, endometriozis lezyonlarının, fallop tüplerinden reflüye uğrayan endometriyum dokusunun periton yüzeyi veya pelvik organlara implante olmasına atıfta bulunulur [2]. Bu teoriyi destekleyen pek çok kanıt bulunmaktadır. Menstrüasyon gören kadınlara yapılan laparoskopi sırasında tüplerin fimbrial uçlarında kan akışı izlenmiştir [3]. Endometriozis en sık pelvisle bağlantılı olan bölümlerde görülür. En sık overler, anterior ve posterior *cul de sac*, uterosakral ligamentler, daha sonra posterior uterus ve posterior *broad* ligamentlerde görülür [4,5]. Menstrüel akımdaki endometriyum parçaları, doku kültürlerinde gelişebilirler ve kadınlarda menstrüasyondan sonra periton sıvısından elde edilebilirler [6]. Menstrüel akım obstrüksiyonu ve Müller kanal anomalisi olan kadınlarda endometriozis insidansının daha yüksek olduğu saptanmıştır [7]. Retrograd menstrüasyon, endometriozisli kadınlarda hastalığı olmayanlara göre daha sık izlenebilir [3]. Menstrüasyon döneminde veya erken foliküler fazda kadınların

%59-79'unda, peritoneal sıvıda endometrial hücrelerin varlığı rapor edilmiştir [7-14]. Yapılan çalışmalar klasik ve deneysel verilerle bu hipotezi desteklemektedir [9,10].

Ovardeki endometriozis, uterustan overe lenfatik akım yolu ile veya retrograd menstrüasyon ile açıklanabilir [13]. Ekstrapelvik endometriozis nadirdir (%1-2). Endometrial hücrelerin hematojen veya lenfatik yolla vücuttaki diğer organlara ulaşması sonucu ortaya çıkabilir. Ekstrapelvik endometriozis, hemen hemen vücudun tüm organlarında oluşabilir [9]. Örneğin pulmoner endometriozis; mens sırasında asemptomatik nodül, pnömotoraks, hemotoraks veya hemoptizi bulguları ile karşımıza çıkar [15]. Üretra (obstrüksiyon yapması nedeniyle önemlidir), bağırsak, akciğerler, plevra boşluğu, deri, lenf bezleri, sinirler ve beyin de endometriozisin tespit edildiği organlar olarak bildirilmektedir [16].

Çölömik Metaplazi Teorisi

Overi saran mezotel dokusunun over korteksine invajine olabileceği ve invajine olan bu epitel hücrelerinin çölömik metaplazisinin endometriozis / endometrioma oluşumundan sorumlu olabileceği teorsis öne sürülmüştür. Bu hipotez pelvik mezotelin metaplastik potansiyeline dayandırılmaktadır ve bunu destekleyen iddialar şunlardır [17].

- Ektopik endometriyum dokuları ile devamlılık arz eden epitel invajinasyonlarının varlığı gösterilmiştir.
- Rokitansky-Kuster-Hauser sendromu olan ve uterusu olmadığı için retrograd menstrüasyonu olmayan hastalarda endometrioma varlığı gösterilmiştir.
- Adhezyon ve peritona yapışmış aktif yüzeyel implantlardan kanama ile açıklanamayacak multiloküler endometriomaların bulunması ender değildir.

- Rektovajinal derin nodüllerin cerrahi olarak alınmasından sonra rektal lezyonların tekrar gelişmemesi.

Genetik Faktörler

Bazı kadınlarda periton boşluğuna menstrual döküntülerin taşınmasına rağmen endometriozis gelişmemesi, genetik ve immünolojik faktörleri düşündürmüştür. Simpson, endometriozisli hastaların birinci derece akrabalarında, riskin 7 kat fazla olduğunu göstermiştir [18]. Endometriozis ve GTSM1 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ilk bildiren çalışmanın yayınlandığı 1996 yılından beri bu alandan yapılan çalışma sayısı hızla artmıştır [19]. Di ve Guo tarafından yakın zamanlarda endometriozis ve genetik faktörler arasındaki çalışmaları derleyen meta analizler yapılmıştır [20-22]. Dioksin detoksifikasyon enzimleri, seks steroidlerinin sentezinde rol oynayan enzimler ve seks steroidi reseptörlerini kodlayan genlerdeki bazı polimorfizmler ile endometriozis arasındaki ilişkiyi değerlendiren bu meta analizlerde herhangi bir ilişki ortaya koyulamamıştır [20-22]. Sonuç olarak endometriozis ve genetik faktörler arasındaki ilişkinin daha net olarak ortaya koyulabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

İmmünolojik Faktörler

Menstrüasyon sırasında endometriyum parçalarının periton boşluğuna reflüsü çok yaygın bir olay olmakla birlikte her kadında endometriozis gelişmez. Endometriozisli kadınlarda immün sistemde değişiklikler olabilir ve hastalık, pelvis boşluğundan kaynaklanan canlı endometriyum hücrelerinin immünolojik klirensinin azalması sonucu gelişebilir [23,24]. Normal durumlarda reflü olan endometriyum hücreleri ekstraselüler matrikse yapışmaz ve bu hücreler kendi adhezyon reseptörlerinden farklı uyarıları alarak apoptoze uğrarlar. Endometriozisli kadınlarda bu hücreler, peritonun mezotel hücrelerine yapışma, proliferasyon ve neo anjiyogenezis oluşturma kapasitesine sahiptir ve bu da aktif endometriozis

gelişmesi ile sonuçlanmaktadır [25]. Otolog endometriyum hücrelerine karşı azalmış hücre kaynaklı sitotoksitenin, endometriozisle beraber olduğu bildirilmiştir [26-28]. Otolog endometriyum hücrelerinin, bir kadının immün sistemine doğal bir hedef oluşturabilmesi için genetik ve immunolojik bir takım faktörlerin olması gerekmektedir [27]. Diğer otolog dokuların otolog transplantasyonunun genelde başarılı olduğu görülmektedir. Endometriozisli hastaların düşük *Naturel Killer* (NK) hücre aktivitesine sahip olduğunu bildiren raporlar [28-32] ve aksine bu hastalarda artmış NK aktivitesini gösteren raporlar da mevcuttur [28,29,33]. Ancak NK hücre aktivitesinde, normal bireylerde dahi geniş varyasyonlar görülür. NK aktivitesi sigara, ilaç, egzersiz gibi değişkenlerden etkilenmektedir.

Endometriozisli kadınlarda peritondaki makrofajların yüksek bazal aktivasyonu, sperm motilitesini azaltıp, sperm fagositozunu arttırarak veya fertilizasyonu önleyerek fertilitiyi bozmaktadır [34,35]. Bunları olasılıkla, TNF-alfa gibi sitokinlerin artmış sekresyonu ile yaparlar [36]. TNF-alfa aynı zamanda, ektopik endometriumun pelvik implantasyonunu arttırabilir. Mezotelyal hücreler ve insan endometrial stromal hücreleri arasındaki adzeyon ilişkisinin, mezotelyal hücrelerin TNF-alfa'ya fizyolojik dozda maruz kalmaları sonucunda belirgin olarak arttığı, in vitro olarak gösterilmiştir [36].

Makrofaj ve diğer hücreler endometrial hücrelerin büyümesini, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), makrofajdan derive edilen faktör (MGDF) fibronektin gibi büyüme ve anjiogenetik faktörlerin ve integrinler gibi adhezyon moleküllerinin sekresyonu ile hızlandırır [37-40]. Pelvis boşluğu içerisinde bulunan aktive olmuş makrofajların ve lenfositlerin konsantrasyonunun artışı yanı sıra, büyüme faktörleri ve spesifik sitokinlerin düzeylerindeki yükselme, endometriozis ile immün yanıtın yakın ilişkisi hipotezini desteklemektedir. Tüm düşünülen etyolojik teoriler, hastadan hastaya olan farklılıkları açıklamaya yardımcıdır.

Endometrial hücreler mekanik olarak yayılabilir, metaplaziden gelişebilir ve hastalığın progresyonu bireylerin immün yanıtlarından etkilenebilir.

Prevalans

Endometriozis değişken bir prevalans gösterir. Üreme çağındaki kadınların % 5- 15'inde, infertil kadınların % 30-50'sinde endometriozis vardır [41,42]. 15-64 yaş arasındaki 1000 kadından 4'ü her yıl endometriozis nedeniyle hastaneye yatırılmaktadır. Bu oran meme kanserinden biraz daha fazladır. Siyah kadınlarda daha az rastlanmaktadır. Menarştan önce görülmediği halde, 10'lu yaşlardaki sıklığının arttığı bildirilmiştir. Bunların bir kısmı anatomik olarak dışa akım obstrüksiyonu bulunan olgulardır. Genellikle nulliparlarda görülmesine rağmen sekonder infertilitede de hekim dikkatli olmalıdır [43].

Tanı, Semptom ve Bulgular

Endometriozis asemptomik olabilir. Ancak subfertilitesi, dismenore ve disparoni veya kronik ağrısı olan kadınlarda endometriozisten şüphelenilmelidir. Ağrısız menstrüasyonlardan yıllar sonra başlayan dismenore varlığında endometriozis akla getirilmelidir. Dismenore, sıklıkla menstrüel kanamadan önce başlar ve menstrüel dönem boyunca devam eder. Ağrı çoğu zaman bilateraldir, yayılımı değişkendir. Bazı kadınlarda yaygın endometriozis olmasına rağmen, ağrı az olabilir veya hiç olmayabilir. Bazen de minimal endometriozisi olup, şiddetli ağrı tanımlayan hastalar görülebilir. Şiddetli pelvik ağrı, derin infiltre endometriozis ile uyumludur [43,44]. Endometriozisli hastalarda ağrıya neden olan olası mekanizma, lokal periton inflamasyonu, doku hasarı ile birlikte olan derin infiltrasyon, adhezyon formasyonu, fibrotik kalınlaşma ve endometriozis implantlarında menstrüel kanın birikimi ve dokuların fizyolojik hareketine bağlı ağrılı çekilmedir [45,44]. Ağrı pelviste yaygın olabilir veya sıklıkla rektumda

lokalizedir. Lokal semptomlar rektum, üreter ve mesane tutulumundan kaynaklanabilir. Aşağı bel ağrısı oluşabilir. Üreterde blokaj olursa, sıklık ağrı, dizüri ve hematüri ile sonuçlanabilir. Ekstrapelvik endometriozis, sıklıkla asemptomatik olduğu halde, ağrı ve palpabl bir kitlenin semptomlarının, pelvis dışında sıklık paternde ortaya çıkması ile karakterizedir. İntestinal kanal tutulumu (özellikle kolon ve rektum), ekstra pelvik hastalığın en sık rastlanan şeklidir. Karın ve bel ağrısına, abdominal distansiyon, sıklık kanama, konstipasyon ve obstrüksiyona neden olabilir. Umbilikal bölgede palpabl kitle ve sıklık ağrı durumunda “umbilikal endometriozis” den şüphelenilmelidir.

Endometriozis orta derecede veya şiddetli ise, overleri içine almış ise ve oluşan adhezyonlar tubo-ovaryan motiliteyi ve ovum pick-up’ını bloke ediyorsa subfertilite ile bağlantılı olabilir. Bu etki primatlarda ve babunlarda da gösterilmiştir. Bir çok mekanizma (ovulasyon fomksiton bozukluğu, luteal yetmezlik, *luteinize unruptured follicle sendrom’u*, tekrarlayan düşükler, değişen immunité ve periton boşluğunda enflamasyon) ortaya konulsa da, fertilite ile minimal veya hafif endometriozis ilişkisi hala tartışmalıdır. Tuba ligasyonu sırasında endometriozis saptanan bir dizi asemptomatik kadına dayanarak, endometriozis prevalansının, endometriozisli infertil kadınlarda, fertillerden daha yüksek olmadığı görülmüştür. Fertil kadınların % 80’inde minimal veya hafif, % 20’sinde orta veya ciddi endometriozis bildirilmiştir [3,46]. Kontrollü retrospektif çalışmalarda endometriozisli hastalarda, normal populasyona kıyasla spontan abortus oranında artış olduğu (%40) görülmüştür [47,48]. Spontan abortus oranının cerrahiden sonra düştüğü, ek bir tedavi yapılmasa da azaldığı bildirilmiştir [48]. Hastalığın evresi ile abortus oranı arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Yapılan bir çok çalışmada da, habituel abortus ve spontan abortus oranında, endometriozisli hastalarla normal kadınlar arasında bir fark olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle endometriozis ve spontan abortus ilişkisini yeterince ortaya koymak güçtür [49-51].

2.2. Endometriosis ve İnfertilite

İnfertilite, bir çiftin bir yıl süre boyunca, düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır [52]. İnfertilite tanısının sadece bir yıllık bir süre göz önüne alınarak koyulması epidemiyolojik olarak daha yüksek bir oranın elde edilmesine neden olabilir. Zira, bir yıl boyunca gebelik elde etmeyi başaramayan çiftlerin %50'sinin ikinci yıl sonunda gebelik elde etme konusunda başarılı oldukları gösterilmiştir. İnfertilite prevalansı toplumda yaklaşık %10-15 olarak belirlenmiştir [53]. İnfertilite basit bir medikal problem değil, aksine çiftleri sosyal, psikolojik, bedensel ve ekonomik yönden de etkileyen, geniş çaplı düşünülmesi gereken bir sağlık sorunudur. Bu soruna çözüm bulmak için çok sayıda araştırma yapılmış ve önemli gelişmeler elde edilmiştir. ÜYT'de başarı, hastaların uygun olarak değerlendirilmesine, uygun tedavinin planlanmasına, uygun tekniklerin kullanılmasına ve hasta uyumuna bağlıdır. Halen ÜYT'de başarıyı arttırmak için çalışmalar sürmektedir. ÜYT başarısını etkileyen en önemli 3 faktör; embriyo kalitesi, endometriyum reseptivitesi ve transfer tekniğidir. Tüm bu basamaklarda oluşacak problemler başarı oranını azaltacaktır. Örneğin oluşturulan suprafizyolojik gonadotropin ve östrojen serum seviyesi oosit ve embriyo kalitesini bozabilir [54].

Endometriosis, reproduktif çağıdaki kadınların % 5-15'ini etkilediği düşünülen bir hastalıktır. Ancak infertilite tanısı koyulmuş kadınlarda görülme sıklığı %30-40'lara kadar çıkmaktadır. Endometriosisin infertilite etiolojisine olan katkısının; over, tuba ve endometrium fonksiyonları üzerindeki negatif etkileri ile olduğu ileri sürülmektedir [55]. Endometriosisin infertiliteye direk sebep olduğu veya fekunditede azalma nedeni olduğu hipotezi halen tartışmalıdır. Endometriosis ve infertilite arasında bir ilişki olduğunu destekleyen pek çok kanıt bulunmakla birlikte, çok net bir neden-sonuç ilişkisi halen kurulabilmiş değildir. Ancak, endometriosis pelvik adezyonlara ve pelvik anatomide bozulmalara neden olmaktadır ve bu sonuçların fertilitateye negatif etkisi bulunmaktadır. Normal çiftlerde bir aydaki fekundite oranı

% 15 – 20 arasında değişmektedir ve bu oran kadın partnerin yaşı ilerledikçe azalmaktadır [56,57]. Endometriozis tanısı alan ve tedavi edilmemiş kadınlarda fekdite oranını net olarak ortaya koymak kolay değildir, zira literatürde verilen oranlar geniş bir aralıkta bulunmaktadır [58]. Endometriozis bir infertilite sebebi ise, hastalığın eradikasyonunun fekditeyi arttırması beklenmelidir. Ancak, endometriozisi baskılamak için yapılan tedavilerin fekditeyi arttırdığını gösteren bir kanıt yoktur ve bu tedaviler sadece başarılı bir gebelik elde edilmesi için verilecek daha kuvvetli tedavilere başlanma zamanını geciktirmektedir. Evre 3-4 endometriozis hastalarında pelvik yapışıklıkların cerrahi tedavisinin üreme fonksiyonlarını arttırmada etkisi olabileceği düşünülmektedir [59].

Endometriozis ve subfertilite arasındaki bağlantıyı açıklayabilecek çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür [60-62]. Ancak, bu mekanizmaların hiç birisinin fekditeyi kesin olarak azalttığına dair bir kanıt bulunmamaktadır. Sırasıyla şu şekilde özetlenebilir

Bozulmuş Pelvik Anatomi: Endometriozisten kaynaklanan pelvik yapışıklıklar overlerden oositlerin elde edilmesi mekanizmasını etkileyebilir ve/veya oositin fimbriyalar tarafından yakalanmasını ve taşınmasını engelleyebilir [63].

Periton Fonksiyonlarında Bozulma: Endometriozisi olan kadınlarda peritonda bulunan sıvı miktarında ve bu sıvı içerisindeki prostaglandin, proteaz, inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, TNF-a) ve anjiyojenik sitokinlerin (IL-8, VEGF) konsantrasyonlarında artış olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir [64-68]. İnflamatuvar sitokinlerin endometriozisi olan kadınların serumlarında artmış olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur ve bu bulgu endometriozisin sistemik inflamatuvar yanıtı da neden olduğunu öne sürmektedir. Ancak bu inflamasyonun endometriozise neden mi olduğu veya endometriozisin bir sonucu mu olup olmadığı konusu

belli değildir. Endometriozisi olan hamster farelerinin periton sıvılarında oosit ve fimbriya interaksiyonunu bozan bir oosit yakalama mekanizması inhibitörünün varlığı gösterilmiştir [69]. Sonuç olarak bu faktörlerin oosit, sperm, embriyo veya fallop tüpü fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri olabileceği ileri sürülmüştür [70].

Hormon ve Hücre Fonksiyonlarında Bozulma: Endometriozis tanısı almış kadınların endometriyum dokularına lenfosit, IgG ve IgA antikor miktarlarında artış olabilmektedir. Bu anormal artış endometriyum reseptivitesi veya embriyo implantasyonu üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. Endometriozisi olan bazı kadınlarda endometriyum kaynaklı bazı antijenlere karşı gelişmiş oto antikorların varlığı gösterilmiştir [70].

Hormonlar ve Ovulasyon ile İlgili Bozukluklar: Endometriozisi olan kadınlarda ovulasyon ile ilgili veya endokrinolojik çeşitli bozukluklar olduğu öne sürülmektedir. Bunlar; luteinize rüptür olmamış folikül sendromu, luteal faz boukluğu, foliküllerde anormal büyüme, prematür ve özellikle çoklu sayıda luteinize edici hormon (LH) artışlarıdır [63]. Endometriozisin, menstruasyonun foliküler fazında uzama ve serum östrojen düzeylerinde azalmaya, aynı zamanda luteal fazda LH'ye bağlı salgılanan progesteron düzeylerinde azalmaya neden olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur [71,72]. Buna karşın, endokrinolojik bozuklukların gebelik sonuçlarına olan etkileri ortaya koyulabilmiş değildir [59].

İmplantasyonda Bozulma: Endometriyum fonksiyonlarının bozulmasının endometriozis hastalarında fekunditenin azalmasına neden olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. İmplantasyon esnasında, bir hücre adzeyon molekülü olan $\alpha\beta3$ integrin'in endometriyum dokusundaki ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. Ancak bu sonuç daha sonraki çalışmalarda tekrar gösterilememiştir [73]. Daha yeni çalışmalarda; endometriyum dokusunda

L-selektin (Blastokist yüzeyindeki trofoblastlarda bulunan bir protein) için ligand görevi üstlenen bir proteinin, endometriozisli infertil kadınlarda daha düşük seviyede olduğu da gösterilmiştir [74-78].

Uterus ve Tubalar Arası Taşınım: Endometriozisli hastaların fizyolojik uterotubal taşınım kapasitelerinde azalma olduğu ileri sürülmektedir. Histerosalpingosintigrafi (HSSG) ile yapılan bir çalışmada kontrol hastalarına göre endometriozisli hastalarda uterotubal taşınımında bozukluk oranının yüksek olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır [79].

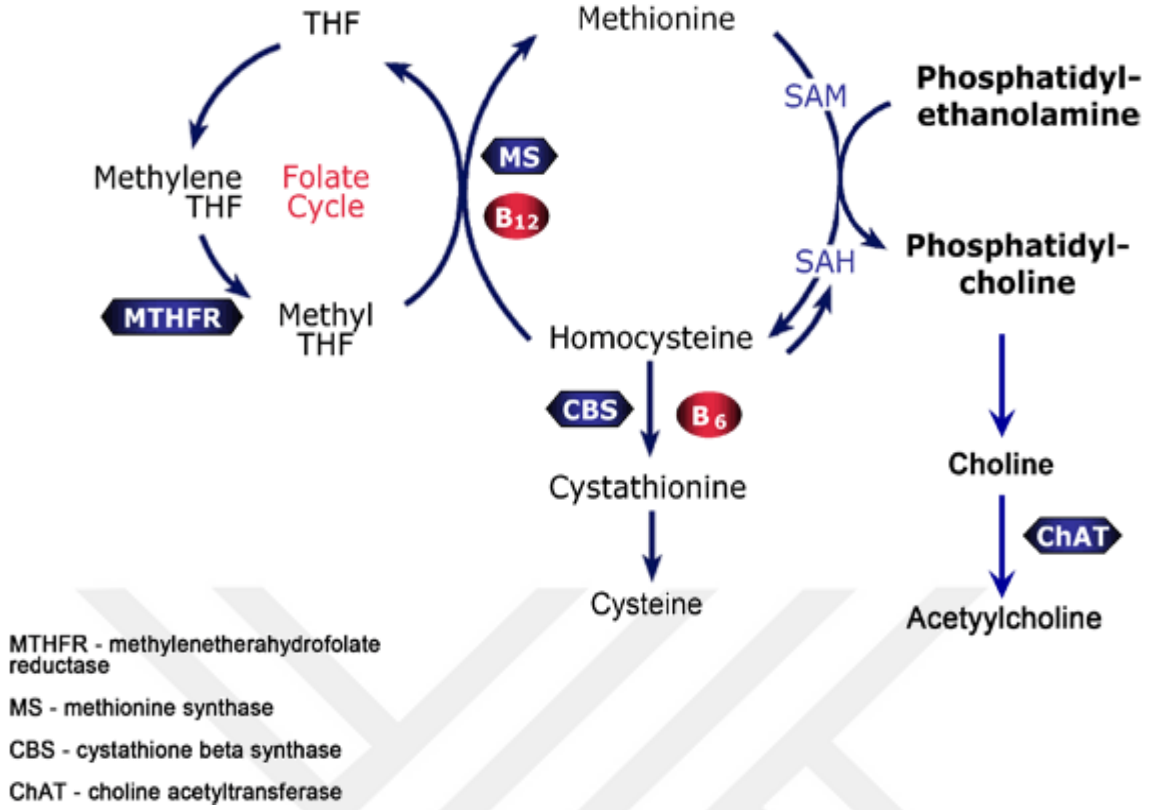
Oosit ve Embriyo Kalitesi: Endometriozisli kadınlarda infertilitenin; folikülde gerçekleşen çeşitli değişiklikler, oosit ve sonrasında embriyogenez kalitesinde bozulma ve endometriyum reseptivitesinde azalmaya bağlı olarak gerçekleşebileceği öne sürülmektedir. Endometriozisli kadınların folikül sıvılarındaki sitokin ve progesteron düzeylerinde gözlenen değişiklikler bu teoriyi desteklemektedir [80]. Endometriozisli kadınlarda oosit ve embriyo kalitesinde bozulmalar da gösterilmiştir. Bir çalışmada, endometriozisli hastalardan alınan embriyoların, tubal faktörü bulunan ama endometriozisi olmayan hastalardan alınan embriyolara göre daha yavaş geliştikleri gösterilmiştir [81]. Endometriozis tanısı olmayan kadınlardan alınan oositlerin, oosit donasyonu ile orta-ağır düzey endometriozis hastası kadınlara verildiği sikluslarda endometriyum reseptivitesi ve gebelik oranlarında azalma izlenmemiştir. Ancak, endometriozis hastası kadınlardan alınan oositlerin normal kadınlara verildiği donasyon sikluslarında ise embriyo kalitesinde azalma ve implantasyon oranlarında düşme izlenmiştir [82].

2.3 Homosistein

Homosistein (Hcy) metionin metabolizması esnasında oluşan ve yapısında sülfür bulunduran bir aminoasittir ancak protein sentezinde yer almamaktadır. Hcy'nin metabolizmasında remetilasyon ve transsülfürasyon reaksiyonları önemlidir. Remetilasyon döngüsünde Hcy, metiyonin sentazın (MS) katalizlediği reaksiyonda metil grubu alarak kurtarılır [83]. B12 vitamini (kobalamin), MS için esansiyel bir kofaktör olarak görev yapar. N5-metil-tetrahidrofolat ise bu reaksiyonda metil donörü olarak görev yapar. N5, N10-metiltetrahidrofolat redüktaz (N5, N10 MTHFR) ise remetilasyon sürecinde katalizördür. Ortamda fazla metionin bulunduğunda veya sistein (Cys) sentezi gerektiğinde Hcy, B6 vitaminine bağlı sistationin beta sentazın (CBS) katalizlediği reaksiyonda sistationin oluşturmak üzere serin ile birleşir. Sistationin daha sonra Cys'e hidrolize olur. Cys ya GSH'a bağlanır veya sülfata metabolize olarak idrarla atılır [84]. Hcy metabolizması Şekil 1' de ana hatları ile görülmektedir.

2.3.1 Homosisteinin Değerleri ve Fizyolojik Özellikleri

Normal toplam Hcy konsantrasyonu açlıkta 5 ile 15 $\mu\text{mol/L}$ arasında değişir [83,85,86]. Kang ve arkadaşları homosisteinemi 15 ile 30 $\mu\text{mol/L}$ arasında hafif, 30 ile 100 $\mu\text{mol/L}$ arasında orta, 100 $\mu\text{mol/L}$ ' nin üzerinde de ağır olarak sınıflamıştır [87]. En sık kullanılan tHcy ölçüm yöntemi, yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) ve floresan tanımlama yöntemidir [85,88].



Şekil 1: Homosistein metabolizması

Yetişkinlerde normal plazma total homosistein (tHcy) düzeyi 10 $\mu\text{mol/L}$ civarındadır. Hcy üretimi ve metabolizması normal şartlar altında denge halindedir. Ancak artmış üretim durumunda Hcy hücrelerden atılır, serumda veya idrarda tespit edilebilir [85]. Plazmada, total homosisteinin %70'i proteinlere bağlanarak, %25'i disülfid bağı ile birbirlerine bağlanarak (disülfid homosistein) ve %5'i de homosistein tiolakton halinde bulunur [89]. Total Hcy düzeyi (tHcy); cinsiyet, yaş, genetik yapı, hormonal durum, diyet, vitamin eksikliği veya vitamin preparatlarının kullanımı, fiziksel aktivite, çeşitli ilaçlar ve bazı hastalıklar gibi pek çok faktörün etkisi altındadır. tHcy düzeyleri ve serum kolesterol düzeyleri, kan basıncı, sigara, diyabet ve renal fonksiyonlarla arasında da belirlenmiş bir ilişki mevcuttur [88]. Östrojen, tHcy konsantrasyonunu beslenme ve kas kitlesinden bağımsız olarak düşürdüğü için, erkeklerde Hcy kadınlara göre 1 $\mu\text{mol/L}$ daha yüksek olabilir [89]. Çocuklarda erişkinlere göre %30 daha düşüktür. Postmenopozal hormon replasman tedavisi Hcy düzeyini

%10-15 oranında düşürür [90]. Aynı şekilde oral kontraseptif kullanımı ve gebelik de Hcy düzeyini düşüren faktörlerdendir [90,91]. Hcy kısaltması genellikle hem serbest homosistein, hem de oksidize formlarını anlatmakta kullanılır. Total homosistein (tHcy) denildiğinde ise; plazma veya serumun redüktan bir madde ile karşılaştırılması sonucu tüm formların sülfhidril şekillerine dönüştürülmesi sonucu elde edilen konsantrasyon ifade edilmektedir.

2.3.3. Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri

1- Genetik bozukluklar:

Sistasyonin beta-sentaz eksikliği: Bu enzim eksikliğinin homozigot formu; konjenital homosistinüri olarak adlandırılan ağır hiperhomosisteineminin en sık karşılaşılan genetik nedenidir [92]. Konjenital homosistinüri; otozomal resesif geçişli bir hastalık olup 1 / 200000 doğumda görülür. Bu hastalığın homozigot formunda Hcy düzeyi 400 µmol/L'ye kadar çıkabilir. Klinik bulguları ektopik lens, iskelet bozukluğu, mental retardasyon, tromboembolizm ve ağır prematur aterosklerozdur. Aterotrombotik komplikasyonlar sıklıkla genç yaşta ortaya çıkar ve ölümcüldür. Heterozigotlarda ise klinik bulgular daha az belirgindir [92].

FHMT (5- metiltetrahidrofolat homosistein metil transferaz) eksikliği : [93]

N5 – N10 metilentetrahidrofolat redüktaz eksikliği: Ağır homosisteinemiye neden olur [93].

2–Beslenme Bozuklukları :

Vitamin B12, B6 ve folat eksikliği: Hiperhomosisteinemili hastaların 2/ 3'ünde ilgili vitaminlerden bir veya daha fazlasının eksik olduğunu öne süren çalışmalar vardır [94,95].

3 – Diğer Nedenler :

Kronik hastalıklar:

- **Kronik böbrek yetmezliği:** Kreatinin artışının plazma Hcy seviyelerini dört kata kadar yükseltebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [96,97].
- **Hipotiroidi:** Birkaç çalışmada hipotiroidisi olan hastalarda Hcy konsantrasyonunun arttığı ve bunun vasküler hastalık sıklığı ile ilişkili olduğu savunulmuştur [98].
- **Kronik gastrit:** Helikobakter pilori enfeksiyonunda folat eksikliğine bağlı olarak Hcy seviyelerinde yükselme bildirilmiştir [99].
- **Pernisiyöz anemi:** 404 hastanın katıldığı bir kobalamin eksikliği çalışmasında hastaların %96'sında serum Hcy seviyeleri ortalamanın üç standart sapma üstünde bulunmuştur [98].

Bazı kanserler

- Meme, over ve pankreas kanserlerinde, akut lenfoblastik lösemide Hcy seviyeleri yüksek bulunmuştur [100].

Bazı ilaçlar ve toksinler

- Nitröz oksit:** Vitamin B12 metabolizmasını bozarak Hcy seviyesini artırır.
- Teofilin ve sigara:** Bu etkenler piridoksal metabolizmasını antagonize ederek Hcy yüksekliğine neden olurlar [101-103].
- **Metotreksat, fenitoin, kolestipol ve niasin:** Bu ilaçlar folat metabolizmasını etkileyerek Hcy seviyelerini artırır. Blankenhorn ve arkadaşları niasin ve kolestipol alan koroner hastalarında Hcy seviyelerini normal sağlıklı insanlara göre daha yüksek bulmuşlardır [101,102].

Bu ilaçların aksine tamoksifenin ve penisilaminin Hcy seviyelerini belirgin derecede azalttığı gösterilmiştir [104].

Diğer hastalıklar [105]

- Diabetes mellitus
- Ağır psöriazis
- Sistemik lupus eritematozus

2.3.4 Hiperhomosisteinemi ve Etkileri

Hücre içi Ca^{+2} artışı ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile apoptozun gerçekleşmesi, Hcy metabolitlerinin yol açtığı bir durumdur. Bu sebepten dolayı, Hcy düzeyinin artması, nörodejeneratif etkiler için potansiyel bir kaynak olmaktadır [106]. Hcy'in çeşitli düzeylerde damar endotelinde fonksiyon bozukluğuna neden olduğu kabul edilmektedir ancak mekanizma tam olarak açıklanamamış değildir. Hcy'in Faktör V, X ve XII'nin aktivitesini artırdığı, protein C aktivasyonunu baskıladığı, endotelin normal antitrombotik özelliğini değiştirdiği ve protrombotik bir ortam yaratarak trombin oluşumunu hızlandırdığı ile ilgili çalışmalar vardır [107]. Aynı zamanda, Hcy'nin oksidatif hasar yarattığını ortaya koyan kanıtlar da giderek artmaktadır [108]. Bedaiwy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yüksek doz oksijen radikallerinin yol açtığı oksidatif hasarın, embriyo kültürlerinde daha düşük klivaj ve yüksek fragmentasyon oranına sebep olduğu bulunmuştur [109].

Homosistein, plazmada okside olurken ROS oluşturarak lipid peroksidasyonunu başlatır [108]. Normal endotel hücreleri, Hcy'nin toksik etkilerini ortadan kaldırmak için nitrik oksit (NO) salgılar. NO, damar direncinin sağlanmasında, trombosit agregasyonunda, bağışıklık sisteminde, dişi ve erkek üreme sisteminde, sinir iletimi ve çeşitli hormonların üretilmesi gibi tüm vücut sistemlerinde yaşamsal dengenin korunmasında anahtar rol oynamaktadır. NO'nun bu koruyucu etkisi, endotelin uzun dönemli yüksek Hcy değerlerine maruz kalması sonucunda bozulur. Çünkü Hcy, lipid peroksidasyonuna yol açarak endotelial NO sentaz salınımını

azaltır. Endotel, Hcy kökenli oksidatif hasara maruz kalır ve endotel fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar [107]. Sonuç olarak yüksek Hcy seviyesinin toksik etkisi oksijen radikal üretiminden kaynaklanır.

Folik asit ve Hcy ilişkisi pek çok çalışmada vurgulandığından kısaca folik asit hakkında da bilgi vermek gerekir. Folik asit Hcy'nin metiyonine remetilasyonunda yer almaktadır ve kobalamin bu enzimatik reaksiyon içerisinde kofaktör olarak görev yapmaktadır. Bu metabolizmanın düzeni, çeşitli sebeplerle (Diyete bağlı ya da genetik nedenlerle) ortaya çıkan folik asit eksikliği tarafından bozulmakta ve Hcy düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır [110]. Folik asit metabolizması genom bütünlüğünün sağlanması için anahtar role sahiptir ve bu dengede çok önemli bir yeri vardır. Folik asit aminoasit metabolizmasında, pürin ve pirimidin sentezinde, nükleik asitlerin, proteinlerin ve yağların metilasyonunda rol alır. Hcy yüksekliğine bağlı problemler aslında bir yandan da bahsedildiği gibi folik asit ve kobalamin eksikliğinin sonucu ortaya çıkan sorunlardır. Bir meta analiz sonucuna göre günlük 0,5-5 mg folik asit ve yaklaşık 0,5 mg vitamin B12 kullanımı serum Hcy değerlerini %25-30 oranında düşürmektedir [111]. Yapılan başka bir çalışmada infertil erkeklerde serum folik asit, B12 değerleri düşük ve tHcy değerleri ise yüksek bulunmuştur [112]. Boxmeer ve ark.'nın çalışmasında ise tam tersine infertil ve fertil erkek hastaların serumlarında folik asit, B12 ve tHcy değerleri arasında fark bulunmamıştır [113]. Subfertil erkekler üzerinde yapılmış başka bir araştırmada, 26 hafta boyunca günlük 5 mg folik asit ve 66 mg çinko verilen hastaların sperm sayılarında % 74'e varan artış tespit edilmiştir. Sadece folik asit verilen gruptaki artış ortalama % 40 olarak bulunmasına rağmen, kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir [114]. Folikül sıvısındaki Hcy düzeyleri üzerine yapılan çalışmalarda, folik asit desteği alan hastaların folikül sıvılarındaki Hcy düzeylerinin almayanla göre daha düşük olduğu bulunmuştur [115,116]. Syzmanski ve ark. bu bulguya ek

olarak, folik asit kullanan hastaların oosit kalitelerinin daha iyi ve elde edilen matür oosit sayısının daha yüksek olduğunu tespit etmiştir [116]. Sonuç olarak prekonsepsiyonel folik asit kullanımı foliküler sıvıdaki Hcy seviyelerini düşürmektedir. [117].

İnsülin de Hcy seviyesini etkileyen diğer bir parametredir. Hiperinsülinemi veya insülin direnci plazma Hcy değerlerini yükseltmektedir [118,119]. Bir çalışmada PCOS ve insülin direnci olan infertil kadın hastalarda yüksek serum Hcy değerleri bulunmuştur. Bu da düşük implantasyon ve yüksek abortus oranları ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada metformin ve B grubu vitamin kullanımının Hcy değerlerini düşürdüğü de gösterilmiştir[120].

Hcy ile östrojen arasındaki ilişkiyi değerlendiren çeşitli çalışmalar mevcuttur. ÜYT uygulanan hastaların serumlarında Hcy değerleri azalmaktadır. Bunun sebebi de E2 'nin sistationin B sentaz aktivitesini arttırması ve Hcy katabolizmasının artmasıdır [117,121,122]. Östrojen tedavisi gören postmenopozal kadınlarda da kandaki Hcy değeri düşmektedir [123]. Bazı çalışmalarda da buna benzer şekilde östrojen kullanan postmenopozal kadınlarda piridoksin ve kobalamin seviyesi düşük bulunmuştur. Postmenopozal kadınlardaki östrojen tedavisi total Hcy seviyesini düşürür. Hak ve ark.'nın pre ve postmenopozal kadınlarda östrojen tedavisiyle plaseboyu karşılaştıran çalışmalarında E2 ve tHcy seviyesi arasındaki ters ilişki gösterilmiştir [124]. Benzer olarak Cagnacci ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada östrojen tedavisi alan postmenopozal kadınlarda kobalamin seviyesinin düştüğünü göstermişlerdir [125]. Bettchar ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada ise tüm bu bulguların tersine östrojen ve Hcy arasında ilişki saptanmamıştır [126].

2.3.5. Hiperhomosisteinemi ve Kadın İnfertilitesi

Hcy seviyesindeki değişiklikler her iki cinste de fertiliteyi etkilemektedir [127,128]. Temel olarak yüksek Hcy seviyesinin ROS üretimi üzerinden gonad hücrelerini ve dolayısıyla fertiliteyi olumsuz etkilediğı öne sürülebilir. Berker ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada foliküler sıvıda bulunan Hcy seviyeleri, polikistik over sendromu (PCOS) olan ve ÜYT uygulanacak hastalarda fertilizasyon oranını, oosit ve embryo kalitesini belirlemede önemli bir belirleyici faktör olarak gösterilmektedir [129]. Açıklanamayan infertilite tanısı olan hastalara oranla endometriozisi olan kadınların folliküler sıvılarında Hcy seviyeleri Ebisch ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada aynı zamanda, foliküler sıvıdaki yüksek Hcy konsantrasyonlarının (14.7 µmol/L ve üstü) embriyo kalitesini düşürdüğü gösterilmiştir[121]. Benzer sonuçlar Szymanski ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da elde edilmiş ve Hcy düzeyi düşük hastalarda matür oosit sayısının yüksek olduğu bulunmuştur [116]. Tüm bu sonuçların aksine Jerzak ve arkadaşları, Hcy seviyelerinin ÜYT başarısını öngörmeye belirleyiciliğı olmadığını göstermiştir [130]. Miyazaki ve arkadaşları ise belli bir miktar oksijen radikalının oosit maturasyonu için gerekli olduğunu bulmuşlardır [131]. Tüm bu bilgilere rağmen, kontrollü over hiperstimülasyonunun (KOH), matur folikül ve oositteki Hcy yoluna etkisi tam olarak açıklanabilmiş değildir [122]. Öcal ve arkadaşları ise foliküler sıvıdaki düşük seviyede bulunan Hcy seviyesi ile klinik gebelik şansının arttığını göstermiştir [132].

2.3.6 Hiperhomosisteinemi ve Erkek İnfertilitesi

Spermatogenezisin endokrin, genetik ve çevresel faktörlerden etkilendiğı bilinmektedir [133,134]. Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, İskoç androlog John MacLeod'un aerobik şartlarda enkübe edilen insan spermatozoalarının hareketliliğinin katalaz

eklenmesi ile arttığını göstermesi ile ortaya koyulmuştur. MacLeod'a göre insan spermatozoası hidrojen peroksit (H_2O_2) üretebilmektedir ve bu oksidan maddenin varlığı da sperm fonksiyonlarına zarar vermektedir [135]. Semendeki ROS kaynağı spermatozoa ve fagositik lökositlerdir. Serbest radikaller fizyolojik koşullarda spermatozoanın hiperaktivasyonunda, kapasitasyonunda ve füzyonunda önemli rol oynarlar [136]. Serbest radikallerin zararlı etkilerini kontrol altına almak üzere seminal plazmada enzimatik ve non-enzimatik defans mekanizmaları mevcuttur. ROS açısından dengenin oksidan sistem lehine bozulduğu durumlarda hücre fonksiyonları olumsuz yönde etkilendiği bilinmektedir. Semende bu dengede pro-oksidanlar lehine bir bozulma olduğunda sperm üzerinde oksidatif stres indüklenir ve özellikle motilitede azalma olmak üzere sperm fonksiyonlarında bozulma meydana gelir [137]. ROS'un sperm metabolizması, morfolojisi, motilitesi ve fertilizasyon kapasitesi üzerinde zararlı etki yaptığı gösterilmiştir. Fertil erkek popülasyonu ile karşılaştırıldığında, infertil erkeklerin büyük kısmının seminal plazmalarında ROS düzeylerinde artış olduğu bulunmuştur [138]. Diğer taraftan, semende antioksidanlarda bir düşüşün meydana gelmesi de idiyopatik infertilite ile ilişkilidir [139]. ROS üretimindeki artış, antioksidan enzim aktivitesini inhibe edebilir ve oluşan potansiyel oksidatif stres sonucunda, infertiliteye sebep olabilecek lipid peroksidasyonu artar, sperm motilitesi, canlılığı ve fonksiyonları azalır. Alkan ve arkadaşları idiyopatik infertilitesi olan hastalar ve sağlıklı donörlerin spermlerini ROS üretimi yönünden incelemişlerdir. Sonuç olarak da düşük seminal plazma antioksidan aktivitesinin ve yüksek ROS üretiminin idiyopatik infertiliteden sorumlu olabileceğini göstermişlerdir [140]. Lewis ve arkadaşları genel infertil popülasyonda seminal plazmada % 40 oranında ROS değerlerinde artış bulmuşken, bu oranı varikoseli olan infertil popülasyonda %80 olarak saptamışlardır [141]. Seminal yüksek ROS düzeyleri sonucunda, membran yağ asitlerinin peroksidasyonu ile sperm fonksiyonlarının ve canlılığının azaldığı bildirilmektedir. İnfertil erkeklerin % 40'ında görülen yüksek seminal

plazma ROS düzeylerinin ÜYT sonuçlarıyla ters orantılı olduğu ve bu erkeklerde, ROS seviyeleri düşük bulunan infertil erkeklere göre beş kat az gebelik olasılığı bulunduğu bildirilmektedir [142]. Ebisch ve arkadaşları, 2006 yılında yaptıkları 156 olguluk çalışmada ejakulattaki Hcy konsantrasyonunun 1 $\mu\text{mol/L}$ azalmasının ÜYT prosedüründe yüksek kaliteli embriyo elde etme şansını iki kata kadar arttırabildiğini bildirmişlerdir [121].



2.4. Embriyo Kalitesinin Belirlenmesinde Fonksiyon Araştırmaları ve Metabolomik Profil

ÜYT ile ilk klinik gebelik ve doğum başarısı 1978 yılında yaşanmıştır [143]. Ardından bir siklusta birden fazla embriyo gelişimini hedefleyen kontrollü ovaryan hiperstimulasyon protokolleri geliştirilmeye başlanmıştır [144]. 1984 'de embriyonun klivaj oranları ve morfolojisi ile korele olarak implantasyon oranlarının da arttığı gösterilmiştir [145]. Sonrasında ise embriyonun bu özelliklerine dayanan evreleme (gradeleme) sistemi oluşturuldu [146-150]. Tüm bu bilgiler ışığında ÜYT' de başarıyı etkileyen çok önemli parametrelerden birisi mümkünse en kaliteli embriyonun belirlenmesi ve olabildiğince atravmatik bir şekilde endometriyum kavitesinin uygun yerine transfer edilmesidir. Dolayısıyla, ÜYT'nin en önemli yönü embriyo seçimidir. Günümüzde embriyo kalitesinin belirlenmesinde morfolojik kriterler kullanılmaktadır. Ancak bu kriterlere göre seçilen her embriyonun aslında gerçekte kaliteli embriyo olamayabileceği akıllara soru olarak gelmiştir. Çünkü iyi embriyo kalitesine rağmen ideal gebelik oranına ulaşamamıştır. Morfoloji kriterleri kullanılarak yapılan embriyo seçiminde implantasyon oranları 3. gün transferinde %49 oranlarını aşmamaktadır [150]. Bu düşünce ile embriyoların fonksiyonel açıdan kalitesi ya da iyilik halinin belirlenmesine yönelik araştırmalara hız verilmiştir. Morfolojik kriterlere ek ya da tek başına kullanılabilecek teknolojik yaklaşımlar (genomik, proteomik ve transkriptomik) araştırılmıştır. Fakat bu ölçümler invaziv biyopsi olmadan doğrudan yapılamamaktadır ve çok fazla zaman almaktadır. Diğer yandan çoğul gebelik riskinin azaltılması için birçok ülke tekli embriyo transferi protokolüne geçmiştir. Bu da kaliteli embriyo seçiminin önemini daha da arttırmıştır [151].

Geçmişte hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan birçok çalışma göstermiştir ki, embriyo, bir şekilde kendisini çevreleyen kültür ortamını değiştirmektedir. Bir biyolojik sistem içerisinde

bulunan tüm küçük moleküllü metabolik artıkların değerlendirilmesi sonucunda elde edilen veri “metabolom”u oluşturur ve de o sistemin fonksiyonel fenotipinin bir göstergesi olarak kullanılabilir [152]. Zengin ve dinamik bir özellik gösteren ve aynı zamanda fonksiyonel fenotipin değerlendirilmesinde yardımcı olan bu metabolit envanterinin sistematik olarak incelenmesi ise “Metabolomik” dalı olarak isimlendirilmiştir. Metabolomik; çeşitli spektral ve analitik yaklaşımlar aracılığıyla, metabolitlerin fizyolojik ve patolojik durumlar ile oluşan değişimlerini ve bu değişimlerin karşılaştırılmasını sağlar [153]. Embriyonun kalitesini belirlemek açısından metabolomik; glukoz, laktat, piruvat ve aminoasit seviyelerini embriyo kültür ortamında ölçme ve bu yolla embriyonun oksijen tüketimini değerlendirme veya embriyonun metabolizmasını analiz etmeye dayanan, hızlı sonuç veren noninvaziv bir yöntemin öne sürülmesini sağlamıştır [153]. Bu ölçümler optik ya da non-optik spektroskopilerle yapılabilmektedir. Embriyo kültür ortamında metabolomik profil analizi, proton nükleer manyetik rezonans (HNMR) kullanılarak değerlendirilmiştir [154]. Yapılan bir çalışmada; tek başına ya da morfolojik değerlendirmeye beraber ele alınan viabilite skorunun (embriyo hücre kültür ortamında metabolomik profilinden ortaya çıkarılan skorum sistemi), tek başına morfolojik değerlendirmeye kıyasla 5. gün tek embriyo transferi yapılan kadınlarda gebelik sonuçlarını daha iyi öngörebilmektedir [155]. Randomize kontrollü yapılan bir çalışmada ise bunun aksine tek başına ya da morfolojik değerlendirmeye beraber ele alınan viabilite skoru ile tek başına morfolojik değerlendirme yapılması arasında 3. gün tek embriyo transferi yapılan kadınlarda fark bulunmamıştır [156]. Lydie ve ark yapmış olduğu başka bir çalışmada da metabolomik profilinin tek başına embriyo kalitesi değerlendirmede yeterli olmadığı gösterilmiştir [157]. Dolayısıyla non invaziv, hızlı, doğru bir şekilde embriyo viabilitesini belirlemeye yönelik testler ile ilgili çalışmalar henüz devam etmektedir.

3. MATERYAL ve METOD

Mart 2013 - Eylül 2014 tarihleri arasında İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Tüp Bebek Ünitesine infertilite nedeniyle ÜYT için başvuran ve endometriozis tanısı olan toplam 17 olgu çalışma grubunu oluşturmak üzere dahil edildi. Kliniğimizde daha önce Dr. Burcu Aydın tarafından yapılan tez çalışmasında yer alan hastalar taranarak, endometriozis tanısı olan 2 olgu da çalışma grubuna dahil edildi [158]. Aynı çalışmada endometriozis tanısı olmayan 38 olgu kontrol grubunu oluşturdu. Toplam 57 olgu çalışmaya dahil edildi. Çalışma İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı. İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi (Proje No:40275). Hastaların anamnezi alındı ve jinekolojik muayeneleri yapıldı. Tedavi öncesinde vajinal smearleri kontrol edildi. Olguların hepsine temel infertilite tetkikleri olan spermogram, adetün üçüncü günü hormon profili ve histerosalpingografi yapılarak infertilite nedenleri araştırıldı.

Hormonal Değerlendirme

Çalışmaya alınan olgulardan, erken foliküler fazda (siklusun 3. gününde) hormonal tayin için açlık venöz kan alındı. Siklusun 3. günü alınan kanlardan; FSH, LH, E2, TSH ve PRL düzeyleri floresan immunoassay kitleriyle (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, IN, USA) çalışıldı. AMH düzeyleri enzimatik immunosorbent assay kitleri ile çalışıldı (Diagnostic Systems Lab, Webster, Texas, USA).

Histerosalpingografi (HSG) ile Değerlendirme

HSG adet bitiminden sonraki 2-3 gün içerisinde çekilerek değerlendirildi. HSG’de uterus konturları muntazam, bilateral tüpleri açık ve tüp konturları normal, radyopak maddenin batına yayılımı normal ise HSG de normal olarak kabul edildi. Bilateral veya tek taraflı

tüpleri açık olmayan, tüp konturları normal olmayan, radyoopak maddenin batına yayılımı tek veya iki taraflı olmayanlar ise tuboperitoneal faktör olarak kabul edildi.

Ultrasonografik Değerlendirme

Çalışmaya alınan bütün kadınlara jinekolojik muayeneyi takiben transvajinal (TV) USG yapıldı. (Siemens Adara 5,0 Mhz sektör prob ile). TV-USG’de overler, antral folikül sayısı (AFS), uterus boyutu, endometriyum ve myometriyum değerlendirildi.

Spermigram

Semen 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası işlem yapılacağı gün alınarak, sıvılaştıktan sonra değerlendirildi (*WHO’ nun* 2010’ da kararlaştırdığı kriterlere göre normal semen kriterleri: sayı> 15 milyon/ ml, motilite > %40, normal morfoloji> %4). Morfolojik açıdan spermeler Kruger’in kriterlerine göre değerlendirildi. Sperm hazırlanması için gradiyent veya basit sperm yıkama (şiddetli oligozoospermik vakalarda) yöntemleri kullanıldı. Erkek faktörü olup mikro TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) yapılan olgular not edildi.

Ovulasyon Uyarılması ve Oosit Aspirasyonu

Çalışma grubuna 38 yaş altında, sağlıklı, endometriozis dışında bilinen herhangi bir infertilite etkeni olabilecek sistemik ve endokrin hastalıkları olmayan, bazal FSH değeri <10 IU/ml olan, antral folikül sayısı (AFS) 5’in üzerinde ve ilk veya 2. ÜYT siklusu olan yani normal yanıt verebileceğini düşündüğümüz kadınlar dahil edildi. Kontrol grubuna endometriozis tanısı olmayan ve tüm diğer kriterleri sağlayan hastalar dahil edildi.

Endometriozis tanısı, diagnostik laparaskopi veya herhangi bir jinekolojik cerrahi girişim sonrası patolojik değerlendirme için gönderilmiş örneklerde endometriozis tanısının koyulmuş olması ile kesinleştirildi.

Tüm hastalara adet kanamasının 21. gününde konvansiyonel uzun agonist protokolü başlandı (Löprolid asetat- Lucrin daily [Abbott]). Siklusun 3. gününde TvUSG ile overler kontrol edilerek korpus luteum ya da bir over kisti (15 mm'den büyük) yoksa gonadotropinler step- down yöntemiyle uygulandı. Tedavi dozları hastaların yaşları ve VKİ'leri göz önüne alınarak kişiye özgü sırasıyla 275-325-375 IU (30 yaş altı, 30-35 yaş arası, 35 yaş üstü) olarak başlandı.

Kullanılan gonadotropinler; rec-FSH (1ampul=75 IU Gonal-f [Merck-Serono])'dır. 8.günden sonra her gün folikül ve endometriyum ölçümü için TvUSG (5MHz sector prob, Siemens Adara) yapıldı. En az 2 folikül 16-17 mm'yi geçtiğinde LH piki oluşturmak için rekombinant insan koryonik gonadotropini (r-HCG) 250mg sc (Ovitrelle [Merck-Serono]) olarak uygulandı. 36- 38 saat sonra foliküller TvUSG yardımı ile 17 gauge'lik iğneler kullanılarak tek tek aspire edildi. 11 mm ve üzerindeki her folikülün aspirasyonu yapıldı. Oosit toplanması sırasında 17mm'yi geçen matür foliküllerin sıvıları aspire edilerek folikül sıvılarında stereomikroskop altında oositler bulunarak olgunluk derecesine göre sınıflandırıldı. İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemi yapıldı. Transfer edilecek embriyolar 30 µl Vitrolife medyum ile kültüre edildi. Embriyo transfer sonrası 23 µl kültür medyumundan örnek 37 µl Vitrolife medyum ile 60 µl 'ye tamamlanarak laboratuvara gönderildi. 1. aşamada bir cam tüp içerisine R1 reaktifinden 240 µl, örnekten 18 µl, R2 reaktifinden 38 µl alındı. Vortekslenip 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. 2. aşamada 5.dakika sonunda R3 reaktifinden 25µl alınıp karışımın içine pipetaj yapıldı. Daha önceden kitin kalibre edildiği spektrofotometrede 340 nm'de absorbans ölçümü ile okutma gerçekleştirildi. İşlemden yaklaşık 18 saat sonra fertilizasyon açısından değerlendirilerek pronukleus arandı. 40. saatten sonra bölünen konseptusun morfolojisine bakılarak embriyo kalitesinin

sınıflandırılması (preembriyo grading) yapıldı. Embriyo kalitesi sınıflandırılması, 2011 ESHRE İstanbul konsensus çalıştayında belirtilen kriterler doğrultusunda yapıldı [159].

İstatistiksel Analiz

Hesaplamalar için SPSS (Statistical Packet for Social Sciences) for Windows 17.0 istatistiksel paket programı kullanıldı. Örneklem sayılarının her grupta 30'u geçmemesi üzerine, gruplar arası demografik verilerin, klinik verilerin, hormonal ve biyokimyasal ölçümlerin istatistiksel değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Endometriozis grubu ve kontrol grubu arasındaki gebelik orankarının karşılaştırılması için Ki-Kare testi uygulandı. Tüm olgular için kültür ortamında Hcy düzeyinin gebe kalamamayı kestirimi amacıyla Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yapıldı. Tüm değerler ortalama $\pm$ standart deviasyon (SD) ve medyan olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılık sınırı kabul edildi.

4. SONUÇLAR

Çalışmamıza toplam 57 olgu dahil edildi. Bu olguların 19 tanesi endometriozis grubunu 38 tanesi kontrol grubunu oluşturmaktadır. Tüm olgulara uzun protokol GnRH-a tedavisi uygulandı. Tüm hastalar günlük 400 mcg folik asit replasmanı aldı. Grupların demografik özellikleri, hormon değerleri ve embriyolojik parameter sonuçları ortalama $\pm$ standart deviasyon olarak tablo 1’de gösterilmiştir.

Her iki grubunun ortalama yaşları endometriozis grubunda $32 \pm 8,31$; kontrol grubunda ise $31,21 \pm 3,72$ olarak bulundu. Olguların ortalama evlilik süreleri ve infertilite süreleri değerlendirildiğinde; endometriozis grubu için sırasıyla $6,42 \pm 4,15$ ve $5,89 \pm 4,3$ yıl; kontrol grubu için ise sırasıyla $5,93 \pm 3,42$ ve $5,93 \pm 3,42$ yıl olarak bulundu. Total uygulanan gonadotropin dozu açısından ise endometriozis grubunun ortalaması $2673,6 \pm 722,3$ IU; kontrol grubun ortalaması $2284,3 \pm 785,7$ IU olarak belirlendi. Gruplar arasında adet 3. günü hormon parametreleri karşılaştırıldı. Endometriozisli grupta ortalama FSH değeri $7,34,1 \pm 2,57$ ng/ml, kontrol grubunda ise $5,4 \pm 1,59$ ng/ml olarak bulundu ve istatistiki olarak anlamlı fark belirlendi ($p < 0,05$). LH, E2, TSH ve prolaktin değerleri endometriozis grubunda sırasıyla $5,93 \pm 2,42$ ng/ml, $51,67 \pm 24,44$ ng/ml, $2,42 \pm 1,15$ ng/ml ve $15,04 \pm 6,18$ ng/ml; kontrol grubunda ise $4,96 \pm 4,64$ ng/ml, $54,97 \pm 49,58$ ng/ml, $2,19 \pm 1,34$ ng/ml ve $17,58 \pm 8,30$ ng/ml olarak belirlendi. Tüm bu parametreler arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$). AMH düzeyleri karşılaştırıldığında, endometriozis grubunda $2,98 \pm 2,79$ ng/ml, kontrol grubunda ise $3,90 \pm 4,33$ ng/ml olarak bulundu ve istatistiki anlam bulunamadı ($p > 0,05$).

Aspirasyon günü elde edilen total oosit, ICSI yapılan oosit ve fertilize olan oosit sayıları ortalamaları sırasıyla endometriozis grubunda $7,32 \pm 3,11$, $5,16 \pm 2,29$ ve $4,32 \pm 2,4$; kontrol

grubunda ise $8,5\pm3,94$, $5,42\pm2,18$ ve $3,06\pm2,15$ olarak belirlendi ve istatistiki anlam bulunamadı ($p>0,05$).

Endometriozisi olan grupta kültür ortamı Hcy değeri ortalaması $4,31\pm0,48$ $\mu\text{mol/l}$; kontrol grupta ise $4,15\pm1,44$ $\mu\text{mol/l}$ olarak bulundu (Tablo 5). Hcy değerleri arasındaki ilişki şekil 1’de gösterilmektedir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0,05$). Elde edilen embriyolar açısından, sadece 3. günde grade 2 olan embriyo sayıları arasında anlamlı fark bulunmuştur ancak diğer grade’ler açısından anlamlı bir fark tespit edilebilmiş değildir.

Endometriozis grubunda 5 gebelik elde edilirken, kontrol grubunda 14 gebelik elde edilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0,05$).

İstatistiksel analizin ikinci aşamasında, önce endometriozis tanısı olan ve olmayan hastaların ve bu tanı göz ardı edilerek tüm hastaların toplandığı üç ayrı gruba dağıtıldı. Her grup içerisinde gebelik elde edilen ve elde edilemeyen hastalar arasında yukarıda belirtilen tüm parametreler tekrar karşılaştırıldı.

Endometriozis grubunda (n:19) gebelik elde edilen ve edilemeyen hastaların verileri tablo 2’de gösterilmektedir. Tüm parametreler içinde sadece 3. gün grade 2 embriyo sayıları açısından anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Homosistein düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 5).

Endometriozis tanısı olmayan grupta (n:38) gebelik elde edilen ve edilemeyen hastaların verileri ise tablo 3’de gösterilmektedir. İki grupta homosistein düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmış, gebelik elde edilen grupta homosistein düzeyleri belirgin olarak düşük

bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 5). Bu bulgu Aydın'ın tez çalışmasının verdiği sonuçlar ile uyum göstermektedir [158].

Endometriozis tanısı göz ardı edilerek tüm olgular değerlendirildiğinde, gebelik elde edilen hastalarda kültür ortamı Hcy ortalama değeri $3,60\pm0,84$ $\mu\text{mol/l}$, gebelik elde edilemeyen grupta ise $4,21\pm0,84$ $\mu\text{mol/l}$ olarak bulundu (Tablo 5). Gebelik elde edilen grupta Hcy düzeylerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Aynı şekilde bu bulgu da Aydın'ın tez çalışmasının verdiği sonuçlar ile uyum göstermektedir [158] (Şekil 2).

Kültür ortamında Hcy düzeyinin tüm olgularda gebe kalamamanın kestirimi için ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi kullanıldığında; eğri altı alan (EAA) 0,675 olarak bulundu. ROC eğrisi 0.5'i kesmediğinden ilişki anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 3). En uygun sınır değer olarak seçilen 3,145 $\mu\text{mol/l}$ için duyarlılık % 81,8 , özgüllük % 76,1, pozitif kestirim değeri (PKD) 0,45 ve negatif kestirim değeri (NKD) 0,94 olarak belirlenmiştir.

Tablo 1: Endometriozis tanısı olan ve olmayan hastaların karakteristik, klinik ve hormonal özellikleri

	Endometriozis		Kontrol		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Yaş (yıl)	19	32±8,31 32	38	31,21±3,72 31	0,486
Total gonadotropin doz (IU)	19	2673,6±722,3 2775	38	2284,3±785,7 2100	0,026
Evlilik Süre	19	6,42±4,15 5	38	5,93±3,42 5	0,778
İnfertilite süre (yıl)	19	5,89±4,3 5	38	5,93±3,42 5	0,970
FSH (mIU/ml)	19	7,34,1±2,57 6,8	38	5,4±1,59 5,17	0,001
LH (mIU/ml)	19	5,93±2,42 5,69	38	4,96±4,64 4,27	0,022
E2 (mIU/ml)	19	51,67±24,44 50	38	54,97±49,58 39,5	0,531
TSH (mIU/ml)	19	2,42±1,15 2,3	38	2,19±1,34 1,8	0,275
AMH (ng/ml)	19	2,98±2,79 2,1	38	3,90±4,33 2,56	0,472
Prolaktin (mIU/ml)	19	15,04±6,18 13,09	38	17,58±8,30 15,6	0,400
Total Oosit	19	7,32±3,11 7	38	8,5±3,94 9	0,287
ICSI Oosit	19	5,16±2,29 5	38	5,42±2,18 5	0,601
Fertilize oosit	19	4,32±24 4	19	3,06±2,15 3	0,475
2. Gün Embriyo Grade 1	12	2,50±1,83 3	26	2,54±1,52 2	0,946
2. Gün Embriyo Grade 2	7	1,43±1,39 1	23	2,30±1,22 2	0,098
2. Gün Embriyo Grade 3	3	1,33±0,57 1	7	1,57±0,78 1	0,696
3. Gün Embriyo Grade 1	13	3±2,58 3	24	2,88±1,62 3	0,871
3. Gün Embriyo Grade 2	11	1,64±0,67 2	22	2,55±1,22 2	0,031
3. Gün Embriyo Grade 3	6	1,50±1,22 1	12	1,67±0,65 2	0,227
Gebelik (Gebe/Toplam)	19	5/14	38	14/23	0,326kikare

P<0.05 anlamlı

AMH, anti-Müllerian hormon; FSH, Folikül Stimulan Hormon; E2, Estradiol; TSH, Tiroid Stimulan Hormon; ICSI, Intra Stoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

Tablo 2. Endometriozis tanısı olan ve tedavi sonrası gebe kalan veya kalmayan hastaların karakteristik, klinik ve hormonal özellikleri

	Gebelik (+)		Gebelik (-)		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Yaş (yıl)	5	33,40±3,20 32	14	31,50±3,7 32	0,512
Total gonadotropin doz (IU)	5	2650±871,06 2775	14	2682,14±699,13 2765,50	1
Evlilik Süre	5	5,2±2,58 5	14	6,85±4,58 5	0,671
İnfertilite süre (yıl)	5	3,80±1,78 4	14	6,64±4,73 5	0,258
FSH (mIU/ml)	5	7,46±2,03 7,9	14	7,30±2,81 6,32	0,817
LH (mIU/ml)	5	5,61±1,38 5,8	14	6,04±2,74 5,49	1
E2 (mIU/ml)	5	49,43±12,42 57	14	52,47±27,87 49	0,711
TSH (mIU/ml)	5	2,91±1,52 3	14	2,25±1,01 2,25	0,459
AMH (ng/ml)	5	2,73±2,56 2,5	14	3,07±2,97 2,01	0,588
Prolaktin (mIU/ml)	5	16,90±9,33 15,95	14	14,51±5,33 13,09	0,750
Total Oosit	5	8,4 ± 4,39 7	14	6,93±2,61 6,5	0,637
ICSI Oosit	5	6,40 ± 3,43 5	14	4,71±1,68 5	0,397
Fertilize oosit	5	6 ± 3,53 5	14	3,71±1,63 3,5	0,158
2. Gün Embriyo Grade 1	2	3,50±0,70 3,5	10	2,3±1,94 2,5	0,269
2. Gün Embriyo Grade 2	1	2 3,5	6	1,33±1,5 1	0,441
2. Gün Embriyo Grade 3	0	0 0	3	1,33±0,57 1	0,696
3. Gün Embriyo Grade 1	4	4,50±3,78 3	9	2,33±1,73 3	0,389
3. Gün Embriyo Grade 2	4	2 2	7	1,43±0,787 1	0,095
3. Gün Embriyo Grade 3	1	1 1	5	1,60±1,34 1	1

P<0.05 anlamlı

AMH, anti-Müllerian hormon; FSH, Folikül Stimulan Hormon; E2, Estradiol; TSH, Tiroid Stimulan Hormon; ICSI, Intra Stoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

Tablo 3. Kontrol grubu hastalarının, tedavi sonrası gebe kalma sonuçlarına göre dağılımı ve hastaların karakteristik, klinik ve hormonal özellikleri

	Gebelik (+)		Gebelik (-)		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Yaş (yıl)	15	30,67±3,26 30	23	31,57±4,02 32	0,376
Total gonadotropin doz (IU)	15	2220±871,07 2100	23	2326,30±742,27 2250	0,580
Evlilik Süre	15	6,96±4,17 6	23	5,26±2,71 5	0,291
İnfertilite süre (yıl)	15	6,96±4,17 6	23	5,26±2,71 5	0,291
FSH (mIU/ml)	15	5,96±1,54 6	23	5,03±1,54 5,06	0,100
LH (mIU/ml)	15	3,78±1,76 3,39	23	5,73±5,71 4,4	0,210
E2 (mIU/ml)	15	48,73±25,44 40	23	59,04±60,65 39	0,858
TSH (mIU/ml)	15	2,19±1,16 1,79	23	2,19±1,47 1,81	0,709
AMH (ng/ml)	15	4,55±5,63 2,6	23	3,48±3,30 2,52	0,881
Prolaktin (mIU/ml)	15	17,36±8,20 16	23	17,73±8,54 15,3	0,917
Total Oosit	15	8,87 ± 3,72 9	23	8,26±4,14 9	0,787
ICSI Oosit	15	5,87 ± 2,20 6	23	5,13 ± 2,18 5	0,342
Fertilize oosit	8	5,07 ± 1,87 5	10	4,17 ± 1,82 4	0,141
2. Gün Embriyo Grade 1	11	3,09 ± 1,57 3	15	2,13 ± 1,40 2	0,095
2. Gün Embriyo Grade 2	9	2,44 ± 1,50 2	14	2,21 ± 1,05 2	0,895
2. Gün Embriyo Grade 3	5	1,60 ± 0,89 1	2	1,50 ± 0,70 1,5	1
3. Gün Embriyo Grade 1	10	3 ± 1,49 3	14	2,79 ± 1,76 2,5	0,632
3. Gün Embriyo Grade 2	8	2,63 ± 1,30 2	14	2,50 ± 1,22 2	0,859
3. Gün Embriyo Grade 3	4	1,50 ± 0,57 1,5	8	1,75 ± 0,70 2	0,571

P<0.05 anlamlı

AMH, anti-Müllerian hormon; FSH, Folikül Stimulan Hormon; E2, Estradiol; TSH, Tiroid Stimulan Hormon; ICSI, Intra Stoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

Tablo 4. Tüm hastaların tedavi sonrası gebe kalma sonuçlarına göre dağılımı ve hastaların karakteristik, klinik ve hormonal özellikleri

	Gebelik (+)		Gebelik (-)		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Yaş (yıl)	20	31,35 ± 3,39 31	37	31,54 ± 3,86 32	0,669
Total gonadotropin doz (IU)	20	2327,50 ± 869,09 2112,25	37	2460,95 ± 737,44 2475	0,389
Evlilik Süre	20	6,52 ± 3,85 5,5	37	5,86 ± 3,56 5	0,538
İnfertilite süre (yıl)	20	6,17 ± 3,93 5	37	5,78 ± 3,61 5	0,781
FSH (mIU/ml)	20	6,33 ± 1,75 6,3	37	5,89 ± 2,35 5,30	0,285
LH (mIU/ml)	20	4,24 ± 1,83 4,12	37	5,85 ± 4,76 4,75	0,213
E2 (mIU/ml)	20	48,90 ± 22,57 40	37	56,55 ± 50,39 47	0,913
TSH (mIU/ml)	20	2,37 ± 1,26 1,95	37	2,21 ± 1,30 2,09	0,634
AMH (ng/ml)	20	4,10 ± 5,04 2,55	37	3,33 ± 3,15 2,48	0,939
Prolaktin (mIU/ml)	20	17,26 ± 8,18 16	37	16,51 ± 7,57 15,26	0,809
Total Oosit	20	8,75 ± 3,78 8,5	37	7,76 ± 3,66 8	0,400
ICSI Oosit	20	6 ± 2,47 5,5	37	4,97 ± 1,99 5	0,173
Fertilize oosit	20	5,25 ± 2,35 4	37	4 ± 1,74 3	0,037
2. Gün Embriyo Grade 1	13	3,15 ± 1,46 3	25	2,20 ± 1,60 2	0,069
2. Gün Embriyo Grade 2	10	2,40 ± 1,43 2	20	1,95 ± 1,23 2	0,465
2. Gün Embriyo Grade 3	5	1,60 ± 0,89 1	5	1,40 ± 0,54 1	0,811
3. Gün Embriyo Grade 1	14	3,43 ± 2,31 3	23	2,61 ± 1,72 3	0,356
3. Gün Embriyo Grade 2	12	2,42 ± 1,08 2	21	2,14 ± 1,19 2	0,396
3. Gün Embriyo Grade 3	5	1,40 ± 0,54 1	13	1,69 ± 0,94 1	0,658

P<0.05 anlamlı

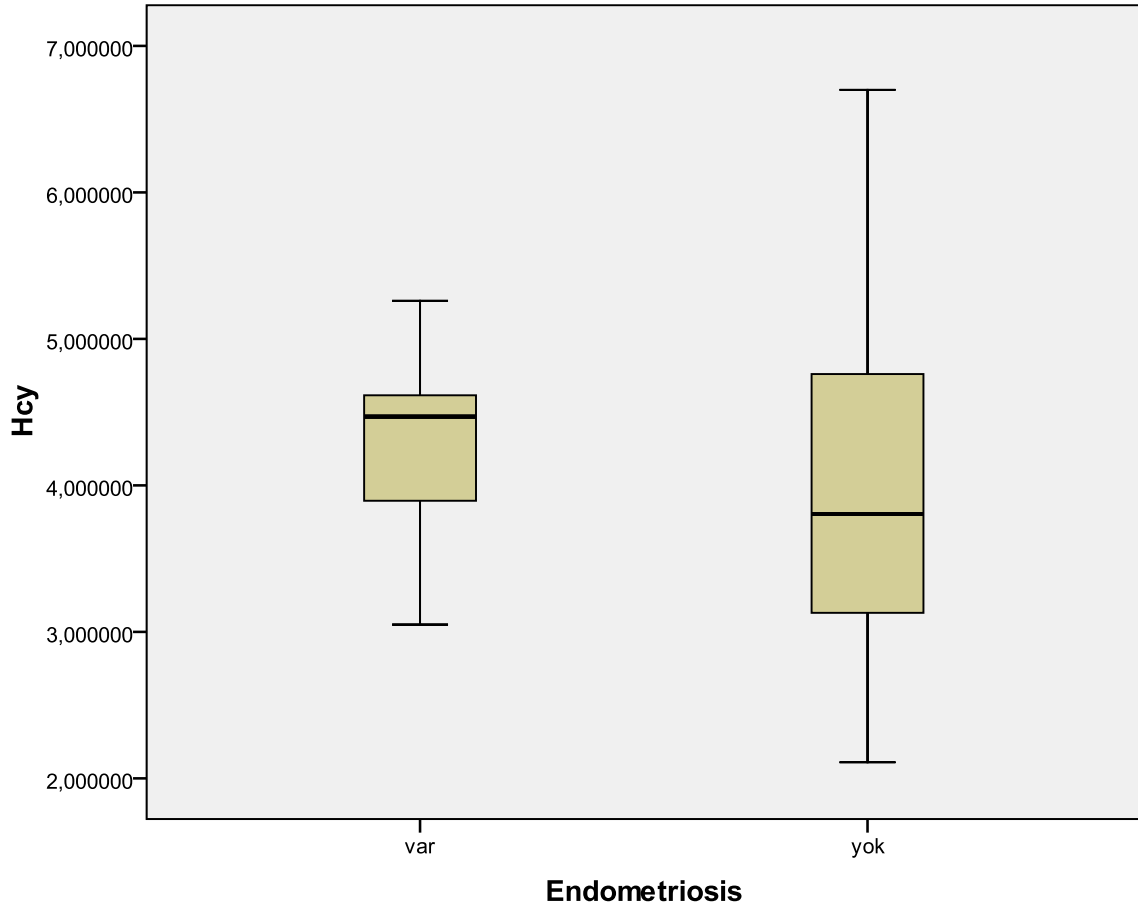
AMH, anti-Müllerian hormon; FSH, Folikül Stimulan Hormon; E2, Estradiol; TSH, Tiroid Stimulan Hormon; ICSI, İntra Stoplazmik Sperm Enjeksiyonu (İntra Cytoplasmic Sperm Injection)

Tablo 5. Homosistein düzeylerinin, farklı gruplarda karşılaştırılması.

	Endometriozis tanısı olan		Endometriozis tanısı olmayan		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Homosistein (μmol/l)	19	4,31±0,48 4,47	38	4,15±1,44 3,08	0,123
	Endometriozis tanısı olan ve gebe kalan		Endometriozis tanısı olan ve gebe kalamayan		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Homosistein (μmol/l)	5	4,23±0,68 4,47	14	4,29±0,57 4,43	0,853
	Endometriozis tanısı olmayan ve gebe kalan		Endometriozis tanısı olmayan ve gebe kalamayan		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Homosistein (μmol/l)	15	3,39±0,94 3,13	23	4,16±0,97 4,24	0,022*
	Tüm gruplarda gebe kalan		Tüm gruplarda gebe kalamayan		
	n	ortalama± SD medyan	n	ortalama±SD medyan	p
Homosistein (μmol/l)	20	3,60 ± 0,94 3,47	37	4,21 ± 0,84 4,29	0,030*

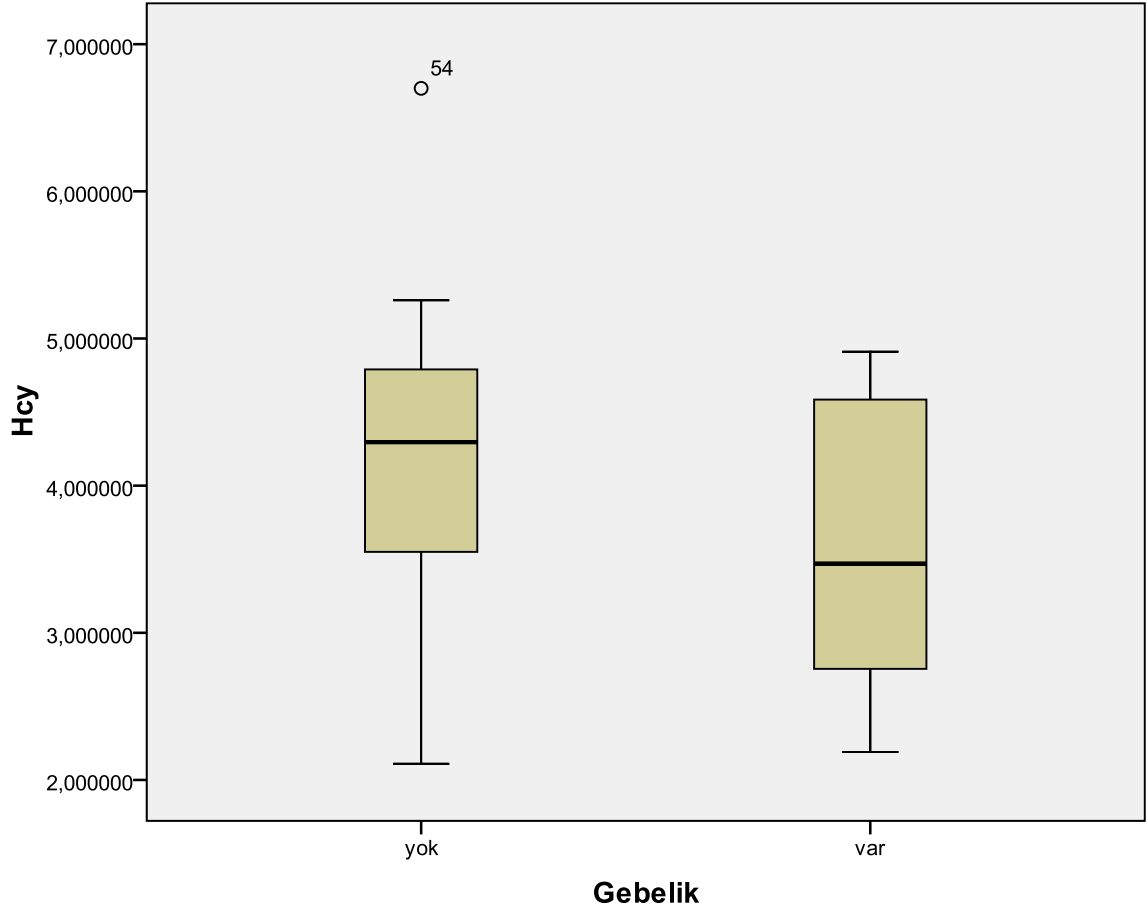
* P<0,05 anlamlı

Şekil 1. Homosistein düzeyleri ve endometriozis tanısı arasındaki ilişki aşağıda gösterilmiştir. Endometiriozis tanısı olan hastalarda ortalama Hcy düzeyi ($4,31 \pm 0,48$; medyan:4,47) ile endometriozis tanısı olmayan hastaların ortalama Hcy düzeyleri ($4,15 \pm 1,44$; medyan:3,08) arasında anlamlı fark bulunmamaktadır.



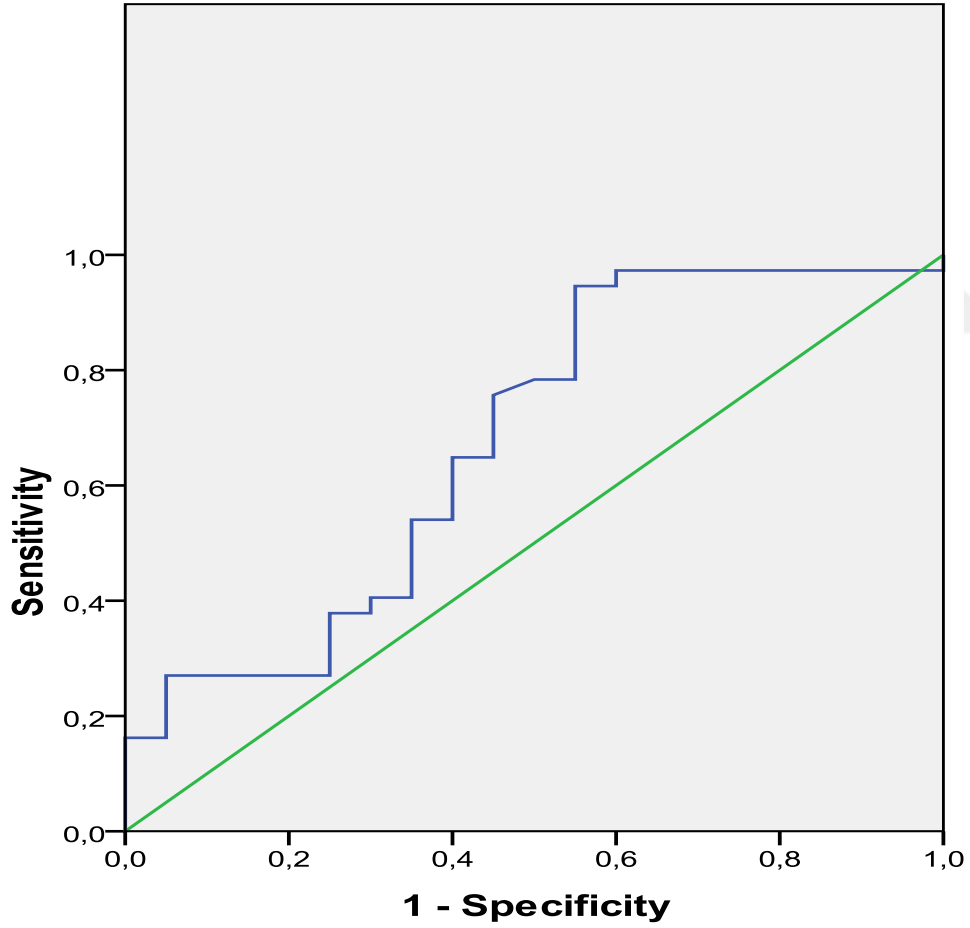
Şekil 2. Gebelik elde edilen ve edilmeyen gruplar arasında homosistein düzeyleri arasındaki ilişki aşağıda gösterilmiştir.

Gebelik elde edilen hastalarda ortalama Hcy düzeyi ($3,39 \pm 0,94$; medyan:3,13) gebe kalamayan hastalara göre ($4,16 \pm 0,97$; medyan:4,24)anamlı olarak düşük bulunmuştur.



Şekil 3. Hcy düzeyinin tüm olgularda gebe kalamamayı kestirimi için yapılan ROC analizi gösterilmektedir. eğri altı alan (EAA) 0,675 olarak bulundu. ROC eğrisi 0.5'i kesmediğinden ilişki anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$)

En uygun sınır değeri olarak seçilen 3,145 $\mu\text{mol/l}$ için duyarlılık % 81,8 , özgüllük % 76,1, pozitif kestirim değeri (PKD) 0,45 ve negatif kestirim değeri (NKD) 0,94 olarak belirlenmiştir.



4. TARTIŞMA

İnfertilite, üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15' ini etkileyen ve etkilediği insanların sağlık ve hayat kaliteleri üzerinde önemli etkileri olan ciddi bir problemdir [160]. Üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) uygulanması ile son yıllarda infertilite tedavisinde hızlı gelişmelerin yaşandığı bir gerçektir. Ancak ÜYT'in yaygın kullanımına karşın her 3 ÜYT siklusundan 2'si başarısızlıkla sonuçlanmakta ve transfer edilen her 10 embriyodan 8'i implantasyon başarısızlığına uğramaktadır [161,162,151]. ÜYT'in başarısız olmasındaki en büyük etkenin en kaliteli ve üreme potansiyeli en yüksek embriyoyu belirlemedeki yetersizliğin olduğu düşünülmektedir [163,164]. Geçtiğimiz dönemde tedavilerin başarı oranlarını arttırmak için birden fazla embriyonun transfer edilmesi ise, çoğul gebelik riskinin göze alınmasını zorunlu kılmaktadır [161]. Ne var ki, gebelik oranlarının artırılması amacıyla çoklu embriyo transferi yapılması bir halk sağlığı sorunu doğurmaktadır. Çoğul gebelikler özellikle preterm doğum ve buna bağlı komplikasyonların artması bakımından fetus, gebelikle indüklenen hipertansiyon ve doğum sonrası kanama sıklığının artması açısından da anne açısından çok olumsuz sonuçlar ortaya koymaktadır [165-167]. Günümüzde bazı ülkelerde embriyo transferi sayısına sınırlama getirilmiş olmakla birlikte bu durum her yerde geçerli değildir. Çiftlerin çocuk sahibi olma arzuları ve gebelik oranlarını artırma isteği çoklu embriyo transferinin halen bir gündem maddesi olarak ÜYT'de yerini korumasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, tek embriyo transferi ile daha yüksek gebelik oranları elde etmek ÜYT açısından belirlenen en büyük hedeftir ve doğru embriyoyu seçebilme yöntemlerinin geliştirilmesi bu yoldaki en önemli adım olarak görülmektedir.

Günümüzde embriyo kalitesinin belirlenmesinde hala morfolojik kriterler ve klivaj oranları kullanılmaktadır. Ancak bu kriterlere göre seçilen her embriyonun aslında gerçekte kaliteli

embriyo olamayabileceği akıllara soru olarak gelmiştir. Çünkü iyi embriyo kalitesine rağmen ideal gebelik oranına henüz ulaşamamıştır [150]. Giriş bölümünde belirtildiği gibi; embriyonun içinde bulunduğu kültür ortamının embriyonun metabolik durumunun değerlendirilmesi amacıyla incelenmesi, son zamanlarda üzerinde durulan, hızlı ve non-invaziv olarak en iyi embriyoyu seçme ve embriyo yaşayabilirliğini öngörme yöntemi geliştirme amacıyla araştırılmaktadır.

Endometriozisin embriyogenez ve embriyo kalitesi ile ilişkisini araştıran pek çok araştırma bulunmakta olup, sonuçlar çelişkilidir. Al-Fadhli ve ark.'nın çalışmasında laparoskopik olarak endometriozis tanısı koyulmuş 87 hastanın IVF tedavisi sonrası sonuçları, endometriozis tanısı olmayan 87 hastadan oluşan kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve hem embriyo kalitesi hem de gebelik oranları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır[168]. Tinkanen ve ark.'nın yaptığı çalışmada, IVF tedavisi yapılan ve endometriomasi bulunan 55 hasta ve herhangi bir endometriozis tanısı bulunmayan 45 hastanın tedavi sonuçları karşılaştırıldığında, gebelik oranları ve elde edilen embriyo sayısı açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir [169]. Bu sonuçlara paralel olarak, Reinblatt ve ark.'nın çalışmasında, bilateral overlerde endometriomaları bulunan 13 hasta ve endometrioma/endometriozis tanısı olmayan 39 hastanın IVF sonuçları karşılaştırıldığında embriyo kalitesi ve gebelik oranları açısından yine anlamlı bir fark görülmemiştir [170]. Bu görüşlere zıt olarak, Yanushpolsky ve ark., 45 endometriozis hastası ve 55 normal hastanın IVF sonuçlarını karşılaştırdığında; endometriozis grubunda erken gebelik kayıplarının belirgin olarak daha yüksek ve IVF işleminden 48 saat sonrası dört hücre safhasına erişebilen embriyo sayısının belirgin olarak az olduğunu ortaya koyarak, endometriozis ve embriyo kalitesi arasında negatif bir ilişkinin bulunduğunu ileri sürmüştür [171]. Kumbak ve ark., en fazla 5 cm büyüklüğünde endometriomaları bulunan 85 hasta ve 3,5 cm büyüklüğüne kadar basit over kistleri bulunan 83 hastanın IVF sonuçlarını

karşılaştırmışlardır. Endometrioma grubunda elde edilen grade 1 embriyo sayısı ve implantasyon oranının belirgin olarak düşük olduğu bu çalışmada gösterilmiştir [172]. Son olarak, oosit donasyonu yapılmış hastalar üzerindeki çalışmalar özellikle dikkat çekicidir. Hauzman ve ark., oosit donasyonu yapılmış ve endometriozis tanısı olan hastalar ile ilgili yapılmış beş çalışmayı derlemiştir [173]. Bu derlemede endometriozisli hastalardan alınan oositlerden elde edilen embriyoların, morfolojik ve moleküler analizler ile reseptivitesinin uygun olduğu tespit edilmiş endometriyumlara transfer edilmeleri durumunda nispeten olumsuz gebelik sonuçları elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda endometriozis hastaları ve kontrollerden elde edilen embriyo kültür ortamı sıvılarındaki Hcy düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durumun, çalışma grubunun popülasyonunun yeterli olmamasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Embriyo grading ve homosistein düzeylerinin korelasyonunun karşılaştırılması açısından ise, her bir embriyodan homosistein düzeyinin ölçülüp morfolojik değerlendirmeler ile karşılaştırılması gerektiği için, daha ileri bir çalışma düzenine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kliniğimizde daha önce yapılan Aydın'a ait tez çalışmasında, seminal plazmada ve foliküler sıvıda Hcy ile embriyo kalitesi ve gebelik oranları arasındaki daha önce tespit edilmiş negatif ilişkilerden yola çıkarak önceki çalışmalardan farklı olarak embriyonun kültür ortamındaki Hcy değerleri ile embriyo kalitesi ve gebelikle ilişkisini araştırılmıştır [158]. Aydın'ın çalışmasında gebelik oranları ve embriyo kültür ortamındaki Hcy düzeyleri arasında ters bir ilişki bulunmuş, düşük Hcy düzeylerinin yüksek gebelik oranları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Biz de çalışmamızda, endometriozis tanısından bağımsız olarak tüm hastalar değerlendirildiğinde (n:57) ve kontrol grubu (Endometriozis olmayan) hastaları dikkate alındığında (n:38) benzer sonuç elde edilmiş olup, elimizdeki bulgular Aydın'ın çalışmasını

daha fazla sayıda bir hasta grubunda doğrulamıştır [158]. Endometriozis grubunda (n:19) gebe kalan ve kalmayan hastalar arasında kültür ortamı Hcy düzeyi açısından anlamlı fark elde edilememiştir. Bu bulgudan çıkarılabilecek sonuç, endometriozisin Hcy düzeylerine olumlu veya olumsuz bir katkı yapmıyor olabileceğidir. Ancak çalışmamızda endometriozis hasta sayısının azlığı da doğrudan doğruya bu bulgunun elde edilmesine neden olmuş olabilir. Eğer olgu sayısı arttırılır ve benzer sonuçlar elde edilirse bu sonuç çok değerlidir. Zira ICSI hastalarında, endometriozis tanısı olsa bile bu tanı göz ardı edilerek Hcy düzeylerinin gebelik olup olmayacağı açısından (Tıpkı kontrol grubunda olduğu gibi) yol gösterici olacağı ortaya koyulabilir.

Hcy ile ilgili önceki çalışmalara baktığımızda çoğunlukla serum, seminal plazma, foliküler sıvı çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalar dolaylı olarak yüksek Hcy değerleri ile kaliteli embriyo ve gebelik arasındaki ters ilişkiyi vurgulama açısından bizim sonuçlarımızı desteklemektedirler. Çalışmamıza bire bir benzer olan ve fareler üzerinde yapılan eski bir çalışmada L- homosisteinin embriyotoksik olduğu ve bu farelerde blastosist aşamasına geçen embriyo oranının Hcy ile ters orantılı olarak azaldığı gösterilmiştir [174]. Yine aynı çalışmada Hcy'nin diğer formu olan D-homosisteinin ve oksidasyon ürünü olan L-homosistinin embriyotoksik olmadığı belirtilmiştir [174]. Buradan yola çıkarak kötü embriyonun ortamdan Hcy'ni temizleyemediği için blastosist aşamasına geçemediği sonucu öne sürülebilir. Zhao ve ark. yapmış olduğu çalışmada embriyo kültür ortamına eklenen Hcy ile doğru orantılı olarak embriyonik gelişimin bozulduğunu göstermiştir [175]. Ancak bu çalışmada Aerts ve ark.'dan farklı olarak D,L-Hcy her ikisinin de embriyotoksik olduğu belirtilmiş ve minimum teratojenik doz 0,15 mmol/l olarak bulunmuştur [175]. Tüm bunlardan farklı olarak Hansen ve ark. erken organogenez evresinde kültür ortamına eklenen D,L-Hcy'nin ortalama 1,5mM konsantrasyonlarında fare embriyolarında embriyotoksik olmadığını bulmuştur ve bu fare

embryolarının Hcy'i metabolize ettiğini savunmuşlardır [176]. Bunun sebebi yüksek ihtimalle Hcy'in transsülfürasyon yoluna girmesi ve metabolize olmasıdır. Buradan da aslında, Hcy için toksik olmayan belli bir değer aralığı olduğu, bu aralık içerisinde embriyonun Hcy'ni metabolize ettiği düşünülebilir [176]. Tüm bu çalışmaların ve de bizim çalışmamızın sonuçları; embriyonun yaşayabilirliğinin ve de iyilik halinin o embriyonun metabolik aktivitesinin, kültür ortamındaki metabolik komponentlerinin ve hücre artıklarının incelenerek ortaya konulduğu hipotezini desteklemektedir. İyi embriyonun kültüre edildiği ortamı kendi lehine değiştirdiği düşünülebilir. . Başka bir deyişle bir embriyo, kültür ortamını olumlu yönde değiştirebildiği ölçüde iyi ve kalitelidir.

Bir metabolik parametre olarak homosisteinin, endometriozis hastalarından elde edilen embriyoların kültür medyumlarındaki düzeyi, çalışmamızda anlamlı olarak farklı bulunamamıştır. Donör çalışmaları, endometriozis olgularından elde edilen oosit ve dolayısıyla embriyo ile ilgili olumsuzluklara dikkat çekmekle birlikte, çalışmamız homosistein açısından bir farklılık olmadığını göstermektedir. Daha farklı bir metabolik parametre ile daha farklı bir sonucun elde edilebilmesi mümkün olabilmekle birlikte, homosistein ile ilgili daha büyük hasta populasyonlarında yapılmış çalışmalar daha farklı sonular ortaya koyabilir. Ek olarak, homosistein düzeyinin, tüm gruplar dikkate alındığında gebelik elde edilen hastalarda anlamı olarak düşük çıkması, gebelik sonuçları açısından homosistein düzeyine odaklanılabileceğini göstermesi açısından dikkat çekicidir. Belki de endometriozis gibi embriyo kalitesi üzerine olumsuz etkileri olabilecek çeşitli durumlardan bağımsız olarak, embriyo kültür ortamı Hcy değeri, gebeliği öngörmede etkili olmaktadır. Çalışmanın girişinde belirtilen embriyo grade'leri ve Hcy düzeyi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacına, teknik yetersizliklerden ötürü her hastada sadece transfer edilen

embriyonun Hcy düzey ölçülebildiğinden dolayı ulaşılamamış ve bu ilişki bu çalışmada değerlendirilememiştir.



5. ÖZET

Amaç

Embriyo kültür ortamındaki homosistein miktarının endometriozis hastalarında embriyo kalitesini ve ÜYT tedavisi sonuçlarını öngörmedeki belirleyiciliğinin araştırılması

Materyal ve Metod

İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Bilim Dalı polikliniğine infertilite şikayeti ile ÜYT tedavisi almak üzere başvuran ve endometriozis tanısı koyulmuş olan 19 hastanın, tedavi sonucu oluştan embriyo kültür ortamındaki homosistein miktarı ölçüldü. Elde edilen embriyoların kaliteleri ve uygulanan ÜYT tedavilerinin sonuçları kayıt edildi. Elde edilen sonuçlar, ÜYT tedavisi alan ancak endometriozis tanısı olmayan 38 kontrol grubu hastasının bilgileri ve daha önceden elde edilmiş embriyo kültürü homosistein miktarı sonuçları ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler SSPS veri programı ile değerlendirildi.

Bulgular

Endometriozis grubunda kültür ortamı Hcy değeri ortalaması 4.31 ± 0.48 $\mu\text{mol/l}$; kontrol grubunda ise 4.15 ± 1.44 $\mu\text{mol/l}$ olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Endometriozis grubunda 5 gebelik elde edilirken, kontrol grubunda 14 gebelik elde edilmiştir ve istatistiksel anlam bulunamamıştır ($p > 0.05$). Endometriozis tanısı olmayan hasta grubunda (n:38) ve tüm hasta populasyonunda (n:57), gebelik elde edilen hastaların kültür ortamı Hcy ortalama düzeyi (3.39 ± 0.94 ve 3.60 ± 0.94) gebelik elde edilemeyen gruba (4.16 ± 0.97 ve 4.21 ± 0.84) göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$).

Tartışma

Bir metabolik parametre olarak homosisteinin, endometriozis hastalarından elde edilen embriyoların kültür medyumlarındaki düzeyi, çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak farklı bulunamamıştır. Daha büyük hasta populasyonlarında yapılmış ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Gebelik elde edilen hastalarda homosistein düzeyi ise gebelik elde edilemeyen gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Belki de endometriozis gibi embriyo kalitesi üzerine olumsuz etkileri olabilecek çeşitli durumlardan bağımsız olarak, embriyo kültür ortamı Hcy değeri, gebeliği öngörmeye etkili olmaktadır. Homosistein'in gebelik öngörüsünü belirlemede bir belirteç olarak kullanılması ile ilgili daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

6. ABSTRACT

Aim

To investigate the possible ability of homocysteine levels in embryo culture media for estimating better IVF outcomes in endometriosis patients.

Material and Methods

19 women with endometriosis who admitted to Cerrahpasa School of Medicine Department of Obstetrics & Gynecology ART outpatient clinic with the infertility diagnosis to undergo ART cycles were recruited for the study. The results of ICSI treatments were recorded and homocysteine levels in the embryo culture were evaluated. The results were compared with those of the control patients without endometriosis, who had previously admitted to our clinic for ART.

Results

Number of retrieved oocytes and ICSI performed oocytes were in the day of aspiration were found as 6.9 ± 3.95 and 5.5 ± 2.22 in the endometriosis group and 8.1 ± 3.42 and 5.7 ± 2.13 in control group, respectively ($p > 0.05$). Mean Hcy levels in the culture media of the endometriosis group and non-endometriosis group were $4.31 \pm 0.48 \mu\text{mol/l}$ and $4.15 \pm 1.44 \mu\text{mol/l}$, respectively. Difference between these values were statistically non-significant ($p > 0.05$). Pregnancy was achieved in 3 patients in endometriosis group, while 13 pregnancies were obtained in non-endometriosis group ($p > 0.05$).

Conclusions

Difference between mean Hcy levels in the culture media of the endometriosis group and non-endometriosis group were statistically non-significant. Further studies with larger groups are

definitely needed for evaluating the association of Hcy with infertility in endometriosis patients. Mean Hcy levels in the group of patients who succeeded to conceive was statistically higher compared to the group of patients who failed to conceive. It may be suggested that Hcy levels in the embryo culture media can predict the achievement of a pregnancy independently from some conditions which may adversely affect the embryo quality, such as endometriosis.



7.KAYNAKLAR

1. Sampson JA (1927) Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* 3:93-110 143
2. D'Hooghe TM, Debrock S (2002) Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Hum Reprod Update* 8:84-88
3. Liu DT, Hitchcock A (1986) Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 93:859-862
4. Ishimura T, Masuzaki H (1991) Peritoneal endometriosis: endometrial tissue implantation as its primary etiologic mechanism. *Am J Obstet Gynecol* 165:210-214
5. Jenkins S, Olive DL, Haney AF (1986) Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 67:335-338
6. Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, de Ronde IJ, Jap PH, Rolland R (1991) Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 55:297-303
7. Olive DL, Henderson DY (1987) Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 69:412-415
8. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum SC (1986) The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 255:1904-1908
9. Haney AF (1987) Endometriosis: pathogenesis and pathophysiology. In: Wilson EA (ed) *Endometriosis*. AR Liss, New York, pp 23-51
10. Ramey JW, Archer DF (1993) Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. *Fertil Steril* 60:1-14
11. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM (1984) Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64:151-154
12. Koninckx PR, De Moor P, Brosens IA (1980) Diagnosis of the luteinized unruptured follicle syndrome by steroid hormone assays on peritoneal fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 87:929-934
13. Blumenkrantz MJ, Gallagher N, Bashore RA, Tenckhoff H (1981) Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 57:667-670
14. Ueki M (1991) Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 165:201-209
15. Foster DC, Stern JL, Buscema J, Rock JA, Woodruff JD (1981) Pleural and parenchymal pulmonary endometriosis. *Obstet Gynecol* 58:552-556
16. Rock JA, Markham SM (1987) Extra pelvic endometriosis. In: Wilson EA (ed) *Endometriosis*. AR Liss, New York, pp 185-206
17. Nisolle M, Donnez J (1997) Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 68:585-596
18. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC, Jr. (1980) Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 137:327-331
19. Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B, Aseev M, Belotserkovskaya R, Baranova H, Malet P, Perriot J, Mouraire P, Baskakov VN, Savitskyi GA, Gorbushin S, Deyneka SI, Michnin E, Barchuck A, Vakharlovsky V, Pavlov G, Shilko VI, Guembitzkaya T, Kovaleva L (1996) Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. *Hum Genet* 97:516-520

20. Guo SW (2005) Glutathione S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis of genetic association studies. *Mol Hum Reprod* 11:729-743. doi:10.1093/molehr/gah206
21. Guo SW (2006) Association of endometriosis risk and genetic polymorphisms involving sex steroid biosynthesis and their receptors: a meta-analysis. *Gynecol Obstet Invest* 61:90-105. doi:10.1159/000089011
22. Guo SW (2006) The association of endometriosis risk and genetic polymorphisms involving dioxin detoxification enzymes: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 124:134-143. doi:10.1016/j.ejogrb.2005.10.002
23. D'Hooghe TM, Hill JA (1996) Immunobiology of endometriosis. In: Bronston R, Anderson DJ (eds) *Immunology of reproduction*. Blackwell Scientific, Cambridge, MA, pp 322-356
24. Dmowski WP, Steele RW, Baker GF (1981) Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 141:377-383
25. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263
26. Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ (1984) Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 6:33-36
27. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR (1991) Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 56:45-51
28. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR (1992) The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 58:290-295
29. Melioli G, Semino C, Semino A, Venturini PL, Ragni N (1993) Recombinant interleukin-2 corrects in vitro the immunological defect of endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 30:218-227
30. Iwasaki K, Makino T, Maruyama T, Matsubayashi H, Nozawa S, Yokokura T (1993) Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil Menopausal Stud* 38:229-234
31. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Fabris N, Cignitti M, Romanini C (1993) Natural killer cell activity in endometriosis: correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obstet Gynecol* 81:665-668
32. Tanaka E, Sendo F, Kawagoe S, Hiroi M (1992) Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 34:27-30
33. Hirata J, Kikuchi Y, Imaizumi E, Tode T, Nagata I (1994) Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors. *Gynecol Obstet Invest* 37:43-47
34. Zeller JM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP (1987) Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 13:78-82
35. Halme J, Becker S, Haskill S (1987) Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 156:783-789
36. Halme J (1989) Release of tumor necrosis factor-alpha by human peritoneal macrophages in vivo and in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 161:1718-1725
37. Zhang RJ, Wild RA, Ojago JM (1993) Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. *Fertil Steril* 59:1196-1201

38. Halme J, White C, Kauma S, Estes J, Haskill S (1988) Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 66:1044-1049. doi:10.1210/jcem-66-5-1044
39. Kauma S, Clark MR, White C, Halme J (1988) Production of fibronectin by peritoneal macrophages and concentration of fibronectin in peritoneal fluid from patients with or without endometriosis. *Obstet Gynecol* 72:13-18
40. van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, van der Linden EP, Ramaekers FC, Evers JL (1994) Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril* 61:85-90
41. Giudice LC, Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet* 364:1789-1799. doi:10.1016/S0140-6736(04)17403-5
42. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ (2004) Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 160:784-796. doi:10.1093/aje/kwh275
43. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ (1991) Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* 55:759-765
44. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR (1990) Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 53:978-983
45. Barlow DH, Glynn CJ (1993) Endometriosis and pelvic pain. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 7:775-789
46. Moen MH, Muus KM (1991) Endometriosis in pregnant and non-pregnant women at tubal sterilization. *Hum Reprod* 6:699-702
47. Naples JD, Batt RE, Sadigh H (1981) Spontaneous abortion rate in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 57:509-512
48. Wheeler JM, Johnston BM, Malinak LR (1983) The relationship of endometriosis to spontaneous abortion. *Fertil Steril* 39:656-660
49. Metzger DA, Olive DL, Stohs GF, Franklin RR (1986) Association of endometriosis and spontaneous abortion: effect of control group selection. *Fertil Steril* 45:18-22
50. FitzSimmons J, Stahl R, Gocial B, Shapiro SS (1987) Spontaneous abortion and endometriosis. *Fertil Steril* 47:696-698
51. Pittaway DE, Vernon C, Faye JA (1988) Spontaneous abortions in women with endometriosis. *Fertil Steril* 50:711-715
52. Moody J (2004) Fertility assessment and treatment for people with fertility problems. RCOG clinical guidelines
53. Moody Je (2014) Fertility: Assessment and treatment for people with fertility problems. RCOG clinical guidelines. .
54. Lass A (2005) Patient Selection and Management. In: Brinsden PR (ed) *Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. Taylor & Francis, Oxon, UK,
55. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A (2008) Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 90:247-257. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.02.093
56. Chandra A, Mosher WD (1994) The demography of infertility and the use of medical care for infertility. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 5:283-296
57. Schwartz D, Mayaux MJ (1982) Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Federation CECOS. N Engl J Med* 306:404-406. doi:10.1056/NEJM198202183060706
58. Hughes EG, Fedorkow DM, Collins JA (1993) A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 59:963-970

59. Endometriosis and infertility: a committee opinion (2012). *Fertil Steril* 98:591-598. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.031
60. Schenken RS (1996) Treatment of human infertility: the special case of endometriosis. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (eds) *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp 2122-2139
61. Bulun SE (2009) Endometriosis. *N Engl J Med* 360:268-279. doi:10.1056/NEJMr0804690
62. Giudice LC (2010) Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 362:2389-2398. doi:10.1056/NEJMc1000274
63. Schenken RS, Asch RH, Williams RF, Hodgen GD (1984) Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions, and spontaneous abortions. *Fertil Steril* 41:122-130
64. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, Agarwal A (2002) Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod* 17:426-431
65. Pizzo A, Salmeri FM, Ardita FV, Sofo V, Tripepi M, Marsico S (2002) Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 54:82-87. doi:67717
66. Arici A (2002) Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955:101-109; discussion 118, 396-406
67. Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y, Zheng W, Arici A (2005) Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis. *Hum Reprod* 20:794-801. doi:10.1093/humrep/deh675
68. Arici A, Oral E, Attar E, Tazuke SI, Olive DL (1997) Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril* 67:1065-1072
69. Suginami H, Yano K (1988) An ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid: an OCI-related membrane responsible for fimbrial failure of ovum capture. *Fertil Steril* 50:648-653
70. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN (2001) Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 75:1-10
71. Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA, Harlow CR, Hull MG (1997) Ovarian dysfunction in endometriosis-associated and unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 14:554-557
72. Cunha-Filho JS, Gross JL, Bastos de Souza CA, Lemos NA, Giugliani C, Freitas F, Passos EP (2003) Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 20:117-121
73. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL (1994) Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 79:643-649. doi:10.1210/jcem.79.2.7519194
74. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ (2003) Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 299:405-408. doi:10.1126/science.1079546
75. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC (2003) Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 144:2870-2881. doi:10.1210/en.2003-0043
76. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC (2007) Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 148:3814-3826. doi:10.1210/en.2006-1692

77. Cakmak H, Taylor HS (2010) Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone-hox gene interactions. *Semin Reprod Med* 28:69-74. doi:10.1055/s-0029-1242996
78. Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A (1999) HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 14:1328-1331
79. Kissler S, Hamscho N, Zangos S, Gatje R, Muller A, Rody A, Dobert N, Menzel C, Grunwald F, Siebzehnruhl E, Kaufmann M (2005) Diminished pregnancy rates in endometriosis due to impaired uterotubal transport assessed by hysterosalpingoscintigraphy. *BJOG* 112:1391-1396. doi:10.1111/j.1471-0528.2005.00676.x
80. Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C, Pellicer A (2000) Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 6:67-74
81. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C (1995) Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 10 Suppl 2:91-97
82. Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J, Remoh J, Pellice A, Simon C (2002) The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update* 8:95-103
83. Van den Berg M, Boers GH, Franken DG, Blom HJ, Van Kamp GJ, Jakobs C, Rauwerda JA, Kluft C, Stehouwert CD (1995) Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest* 25:176-181
84. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ (1988) Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *J Biol Chem* 263:11750-11754
85. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 39:1764-1779
86. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM, Jr. (1994) Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 40:873-881
87. Kang SS, Wong PW, Malinow MR (1992) Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 12:279-298. doi:10.1146/annurev.nu.12.070192.001431
88. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM (1999) Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med* 246:425-454
89. Sucu M, Karadere A, Toprak N (2001) Homosistein ve kardiyovasküler hastalıklar. *Türk Kardiyol Dern Arş* 29:181-190
90. DeSancho MT, Dorff T, Rand JH (2010) Thrombophilia and the risk of thromboembolic events in women on oral contraceptives and hormone replacement therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 21:534-538. doi:10.1097/MBC.0b013e32833b2b84
91. Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR (1999) Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180:660-664
92. Kraus JP (1998) Biochemistry and molecular genetics of cystathionine beta-synthase deficiency. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2:S50-53
93. Ogier de Baulny H, Gerard M, Saudubray JM, Zittoun J (1998) Remethylation defects: guidelines for clinical diagnosis and treatment. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2:S77-83
94. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270:2693-2698
95. Herzlich BC (1996) Plasma homocyst(e)ine, folate, vitamin B6 and coronary artery disease risk. *J Am Coll Nutr* 15:109-110

96. Chauveau P, Chadeaux B, Coude M, Aupetit J, Hannedouche T, Kamoun P, Jungers P (1993) Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int Suppl* 41:S72-77
97. Friedman JA, Dwyer JT (1995) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for cardiovascular disease in patients undergoing hemodialysis. *Nutr Rev* 53:197-201
98. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH (1994) Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 96:239-246
99. Sung JJ, Sanderson JE (1996) Hyperhomocysteinaemia, *Helicobacter pylori*, and coronary heart disease. *Heart* 76:305-307
100. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM (1991) Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 51:828-835
101. Ueland PM, Refsum H (1989) Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 114:473-501
102. Blankenhorn DH, Azen SP, Crawford DW, Nessim SA, Sanmarco ME, Selzer RH, Shircore AM, Wickham EC (1991) Effects of colestipol-niacin therapy on human femoral atherosclerosis. *Circulation* 83:438-447
103. Vermaak WJ, Ubbink JB, Barnard HC, Potgieter GM, van Jaarsveld H, Groenewald AJ (1990) Vitamin B-6 nutrition status and cigarette smoking. *Am J Clin Nutr* 51:1058-1061
104. McDonald CC, Stewart HJ (1991) Fatal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial. The Scottish Breast Cancer Committee. *BMJ* 303:435-437
105. Reeder SJ, Hoffmann RL, Magdic KS, Rodgers JM (2000) Homocysteine: the latest risk factor for heart disease. *Dimens Crit Care Nurs* 19:22-28
106. Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ (1995) Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 56:142-150
107. McDowell IF, Lang D (2000) Homocysteine and endothelial dysfunction: a link with cardiovascular disease. *J Nutr* 130:369S-372S
108. Hanratty CG, McGrath LT, McAuley DF, Young IS, Johnston GD (2001) The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. *Heart* 85:326-330
109. Bedaiwy MA, Miller K, Goldberg JM, Nelson DR, Agarwal A, Falcone T (2002) Assessment of the predictive value of follicular fluid cytokines and reactive oxygen species in IVF cycles. *Fertil Steril* 78:5-6
110. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J (2001) Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 73:613-621
111. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration (1998). *BMJ* 316:894-898
112. Dhillon VS, Shahid M, Husain SA (2007) Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Mol Hum Reprod* 13:213-222. doi:10.1093/molehr/gal118
113. Boxmeer JC, Smit M, Utomo E, Romijn JC, Eijkemans MJ, Lindemans J, Laven JS, Macklon NS, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP (2009) Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril* 92:548-556. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.06.010
114. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP (2002) Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 77:491-498

115. Steegers-Theunissen RP, Steegers EA, Thomas CM, Hollanders HM, Peereboom-Stegeman JH, Trijbels FJ, Eskes TK (1993) Study on the presence of homocysteine in ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 60:1006-1010
116. Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A (2003) [Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity]. *Ginekol Pol* 74:1392-1396
117. Boxmeer JC, Steegers-Theunissen RP, Lindemans J, Wildhagen MF, Martini E, Steegers EA, Macklon NS (2008) Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 23:2570-2576. doi:10.1093/humrep/den292
118. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Taieb J, Moreau JF, Chaouat G (2001) Follicular fluid concentration of leukaemia inhibitory factor is decreased among women with polycystic ovarian syndrome during assisted reproduction cycles. *Hum Reprod* 16:2073-2078
119. Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, Singer DE, Nathan DM, Rifai N, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW (2001) Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: the Framingham offspring study. *Diabetes Care* 24:1403-1410
120. Schachter M, Raziel A, Strassburger D, Rotem C, Ron-El R, Friedler S (2007) Prospective, randomized trial of metformin and vitamins for the reduction of plasma homocysteine in insulin-resistant polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 88:227-230. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.071
121. Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP (2006) Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod* 21:1725-1733. doi:10.1093/humrep/del081
122. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 13:225-238. doi:10.1093/humupd/dml063
123. Madsen JS, Kristensen SR, Klitgaard NA, Bladbjerg EM, Abrahamsen B, Stilgren L, Jespersen J (2002) Effect of long-term hormone replacement therapy on plasma homocysteine in postmenopausal women: a randomized controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 187:33-39
124. Hak AE, Polderman KH, Westendorp IC, Jakobs C, Hofman A, Witteman JC, Stehouwer CD (2000) Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis* 149:163-168
125. Cagnacci A, Generali M, Pirillo D, Baldassari F, Volpe A (2006) Effects of low- or high-dose hormone therapy on fasting and post-methionine homocysteine levels in postmenopausal women. *Climacteric* 9:388-395. doi:10.1080/13697130600870352
126. Bettahar-Lebugle K, Feugeas O, Wittemer C, Ohl J, Rongieres C, Nisand I (2002) [Evolution of homocysteine during ovarian stimulation for IVF or ICSI]. *Gynecol Obstet Fertil* 30:121-128
127. Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG (2007) Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 22:1513-1525. doi:10.1093/humrep/dem053
128. Crha I, Kralikova M, Melounova J, Ventruba P, Zakova J, Beharka R, Husicka R, Pohanka M, Huser M (2010) Seminal plasma homocysteine, folate and cobalamin in men with obstructive and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 27:533-538. doi:10.1007/s10815-010-9458-8
129. Berker B, Kaya C, Aytac R, Satioglu H (2009) Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 24:2293-2302. doi:10.1093/humrep/dep069
130. Jerzak M, Putowski L, Baranowski W (2003) [Homocysteine level in ovarian follicular fluid or serum as a predictor of successful fertilization]. *Ginekol Pol* 74:949-952

131. Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE (1991) Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 91:207-212
132. Ocal P, Ersoylu B, Cepni I, Guralp O, Atakul N, Irez T, Idil M (2012) The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J Assist Reprod Genet* 29:299-304. doi:10.1007/s10815-012-9709-y
133. Kuroki Y, Iwamoto T, Lee J, Yoshiike M, Nozawa S, Nishida T, Ewis AA, Nakamura H, Toda T, Tokunaga K, Kotliarova SE, Kondoh N, Koh E, Namiki M, Shinka T, Nakahori Y (1999) Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. *J Hum Genet* 44:289-292. doi:10.1007/s100380050162
134. Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP (2000) Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril* 73:435-442
135. MacLeod J (1943) The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 138:512-518
136. Sharma RK, Agarwal A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48:835-850
137. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR (1994) Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol* 152:107-110
138. Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F (1994) Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril* 62:862-868
139. Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E, Kovalski N (1991) Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 637:436-444
140. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, Akdas A (1997) Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 157:140-143
141. Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W (1997) Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 67:142-147
142. Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ, Jr. (2004) Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril* 82:621-627. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.02.112
143. Steptoe PC, Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2:366
144. Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J (1981) Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* 212:681-682
145. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM (1984) Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1:3-23
146. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH (2008) Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 90:77-83. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.058
147. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB (2001) Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 76:1175-1180
148. Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M (1999) Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or

- intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 14:2581-2587
149. Tesarik J, Greco E (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 14:1318-1323
 150. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J (1999) Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 14:2345-2349
 151. Bromer JG, Seli E (2008) Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20:234-241. doi:10.1097/GCO.0b013e3282fe723d
 152. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 16:373-378
 153. Botros L, Sakkas D, Seli E (2008) Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 14:679-690. doi:10.1093/molehr/gan066
 154. Seli E, Botros L, Sakkas D, Burns DH (2008) Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 90:2183-2189. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.07.1739
 155. Seli E, Bruce C, Botros L, Henson M, Roos P, Judge K, Hardarson T, Ahlstrom A, Harrison P, Henman M, Go K, Acevedo N, Siques J, Tucker M, Sakkas D (2011) Receiver operating characteristic (ROC) analysis of day 5 morphology grading and metabolomic Viability Score on predicting implantation outcome. *J Assist Reprod Genet* 28:137-144. doi:10.1007/s10815-010-9501-9
 156. Vergouw CG, Kieslinger DC, Kosteljik EH, Botros LL, Schats R, Hompes PG, Sakkas D, Lambalk CB (2012) Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 27:2304-2311. doi:10.1093/humrep/des175
 157. Nadal-Desbarats L, Veau S, Blasco H, Emond P, Royere D, Andres CR, Guerif F (2013) Is NMR metabolic profiling of spent embryo culture media useful to assist in vitro human embryo selection? *MAGMA* 26:193-202. doi:10.1007/s10334-012-0331-x
 158. Aydın B (2013) Embriyo Kültür Ortamındaki Homosistein Miktarının Embriyo Kalitesini Öngörmedeki Belirliyeciliğinin Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul
 159. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting (2011). *Hum Reprod* 26:1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037
 160. Mosher WD, Pratt WF (1991) Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 56:192-193
 161. Control CfD (2006) Society for Assisted Reproductive Technology (SART). Assisted reproductive technology success rates. National summary and fertility clinic reports. Atlanta, GA
 162. Kovalevsky G, Patrizio P (2005) High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril* 84:325-330. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.04.020
 163. Toner JP, Veeck LL, Acosta AA, Muasher SJ (1991) Predictive value of pregnancy during original in vitro fertilization cycle on implantation and pregnancy in subsequent cryothaw cycles. *Fertil Steril* 56:505-508
 164. El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, O'Mahony F, Wharf E, Taylor A, Braude P (2003) Cryo-thawed embryos obtained from conception cycles have double the implantation and pregnancy potential of those from unsuccessful cycles. *Hum Reprod* 18:1313-1318

165. Luke B, Martin JA (2004) The rise in multiple births in the United States: who, what, when, where, and why. *Clin Obstet Gynecol* 47:118-133
166. Luke B, Brown MB (2007) Contemporary risks of maternal morbidity and adverse outcomes with increasing maternal age and plurality. *Fertil Steril* 88:283-293. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.008
167. US Department of Health and Human Services PHS. US vital statistics, 1998 and from US Public Health Service. Healthy People 2000: National Health Promotion and Disease Prevention Objectives, DHHS Pub No. (PHS) 90-50212.
168. Suzuki T, Izumi S, Matsubayashi H, Awaji H, Yoshikata K, Makino T (2005) Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 83:908-913. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.028
169. Tinkanen H, Kujansuu E (2000) In vitro fertilization in patients with ovarian endometriomas. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79:119-122
170. Reinblatt SL, Ishai L, Shehata F, Son WY, Tulandi T, Almog B (2011) Effects of ovarian endometrioma on embryo quality. *Fertil Steril* 95:2700-2702. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.002
171. Yanushpolsky EH, Best CL, Jackson KV, Clarke RN, Barbieri RL, Hornstein MD (1998) Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a prospective, case-controlled study. *J Assist Reprod Genet* 15:193-197
172. Kumbak B, Kahraman S, Karlikaya G, Lacin S, Guney A (2008) In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts. *Gynecol Obstet Invest* 65:212-216. doi:10.1159/000112310
173. Hauzman EE, Garcia-Velasco JA, Pellicer A (2013) Oocyte donation and endometriosis: What are the lessons? *Semin Reprod Med* 31:173-177. doi:10.1055/s-0032-1333483
174. van Aerts LA, Klaasboer HH, Postma NS, Pertijs JC, Copius Peereboom JH, Eskes TK, Noordhoek J (1993) Stereospecific in vitro embryotoxicity of l-homocysteine in pre- and post-implantation rodent embryos. *Toxicol In Vitro* 7:743-749
175. Zhao R, Li Y, Chen X (2001) [Effects of homocysteine on post-implantation rat embryo cultured in vitro]. *Wei Sheng Yan Jiu* 30:34-36
176. Hansen DK, Grafton TF, Melnyk S, James SJ (2001) Lack of embryotoxicity of homocysteine thiolactone in mouse embryos in vitro. *Reprod Toxicol* 15:239-244