



**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI**  
İSTANBUL  
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi  
Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları  
Eğitim ve Araştırma Hastanesi

**T.C.**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL ZEYNEP KAMİL**  
**KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI**  
**SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**  
**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ**

**GRANULOZA HÜCRE DNA HASAR DÜZEYİNİN**  
**YARDIMCI ÜREME TEKNİK BAŞARISINDAKİ**  
**ÖNGÖRÜ DEĞERİ**

**Dr. Erman Çiftçi**

Bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2022/138  
proje numarası ile desteklenmiştir.

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL/2023**



**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI**  
İSTANBUL  
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi  
Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları  
Eğitim ve Araştırma Hastanesi

**T.C.**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL ZEYNEP KAMİL**  
**KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI**  
**SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**  
**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ**

**GRANULOZA HÜCRE DNA HASAR DÜZEYİNİN**  
**YARDIMCI ÜREME TEKNİK BAŞARISINDAKİ**  
**ÖNGÖRÜ DEĞERİ**

**Dr. Erman Çiftçi**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. İlhan Şanverdi**

Bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2022/138  
proje numarası ile desteklenmiştir.

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL/2023**

## TEŞEKKÜR

Asistan eğitimim sürecindeki emeklerinden dolayı, hastane başhekimimiz ve tez danışmanım Doç. Dr. İlhan Şanverdi'ye,

Asistanlık sürecinde her zaman desteğini hissettiğim, eğitim sorumlumuz Prof. Dr. Pınar Kumru'ya, uzmanlık tez sürecinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan yardımcı tez danışmanım Prof. Dr. Enis Özkaya'ya ve Prof. Dr. Sadık Şahin'e ve tez sürecinde desteğini esirgemeyen Embriyoloji bölümünden Uzm. Dr. Gökşen Derya Reis Köse'ye, Uzm. Dr. Zübeyde Çalışkan'a, tez sürecimin başından itibaren yanımda olan Op. Dr. Özgür Uzun'a, bu süreçte Tüp Bebek Kliniğinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Belgin Devranoğlu'na,

Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde aldığım uzmanlık eğitimim süresince, sabırla deneyimlerini bizlere aktaran ve dört yıllık eğitimim boyunca beni yetiştirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, öncelikle canım abim Doç. Dr. Resul Karakuş'a, Doç. Dr. Çetin Kılıççı'ya, Doç. Dr. Erbil Çakar'a, canım ablam Op. Dr. Sultan Seren Karakuş ve Op. Dr. Müşerref Banu Yılmaz'a olmak üzere tüm Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği uzman kadrosuna,

Asistanlık dönemim boyunca akademik anlamda bana vizyon katan ve yardımlarını esirgemeyen Op. Dr. Sami Açar'a, tez sürecinde desteğini esirgemeyen Op. Dr. Aylin Çakıroğlu'na,

Asistanlık dönemi boyunca ilk günden beri her an birlikte güldüğüm, birlikte zorluklarla mücadele ettiğim Dr. Sare Merve Yılmaz ve Dr. Mehmet Can Keyfoğlu'na, her sabah güne keyifle başlamamı sağlayan ve hastaneyi ikinci evim olarak hissettiren tüm ameliyathane ekibine, ekip ruhu içinde çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma ve tüm hastane çalışanlarına,

Her zaman kendimi geliştirmem için arkamda olan, sonsuz ve koşulsuz sevgileri ve fedakarlıklarıyla her zaman bana inançları tam olan canım annem Nurcan Çiftçi'ye, canım babam Vedat Çiftçi'ye, biricik kardeşim Av. Simay Çiftçi'ye, canım teyzem Dr. Gülcan Şahin'e ve canım eniştem Dr. Ali Ekber Şahin'e,

Her zaman örnek aldığım rol model aldığım, kadın doğum branşıyla beni tanıştırdığı ve destekleri için Op. Dr. Reşat Bahat'a en içten teşekkürlerimle,

Dr. Erman Çiftçi

İstanbul-2023

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
KISALTMALAR DİZİNİ .....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÖZET .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Yardımcı Üreme Teknolojileri.....	3
2.1.1. İn Vitro Fertilizasyon .....	3
2.1.2. Intrazitoplazmik Sperm İnjesiyonu.....	3
2.1.3 Kontröllü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH) .....	4
2.1.4. Oosit Derecelendirilmesi .....	5
2.1.5. Embriyo Derecelendirilmesi.....	6
2.2. İnfertil Hastaya Yaklaşım ve İnfertilite nedenleri.....	8
2.2.1. Tubal Faktör .....	8
2.2.2. Ovulatuvar Disfonksiyon ve Anovulasyon.....	9
2.2.3. Endometriozis.....	9
2.2.4. Erkek Faktörü .....	10
2.2.5 Düşük Over Rezervi .....	10
2.2.6 Açıklanamayan İnfertilite .....	12
2.2.7 Uterin ve Servikal Faktörler .....	12
2.2.8. Genetik Faktör .....	13
2.3. Fertilitiyi Etkileyen Çevresel Faktörler.....	14
2.4. Ovaryum ve DNA Çift Zincir Kırıkları .....	16
2.4.1. Kumulus Ooforus Hücreleri (KH) .....	16
2.4.2. DNA Çift Zincir Kırığı Belirteci Olarak $\gamma$ -H2AX.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA .....	39

6. SONUÇLAR.....	43
7. KAYNAKLAR.....	44



## KISALTMALAR

<b>AFS</b>	: Antral Folikül Sayısı
<b>Aİ</b>	: Açıklanamayan İnfertilite
<b>AMH</b>	: Anti-Müllerian Hormon
<b>ET</b>	: Embriyo Transferi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DOR</b>	: Düşük Over Rezervi
<b>DSB</b>	: DNA double stranded break (DNA çift zincir kırığı)
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ESHRE</b>	: European Society of Human Reproduction and Embryology
<b>FSH</b>	: Folikül Stimulan Hormon
<b>GERM1</b>	: Gremlin 1
<b>GİFT</b>	: Gamet İntrafolliyan Transferi
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin Releasing Hormon
<b>GWAS</b>	: Genome-Wide Association Studies (Genom Çapında İlişkilendirme Çalışması)
<b>HAS2</b>	: Hyaluronan sentaz 2
<b>HMG</b>	: Human Menopozal Gonadotropin
<b>HSG</b>	: Histerosalpingografi
<b>ICMART</b>	: The International Committee for Monitoring. Assisted Reproductive Technology
<b>İCSİ</b>	: İntracytoplasmik Sperm Injection (intrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu)
<b>İHM</b>	: İç Hücre Matriksi
<b>İVF</b>	: İn Vitro Fertilizasyon
<b>İUI</b>	: (İntrauterin İnseminasyon)
<b>KH</b>	: Kumulus ooforus hücresi
<b>KOH</b>	: Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon
<b>KOK</b>	: Kumulus-Oosit Kompleksi
<b>LH</b>	: Luteinize edici Hormon
<b>MFI</b>	: Mean Flourescence Intensity (Ortalama Floran Yoğunluğu)

<b>MRG</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>OD</b>	: Odds Ratio
<b>OS</b>	: Ovaryan Stimulasyon
<b>OHSS</b>	: Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu
<b>OPU</b>	: Oosit Pick-up
<b>PB</b>	: Polar Body (Polar cisimcik)
<b>PIKK</b>	: phosphatidyl-inositol-3-kinase-related kinases (fosfatidil-inozitol-3-kinaz ilişkili kinazlar)
<b>PKOS</b>	: Polikistik Over Sendromu
<b>PVB</b>	: Perivitellin Boşluk
<b>RKÇ</b>	: Randomize Kontrollü Çalışma
<b>SGH</b>	: Sonohisterografi
<b>SNP</b>	: Single-Nucleotide Polymorphism – Tek nükleotid polimorfizm
<b>TE</b>	: Trofoektoderm
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VKİ</b>	: Vücut Kitle İndeksi
<b>YÜT</b>	: Yardımcı Üreme Teknikleri
<b>ZİFT</b>	: Zigot İntrafallopian Transferi
<b>ZP</b>	: Zona Pellucida

## TABLÖLAR

<b>Tablo 1:</b> Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarının biyokimyasal ve sosyodemografik parametrelerinin karşılaştırılması ....	23
<b>Tablo 2:</b> Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarının emriyoloji laboratuvar takibi değerlendirmeleri karşılaştırılması.....	24
<b>Tablo 3:</b> Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi grupları arasında fertilizasyon, gebelik ve fertilizasyon başarısızlığının karşılaştırılması .	25
<b>Tablo 4:</b> Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarının protein parametrelerinin karşılaştırılması .....	26
<b>Tablo 5:</b> Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarında gebelik durumuna göre p- H2AX/H2AX MFI değerinin karşılaştırılması .....	32
<b>Tablo 6:</b> Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarında gebelik durumuna göre p- H2AX/H2AX % değerinin karşılaştırılması.....	38

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile maturasyon oranı arasındaki ilişki .....	27
<b>Şekil 2:</b> Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile maturasyon oranı arasındaki ilişki .....	28
<b>Şekil 3:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişki .....	29
<b>Şekil 4:</b> Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişki .....	30
<b>Şekil 5:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki.....	30
<b>Şekil 6:</b> Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki .....	31
<b>Şekil 7:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki.....	32
<b>Şekil 8:</b> Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki .....	33
<b>Şekil 9:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile maturasyon oranı arasındaki ilişki .....	34
<b>Şekil 10:</b> Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile maturasyon oranı arasındaki ilişki .....	34
<b>Şekil 11:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişki .....	35
<b>Şekil 12:</b> Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişki .....	36
<b>Şekil 13:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki .....	36
<b>Şekil 14:</b> Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki .....	37
<b>Şekil 15:</b> Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile 5. Gün	

embriyo oranı arasındaki ilişki

**Şekil 16:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki .....38



## ÖZET

**Amaç:** Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta gruplarında tanımlayıcı, biyokimyasal ve embriyoloji takibi değerlendirilmesine ek olarak iki gruptan alınan foliküler sıvıda, DNA çift zincir kırığı belirteci olarak p-H2AX MFI, H2AX MFI, p- H2AX / H2AX MFI, p- H2AX %, H2AX % ve p- H2AX / H2AX % parametrelerini inceleyerek gebelik sonuçlarına olan etkisini araştırmayı planladık.

**Gereç ve Yöntem:** Bu prospektif çalışma Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi İVF kliniğine 20.06.2022- 20.06.2023 tarihleri arasında başvuran ve gerekli kriterleri karşılayan 42 açıklanamayan infertil, 49 düşük over rezervi hasta olmak üzere toplam 91 hasta ile yapılmıştır. Her iki gruptaki hastalara İCSİ uygulanmıştır. OPU işlemi esnasında oosit ve granüloza hücreleri toplanarak uygun medyuma transfer edildikten sonra foliküler sıvı 15 ml'lik konik tüplerde toplandı. Toplanan foliküler sıvı, proje ortağı olan Yeditepe Üniversitesi Doku Tipleme Laboratuvarına teslim edildi. Laboratuvarda, sıvının santrifüj ve süspansiyonunu takiben fiksasyon ve permeabilizasyon sonrası hücrelere CD45- hücre popülasyonu üzerinden kapılama yapıldı ve Histon H2A.X ile fosforile formu Gamma H2A.X protein seviyeleri belirlendi.

**Bulgular:** Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta grupları arasında, foliküler sıvıda, p- H2AX MFI, H2AX MFI, p- H2AX / H2AX MFI, p- H2AX %, H2AX % ve p- H2AX / H2AX % parametreleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu bilgiye ek olarak düşük over rezervi hasta grubunda p- H2AX/H2AX % değeri arttıkça 5. Gün kaliteli embriyo oranı azaldığı görülmüştür fakat gebelik sonuçlarıyla anlamlı olarak farklılaşmadığı tespit edilmiştir. Açıklanamayan infertilite hasta grubu açısından H2AX/H2AX MFI değeri arttıkça 3. Gün kaliteli embriyo oranı azaldığı görülmüş fakat p- H2AX/H2AX MFI ve p- H2AX/H2AX % değerlerinin gebelik sonuçlarıyla anlamlı olarak ilişkisi tespit edilememiştir.

**Sonuç:** Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta gruplarında foliküler sıvıda bakılan DNA hasar belirteç oranları ve embriyoloji takipleri arasında anlamlı farklar olsa da gebelik sonuçlarıyla kıyaslandığında anlamlı sonuç bulunamamıştır. Çalışmamız bu iki infertil hasta alt grubu arasında DNA hasarını IVF başarısı açısından kıyaslayan literatürdeki tek çalışma özelliğini taşımaktadır. Gelecekte foliküler sıvıda yapılacak olan çalışmaların açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi etiolojisini belirleyebileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Granuloza hücresi, açıklanamayan infertilite, düşük over rezervi, H2AX protein, İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu



## ABSTRACT

**Objective:** In our study, beyond the comprehensive assessment of descriptive, biochemical and embryological parameters in patients with unexplained infertility and diminished ovarian reserve, we aimed to investigate the impact on pregnancy outcomes by analyzing parameters such as p- H2AX Mean Fluorescence Intensity (MFI), H2AX MFI, p- H2AX / H2AX MFI, p- H2AX %, H2AX % ve p- H2AX / H2AX % in the follicular fluid samples collected from both groups, which serve as indicators of DNA double-strand breaks.

**Materials and Methods:** This prospective study was conducted at the IVF Clinic of Zeynep Kamil Maternity and Children's Training and Research Hospital between June 2022 and June 2023. It involved a total of 91 participants, including 42 patients diagnosed with unexplained infertility and 49 with diminished ovarian reserve, all of whom met the established inclusion criteria. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was performed in both groups. The follicular fluid was then collected in 15 ml conical tubes. The gathered follicular fluid was subsequently delivered to the Yeditepe University Tissue Typing Laboratory, a collaborative partner in the Project. In the laboratory, following the centrifugation and suspension of the fluid, cells underwent fixation and permeabilization. Subsequently, capture was performed on the CD45- cell population, and the levels of Histon H2A.X and its phosphorylated form, Gamma H2A.X protein were determined.

**Results:** In our study, no significant statistical difference was found between the groups of patients with unexplained infertility and diminished ovarian reserve in terms of the parameters p- H2AX MFI, H2AX MFI, p- H2AX / H2AX MFI, p- H2AX %, H2AX % and p- H2AX / H2AX % in the follicular fluid. Furthermore, within the cohort exhibiting diminished ovarian reserve, it has been observed that an increase in the p- H2AX / H2AX % value corresponded to a decline in the proportion of the 5th day high-quality embryos. However, it was determined that this did not significantly statistically differ in relation to pregnancy outcomes. For the group diagnosed with unexplained infertility, it was observed as the p- H2AX

/ H2AX MFI value increased, there was a decline in the proportion of the 3rd day high-quality embryos. However, no statistically significant correlation was identified between p- H2AX/H2AX MFI ve p- H2AX/H2AX % values and subsequent pregnancy outcomes.

**Conclusion:** In the context of our study, despite evident differences observed in the quantification of DNA damage markers within the follicular fluid and the associated embryological assessments among cohorts presenting with unexplained infertility and diminished ovarian reserve, these differences did not Show statistically significant outcomes when compared with pregnancy results. To the best of our knowledge, this study is the only research in the literature that compares DNA damage double-strand break between these two subgroups of infertile patients regarding IVF success. We believe that studies on follicular fluid may determine the etiology of unexplained infertility and diminished ovarian reserve in the future.

**Keywords:** Granulosa cells, Unexplained infertility, Diminished ovarian reserve, H2AX protein, Intracytoplasmic sperm injections

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yardımcı üreme teknolojileri (YÜT), infertil çiftlerin tedavisi için yaygın kabul gören yöntemler haline gelmiştir. 1978 yılından bu yana YÜT tedavileri ile yaklaşık olarak 5 milyon bebek dünyaya gelmiştir. Bu rakam, ülkeler arası değişkenlik göstermekle beraber tüm doğumların %1'i ile %4'ünü oluşturmaktadır [1-3]. YÜT tedavilerinden olan in-vitro fertilizasyon'nun (İVF) uygulandığı infertilite etiyolojileri arasında tubal faktör, erkek faktörü, düşük over rezervi, ovulatuvar disfonksiyon ve etiyolojisi belirsiz açıklanamayan infertilite durumları bulunmaktadır [4].

Açıklanamayan infertilite, genellikle ovülasyon testleri, tübüler geçirgenlik testleri ve semen analizi gibi standart infertilite incelemelerinin tümünün normal olduğu çiftlerde yapılan bir tanıyı (veya tanı eksikliğini) ifade eder [5]. Açıklanamayan infertilitenin prevalansı, tanısı için gerekli özel bir testin olmaması ve/veya yanlış tanı koyulması nedeniyle hala tartışmalıdır. Ortak bir protokolün kullanıldığı Kanada merkezli 11 merkezi kapsayan bir çalışmada, açıklanamayan infertilite oranı %8 ile %37 arasında değişiklik göstermektedir [6]. Açıklanamayan infertilite tedavisinde YÜT uygulaması öncesi bekle ve gör yaklaşımı önerilse de, hastanın yaşı, infertilite süresi, gebelik geçmişi gibi durumlar göz önünde tutulmalıdır [7].

Düşük over rezervi (DOR), oositlerin sayısı ve kalitesinde azalmayı tanımlamaktadır [8]. Menapoz veya prematür over yetmezliğinden farklı olarak, genellikle düzenli döngüleri bulunan üreme çağındaki kadınlarda, benzer yaş grubundaki kadınlara göre uyarılma yanıtı veya fekunditesi azalmış olan hasta gruplarını tanımlamak için kullanılır [9]. Yardımcı Üreme Teknolojileri Cemiyeti'nin (SART – Society for Assisted Reproductive Technology), düşük over yanıtını öngörme adına 181.536 siklusun değerlendirildiği bir raporda, Devine ve arkadaşları 2004'ten 2011'e kadar geçen süreçte DOR prevalansının %19'dan %36'ya ulaştığını belirtmiştir [10].

İnfertilite durumlarının yaklaşık %37'sini kadına bağlı faktörler oluşturmaktadır [11]. YÜT tedavisi ile gebelik elde edilmesi veya canlı doğuma ulaşabilmek için kaliteli gametlere, embriyolara ve implantasyonu destekleyecek

maternal hazırlığa ihtiyaç duyulmaktadır [12]. Tüm bu koşulların karşılanabilmesi adına, ilaç tedavisi ve cerrahi müdahalelerde önemli gelişmeler elde edilmiştir. Fakat, başarı olarak artış görülse de, gebelik oranları henüz beklenen seviyelerde değildir [13]. Oositin intrafoliküler ortamındaki fiziksel ve kimyasal şartlar, reproduktif biyolojide merkezi bir öneme sahiptir. Oositin çevresini saran kumulus hücreleri, oosit maturasyon sürecini destekleyici bir fonksiyon gösterirken, aynı zamanda advers çevresel faktörlere karşı bir bariyer oluşturmaktadır. Güncel literatür, oosit ile komşu foliküler somatik hücreler arasındaki intrinsik etkileşimi vurgulayarak, kumulus ve granuloza hücrelerinin, oositin reproduktif kapasitesine katkıda bulunduğunu belirtmektedir [14].

Bu gözlemler, maternal yaşlanma ve eksternal risk faktörlerine bağlı DSB'lerde bir artışın, YÜT protokollerinin sonucunu tahmin etmek için ikna edici göstergeler olarak kullanılabilmesi hipotezini oluşturmamıza neden olmuştur.

Bu çalışmada, oosit mikroçevre elemanlarının (kumulus ooforus hücreleri, granuloza hücreleri) DNA hasar oranları ile YÜT tedavi sonuçları arasındaki ilişkinin araştırılması amaçladık.

Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta gruplarında tanımlayıcı, biyokimyasal ve embriyoloji takibi değerlendirilmesine ek olarak iki gruptan alınan foliküler sıvıda, DNA çift zincir kırığı belirteci olarak p-H2AX MFI, H2AX MFI, p-H2AX / H2AX MFI, p-H2AX %, H2AX % ve p-H2AX / H2AX % parametreleri incelenerek gebelik sonuçlarına olan etkisini araştırmayı planladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. YARDIMCI ÜREME TEKNOLOJİLERİ (YÜT)

Yardımcı Üreme Teknolojileri (YÜT), reproduktif amaçlı hem oositlerin hemde spermin veya embriyoların in vitro manipülasyonunu içeren tüm prosedürleri kapsamaktadır. Bu tanım in vitro fertilizasyon (İVF) ve embriyo transferine (ET) ek olarak intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (İCSİ), embriyo biopsisi, preimplantasyon genetik tanı (PGT), asiste zona hatching, gamet intrafallopian transferi (GİFT), zigot intrafollapian transferi (ZİFT), gamet ve embriyo kriyoprezervasyonu, sperm, oosit ve embriyo donasyonu ve gestasyonel taşıyıcı sükluslarını kapsamaktadır. Bu çerçevede, YÜT, bir kadının partnerinden veya bir sperm donöründen sperm kullanılarak yapılan yardımcı inseminasyonu içermemektedir [15].

İnsanlarda gerçekleştirilen ilk başarılı in vitro fertilizasyon (IVF) uygulaması 1978 yılında İngiltere’de uygulanmıştır. Bu prosedürde, ovulasyon indüksiyonu uygulanmamış bir hastadan laparoskopik yöntemle tek bir oosit ekstrakte edilmiştir. Elde edilen oosit in vitro ortamda fertilizasyonu sağlanmış ve ardından embriyo transferi gerçekleştirilmiştir [16].

Belirtilen dönemden itibaren, YÜT prosedürleri klinik ve embriyolojik yönden önemli gelişmeler göstermiştir ve bu teknolojinin global erişim ve uygulama kapasitesi artmıştır [17].

#### 2.1.1. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

İVF, laboratuvar ortamında gametlerin fertilizasyon sürecini içeren bir dizi prosedürü kapsamaktadır. İVF uygulaması, kadında üretimi için ovarian stimülasyonu, oositlerin toplanmasını, in vitro fertilizasyon işlemi ve sonrasında elde edilen embriyoların uterin kaviteye transferini içermektedir [15].

#### 2.1.2. İntrasitoplazmik Sperm İnjeksiyonu (İCSİ)

İCSİ, başlangıçta erkek faktörüne dayalı infertilite vakarı için geliştirilmiş bir İVF yöntemi olsa da günümüzde bu yöntemin kullanımı yalnızca erkek faktörüne özgü durumlarla sınırlı değildir [18]. İCSİ işlemi tek bir spermatozoonun oosit

sitoplazmasına enjekte edilmesini ve laboratuvar ortamında fertilizasyonun sağlanmasını içerir [15]. Hem İVF hemde İCSİ yöntemi fertilizasyonu desteklemek için uygulansa da bu iki yöntem bu amaca ulaşma sürecinde farklı yollar izler. İVF sırasında, oosit bir sperm konsantrasyonuna maruz kalır ve sperm doğal yollarla seçilmesine olanak sağlar. Öte yandan, İCSİ doğal seçim sürecini göz ardı ederek, laboratuvar ortamında bir oosite tek bir sperm doğrudan enjekte etmektedir [19]. YÜT tedavilerinin artan popülaritesi ve dünya genelinde her yıl gerçekleştirilen çok sayıda İVF/İCSİ prosedürü göz önüne alındığında, İVF ve genel olarak İVF/İCSİ, ovarian hiperstimülasyon sendromu, çoğul gebelik ve konjenital anomaliler (hipospadias dahil) riskinde bir artış ile ilişkilendirildiği unutulmamalıdır [20].

### **2.1.3. Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon (KOH)**

Ovarian hiperstimülasyon, yardımcı üreme tekniklerinin ayrılmaz bir parçasıdır. Kontrollü ovarian hiperstimülasyondaki amaç, çoklu dominant foliküllerin sürekli gelişimini teşvik etmek ve birçok oositin olgunlaşmasını desteklemektir. Bu süreç, in vivo veya in vitro gebelik olasılığını arttırmayı amaçlamaktadır. Bu işlem, oositlerin fertilizasyon kapasitesini maksimize ederek başarılı konsepsiyon ve sonrasında sağlıklı bir gebelik olasılığını yükseltmeye yöneliktir [21, 22].

Kontrollü ovarian hiperstimülasyonun (KOH) iki esas bileşeni bulunmaktadır. Birincisi, foliküllerin folikül uyarıcı hormone (FSH) ya da human menopozal gonadotropinler (HMG) ile uyarılmasıdır. Diğeri ise, genellikle gonadotropin salgılayıcı hormone (GnRH) agonistleri veya antagonistleri kullanılarak erken ovulasyonun engellenmesidir. HMG, FSH ve luteinize edici hormon (LH) içermektedir. FSH uygulanmasındaki amaç çok sayıda folikülün büyümesi ve gelişmesidir. FSH'in dozu ve uygulama süresi, yaş, ovarian rezerv ve geçmiş stimülasyon döğülerine verilen yanıt gibi hastanın özelliklerine bağlı olarak ayarlanabilmektedir [23]. GnRH analogları, LH'in erken salınımını baskılayarak, fertilizasyon için optimal olan folikül gelişimini ve olgunlaşmasını destekler. Agonist ve antagonist olarak her iki türü de sıklıkla YÜT protokollerinde kullanılmakta ve başarı oranlarını artırmada kritik bir role sahiptirler [24]. GnRH agonist analogları, hipofiz bezindeki GnRH reseptörlerini kaplayarak duyarsızlaşmaya neden olur.

Başlangıçta, granüllerde üretilen ve depolanan FSH salınımını desteklerken, devamında hipofiz bezi hormonlarının (FSH ve LH) üretimini engeller. İlk aşamalı hipofiz engeli ilaç kullanımına başladıktan 3 ile 4 hafta sonra oluşur ve etkisi uzun sürelidir, kullanımının kesilmesinden bir kaç hafta sonra bile etkisi sürebilir [25]. Bu kullanım, LH'nin erken salınımını önler ve uyarının daha iyi kontrol edilmesine olanak sağlar [26]. Bununla beraber, antagonistler, verilen doza bağlı bir etki ile hipofiz bezinde GnRH reseptörlerinde kompetitif blokaj sağlar ve gonadotropin salgılanmasının önüne geçer. Sonuç olarak hipofiz hormonlarının, özellikle LH salınımını engellemiş olur. Etki başlangıcı hemen gerçekleşir ve etki süresi yaklaşık 34 saat sürer [24, 27, 28].

Güncel çalışmalar, iki indüksiyon protokolünün elde edilen oositler, döllenmiş embriyolar, gebelik ve doğum oranları açısından eşdeğer olduğu yönündedir. Ancak, antagonist protokolün, ovarian hiperstimülasyon sendromu (OHSS) oluşumunun daha düşük olması nedeniyle daha güvenli görülsede, literatür agonist protokolüyle daha fazla gonadotropin kullanım ihtiyacı olduğunu göstermiştir. Bununla beraber hastalar için daha yüksek maliyet oluşturduğunu ve OHSS riskinde artış olduğu görülmüştür.[24, 28-32].

#### **2.1.4. Oosit Derecelendirilmesi**

Oosit derecelendirilmesi, morfolojik niteliklere dayanarak, oosit kalitesinin öznel bir analizini gerçekleştirir ve en yüksek gelişim potansiyeline sahip oositleri belirleyip seçmeyi hedeflemektedir. Bu yaklaşım ile başarılı fertilizasyonun ve sonrasında embriyo gelişimi maksimize edilmiş olur.

#### **Oosit Puanlaması için Morfolojik Kriterler**

Oosit kalitesinin değerlendirilmesi için kullanılan yöntemleri oositin her bir hücresel bölümünü ve çevresini esas alarak, morfolojik analiz ve sınıflandırmaya dayanmaktadır. Konvansiyonel mikroskop kullanılarak kumulus hücreler, zona pellucida (ZP), polar cismin (Polar Body, PB) varlığı, perivitellin boşluğu (PVB) ve sitoplazma incelenir [33].

1. Kumulus-Oosit Kompleksi (KOK), oositi ve onu çevreleyen tüm hücreleri içerir. Kompleks içerisindeki kan pıhtılarının varlığı, oosit kalitesi, fertilitite

oranları, bölünme oranları ve blastokist oluşumu ile ilişkili azalmış olduğu görülmüştür. Genişlemiş, kabarık kumulus hücreleri ve genişlemiş korona hücreleri, daha yüksek dölllenme oranları ve gebelik ile ilişkilendirilmektedir [34].

2. Polar Cisim (PB), oositin olgunlaşma süreci sırasında atılan ve 23 kromozom içeren küçük bir hücredir. Yapılan birçok çalışmada, PB'nin bütünlüğü, şekil veya bütünlüğünün oosit kalitesini değerlendirmek için kullanılabileceğini ve hatta ovulasyon sonrasında yaşlanma durumunun tahmin edilebileceğini göstermiştir [33, 35]. İntakt bir PB'ye sahip oositler daha yüksek fertilizasyon oranları gösterirken, büyük, düzensiz veya parçalanmış bir polar cisime sahip oositler daha düşük fertilizasyon oranı vermektedir [35-37].
3. Zona Pellucida (ZP), oositin çevresini saran ekstrasellüler matrikstir. Pre-antral folikül aşamasında oosit I tarafından salgılanır ve corona radiata'nın peri-oosit hücreleri tarafından oluşturulur. Kalın bir ZP veya ZP'nin kalın iç tabakası, daha iyi oosit gelişimi ve embriyo kalitesi ile ilişkili bulunmuştur [34]. Aksine, daha ince yapıdaki ZP, sperm penetrasyonunun kolaylaştırılması ile ilişkilendirilerek daha iyi bir fertilizasyon oranı sağladığı belirtilmiştir [34, 36]. Sonuç olarak, ZP'nin tek başına incelenmesi, oosit kalitesinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi açısından yeterli olmamaktadır.
4. Perivitellin Boşluk (PVB), polar globülü içeren ve ZP ile oosit II membranı arasındaki alanı kapsamaktadır. PVB ideal olarak düz ve net olmalıdır [34, 38].
5. Sitoplazma, ideal koşullar altında, homojen ve yarı-opak bir yapıya sahip olmalıdır. Koyu ve granüler olması vakuoller veya kırılğan cisimcikler gibi anomaliler, oositin gelişimsel kapasitesini olumsuz yönde etkileyebilme potansiyeline sahiptir [39].

### **2.1.5. Embriyo Derecelendirilmesi**

Embriyo kalitesinin değerlendirilmesi, gebelikle sonuçlanacak embriyoları seçme noktasında, YÜT uygulamaları açısından kritik öneme sahiptir. Embriyo derecelendirme sisteminin kullanılması, transfer öncesi embriyoların doğru bir şekilde seçimi, çoğul gebelik riskinin azaltılması, farklı eki yerlerinin

değerlendirilmesi ve sikluslar arasında embriyo kalite karşılaştırılması açısından birçok potansiyel fayda sunmaktadır [40].

### **Zigot Derecelendirmesi (1. Gün)**

Fertilizasyonun değerlendirilmesi, fertilize bir oositte iki pronükleus ve iki PB görünümü ile doğrudan yapılmaktadır. Derecelendirmenin morfolojik parametreleri arasında polarizasyon, sitoplazmik halo varlığı, pronükleus sayısı ve pronükleus görünümü bulunmaktadır [41].

### **Bölünme Aşaması Embriyo Derecelendirmesi (2. Ve 3. Gün)**

Fertilizasyonun ardından 2. Veya 3. Günlerde incelenen bölünme evresinde embriyolar, hücre sayısı/blastomer, parçalanma seviyesi ve blastomerlerin simetrisine göre sıralanır. Kaliteli bir bölünme evresindeki embriyo, az miktarda parçalanma (<%10) gösterir ve genellikle 2. Günde 4 hücre ve 3. Gününde 8 hücre içerir. Embriyolar, çeşitli sınıflandırma yöntemleri kullanılarak, sınıf 1'den en yüksek kaliteye, sınıf 4'e kadar en düşük kaliteye göre kategorize edilir [41].

### **Blastokist Embriyo Derecelendirmesi (4-6. Gün)**

Fertilizasyonu takiben 4. günden itibaren incelenen blastokistler, genişleme seviyeleri ve oositten çıkma durumlarına, iç hücre maktriksi (İHM) morfolojisine ve trofoektoderm (TE) yapısına göre derecelendirilir [42]. Bir embriyonun genişlemeye başladığında (3-6 aralığındaki blastokist değerlendirilmesi, tam blastokist ve devamını belirtmektedir), İHM ve TE için bağımsız derecelendirme yapmak mümkündür. Bir sonraki aşamada, ters ışık mikroskop kullanılarak A, B ve C dereceleri kullanılmaktadır. İHM için; A derecesi, birçok hücre içeren yoğun bir yapıyı; B sınıfı, daha gevşek ve birçok hücre içeren bir yapıyı; C sınıfı ise az sayıda hücre içeren bir yapıyı ifade eder. TE için; A sınıfı, birçok hücre barındıran kohezif bir epitel yapısını; B sınıfı, az sayıda hücre içeren gevşek bir epitel yapısını; C sınıfı ise en az hücre içeren epitel yapısını temsil etmektedir [41].

## **2.2. İNFERTİL HASTAYA YAKLAŞIM VE İNFERTİLİTE NEDENLERİ**

Genel perspektifte, infertilite, korunmasız cinsel birliktelik sonrasında bir yıl veya daha uzun süre gebelik elde edememe durumu olarak tanımlanır. Kadınlarda fertilité kapasitesinin yaş ile doğru orantılı bir şekilde azaldığı bilimsel bir gerçek olarak kabul edildiğinden, 35 yaş ve üzeri kadınlar için bu süre altı ay olarak belirtilmiştir[43].

Fertilite değerlendirilmesi, oligomenore veya amenore olan kadınlar için de önerilmektedir. Bilinen veya şüpheli uterin, tubal veya peritoneal hastalığı olan (III veya IV evre endometriozis dahil) ve bilinen veya şüphelenilen erkek faktörü durumunda erkek partnerler için de bu değerlendirme önerilmektedir [44]. İnfertilite durumu, infertil çiftlerin %85' inde normal fizyolojik süreçte tanımlanabilen anormallikler veya alta yatan patolojiler tarafından meydana gelmektedir. İnfertilitenin en yaygın sebepleri ovulasyon disfonksiyonu, erkek faktörü infertilitesi ve tubal hastalıklardır. İnfertil çiftlerin geri kalan %15 i ise açıklanamayan infertiliteye sahiptirler [45].

### **2.2.1. Tubal Faktör**

Tubal infertilite, fallop tüplerinin tıkanması veya pelvik adezyonlar nedeniyle tüplere overlerden oositin geçememesi olarak tanımlanır ve infertilite tanılarının %11 ile %67'si arasında bir orana sahiptir [11, 46]. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyon geçmişi olan kadınlarda (tubal hastalığın en yaygın sebebi), servikal displazi, intra-abdominal cerrahi veya daha önce intra-abdominal enfeksiyon (örneğin, perfore apendisit) öyküsü olan kadınlarda şüphelenilmelidir [47].

Tubal infertilite için birinci sıra tanı aracı olan Histerosalpingografi (HSG), radyopak maddenin (yağ veya suda çözünür) uterin serviks üzerinden uterin boşluğa ve ardından fallop tüplerine floroskop eşliğinde görüntülediği bir yöntemdir. Bu yöntemin duyarlılığı %65 ve özgüllüğü %83 tür [48].

Güncel bir çalışmada, bilateral tubal geçirgenliği mevcut olan infertile kadınlar ile tek taraflı proksimal tubal blokajı olan hastalar kıyaslandığında KOH sonrası intrauterine inseminasyon (IUI) sonrası gebelik oranları benzer bulunmuştu

[49]. Ancak, bilateral tubal obstrüksiyon söz konusu olduğunda, tubal geçirgenliği geri kazandırmak için cerrahi veya IVF yaklaşımı ön planda tutulmalıdır. Tubal cerrahi veya IVF seçimi, erkek partnerin yaşı, infertilite süresi ve diğer tanılarının varlığı (örneğin erkek faktörü), önceki gebelik başarısı ve istenen gebelik sayısı, tubal patolojinin yaygınlığı ve finansal kaynaklara dayanmaktadır [50].

### **2.2.2. Ovulatuvar Disfonksiyon ve Anovülasyon**

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, ovulatuvar disfonksiyon, infertilite tanılarının %25' ini oluşturmaktadır [11]. Menstrüel siklusların düzensizlik durumunda, 21 günden kısa veya 35 günden uzun döngülerde olması, hasta anormal uterin kanama veya amenore tariflediğinde anovülasyondan şüphelenilmelidir [51].

Anovülasyonun en yaygın nedeni polikistik over sendromu (PKOS)'dur, bu durum anovülasyon yaşayan kadınların %70'ini etkilemektedir [52]. Özellikle obezite, PKOS'dan ayrı olarak kendi başına anovülasyonla ilişkilendirilmektedir. Vücut kitle indeksi (VKİ) 27'nin üzerinde olan kadınların, normal aralıkta VKİ'ne sahip kadınlara kıyasla anovülatuvar infertilite riski daha yüksek bulunmuştur [53]. Diğer nedenler arasında tiroid hastalığı (%2-3), hipofizer hastalık (örneğin, prolaktinoma, %13), adrenal hiperplazi veya adrenal tümörden kaynaklanan yükselmiş androjenler(%2), idiopatik kronik anovülasyon (%7-8) ve fonksiyonel hipotalamik amenore (örneğin, düşük kilo, yeme bozuklukları ve aşırı egzersiz) bulunmaktadır. Yeme bozukluğu olan hastaların, yeme bozukluğu olmayan hastalara kıyasla daha sık anovülatuvar infertilite oranı belirtilmiştir [54].

### **2.2.3. Endometriozis**

Endometriozis, uterin kavite dışındaki endometrial doku varlığı olarak tanımlanmıştır ve infertilite yaşayan kadınların %25-40'ını etkilediği bilinmektedir [55]. Endometriozise bağlı anatomik bozulmalar, fallop tüplerini obstrükte eden veya tubal geçirgenliği bozan yapışıklıkların varlığı veya tüp ve ovülasyon bölgesi arasında meydana gelen ovaryan kitlelerin (örneğin, endometrioma) varlığı gibi durumlar tubal geçirgenliği, oosit kalitesini ve tubal fimbria tarafından oositlerin fallop tüpüne geçişini bozabilmektedir [56].

#### **2.2.4. Erkek Faktörü**

Erkek fizyolojisindeki bozukluklar, düşük testostere seviyeleri veya az sperm sayısı gibi durumlar, infertile çiftlerin %35'inde görülmektedir [57]. Bir infertile çiftin sorununun altında birden fazla faktör yatıyor olabilir. Bu nedenle, erkek faktörüne bağlı infertilite değerlendirmesi, kadın partnerinin değerlendirilmesiyle birlikte yürütülmelidir [58, 59]. Hastadan alınan ejakulat örneği içinde sperm bulunmuyorsa (azospermi) ve ek olarak idrar örneğinde sperm varlığı retrograde ejakulasyonun bir göstergesidir. Obstrüktif azospermia, ejakulatta sperm olmaması durumunu tanımlar ve bu, sperm taşıma yollarında bir tıkanıklık sonucudur. Obstrüktif azospermi vakalarında, vas deferens'in konjenital bilateral yokluğu, kistik fibrosis hastalarında eksik olan protein olan kistik fibrosis transmembrane konduktans regülatöründe bir mutasyon değerlendirilmesi gerektiğini işaret eder. Nonobstrüktif azosperminin en yaygın sebebi ise primer testiküler yetmezliktir; bu durum serumdaki toplam testostere ve FSH seviyelerinin ölçülmesini ve başlangıç sonuçlarına dayanarak et tetkik gerektirmektedir [60].

Azospermi tedavisi, testislerden cerrahi sperm alımını içermekte olup, YÜT siklusunda hemen kullanılmak veya daha sonra kullanılmak üzere kriyoprezervasyon amacıyla gerçekleştirilmektedir. Bu prosedür, azospermi tanısı almış erkekler için fertilitenin sağlanmasında etkili bir yol sunmaktadır. Bu yöntemle elde edilen sperm, YÜT'te kullanılması yoluyla başarılı bir gebelik olasılığını arttırmaktadır. Bu işlem, modern üreme sağlık hizmetlerinin kritik bir bileşenidir ve infertile erkekler için umut verici bir çözüm yolu olmuştur[50].

#### **2.2.5. Düşük Over Rezervi (DOR)**

Over rezervi, ovaryan primordial foliküler havuzun nicelik ve nitelik açısından tanımını ifade etmektedir. Düşük over rezervi (DOR), üreme çağındaki kadınlarda foliküler havuz mikatrında gözlemlenen azalmayı belirtir ve bu durum, pek çok çift için infertilite oluşturan önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. DOR'un varlığı, İVF uygulamalarının infertilite tedavisi için bir yöntem olarak artan bir şekilde kabul görmesiyle daha belirgin hale gelmiştir. İVF sürecinde bu hastalarda %10'u kontrollü ovaryen hiperstimulasyona düşük yanıt

alınmaktadır. Bu durum, infertilite stratejilerinin ve yaklaşımlarının bu duruma göre adapte edilmesini gerektirmektedir [61-63]. Over rezervinde azalma, genellikle otuzlu yaşların ortalarında veya sonlarında olan kadınlarda sıkça gözlemlenen bir olgudur; ancak daha genç kadınlarıda etkileyebilmektedir [64]. Bu durumda, kişinin kendi yumurtaları ile gebe kalma süresi sınırlı kalmaktadır. Bunun sebebi, yaşlanan oositlerde kalitenin azalması sorumlu tutulmaktadır. Buna ek olarak, DOR tanılı genç kadınların gebe kalma şansı daha yüksek olabilmektedir. [65, 66]. Ancak yapılan son çalışmalar, DOR tanılı hastalarda yaşa bakılmaksızın düşük gebelik oranları ile ilişkili olduğu ve yüksek gebelik kaybı riskinin varlığından söz edilmektedir [67-71].

Çeşitli over rezerv testleri (ORT), over rezervini değerlendirmek ve KOH yanıtını tahmin etmekte kullanılmaktadır [72]. Bazal FSH seviyesinin yüksekliği kötü yanıt ile ilişkilendirilen ilk ORT'lerden biridir. Ancak, tek başına normal bazal FSH değeri kötü yanıtı dışlamamakta olup, seviyesinin yüksekliği azalan over rezervi sürecinde görece olarak geç gerçekleşmektedir. Bu nedenle KOH'ta kötü yanıt öngörüsünde bazal FSH tek başına ideal bir test değildir [73]. Antral folikül sayısı (AFS) ve anti-Müllerian hormone (AMH), tanımlanan en hassas over rezerv belirteçleridir ve bireysel KOH protokollerinin planlamasında kullanılmaktadır. Bu hassas belirteçler over yanıtının tüm spektrumunun güvenilir doğrulukta tahmin edilmesine izin vermektedir [74].

Bologna kriterleri, 2011 yılında gerçekleştirilen "European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) DOR tanımı çalışma grubu" uzlaşma toplantısının ardından belirlenmiştir [75].

Bu kriterlere göre, DOR tanısı için aşağıda belirtilen üç özelliğinden ikisinin bulunması önerilmektedir:

1. İleri anne yaşı (40 yaş ve üzeri) veya DOR için başka bir risk faktörü.
2. Daha önce konvansiyonel stimülasyonla  $\leq 3$  oosit elde edilmesi
3. Anormal over rezerv varlığı (AFS $<5-7$  veya AMH  $<0.5-1.1$  ng/ml).

Bologna kriterleri, pelvik enfeksiyon, endometrioma, over cerrahisi ve geniş periovarian adezyonlar gibi faktörlerin over rezervi üzerindeki değişkenliği nedeniyle eleştirilmektedir. Ancak, ESHRE fikir birliği, DOR'un tanımı doğrultusunda atılmış en önemli adım olarak kabul görmektedir [76].

### **2.2.6. Açıklanamayan İnfertilite (Aİ)**

İnfertil çiftlerin %30'u standart bir infertilite değerlendirmesinin ardından açıklanamayan infertilite tanısı almaktadır [77]. Bu tartışmalı tanı, kadın ve erkek üreme sistemlerinde herhangi bir anormallik belirlenemediğinde konulmaktadır. Aİ, standart araştırmaların sonucunda dışlama tanısı olarak karşımıza çıkmaktadır. Uluslararası Yardımcı Üreme Teknolojisi İzleme Komitesi (The International Committee for Monitoring. Assisted Reproductive Technology- ICMART), Aİ'yi görünüşte normal yumurtalık fonksiyonu, fallop tüpleri, rahim, serviks ve pelvis yanı sıra yeterli cinsel ilişki sıklığı olan çiftlerdeki infertilite durumuna ek olarak normal testiküler fonksiyon, normal ürogenital anatomi ve ejakülasyon birlikteliği olarak tanımlamıştır [15]. Aİ durumunda tedavi edilebilir bir neden belirlenemediğinden, tedavi kaçınılmaz olarak deneysel olarak yürütülmektedir. Sıklıkla kullanılan tedaviler arasında oral ilaçlar veya enjekte edilebilir gonadotropinler ile ovaryan stimülasyon (OS) ve intrauterin inseminasyon (İÜİ) bulunmaktadır [78]. Aİ için tedavi modelitesi tipik olarak OS-İÜİ ile başlamaktadır. İlk olarak oral ilaçlar, ardından gonadotropinler kullanılarak, OS-İÜİ ile gebelik elde edilememesi durumunda İVF protokolüne geçilmektedir. Son 20 yıl içinde İVF başarı oranları dramatik bir şekilde artmış olmasına rağmen, YÜT uygulanmayan tedavilerde siklus başına göreceli düşük ve değişmeyen canlı doğum oranları ile ilişkilendirilmektedir [79-81].

### **Limitasyonlar**

Açıklanamayan infertilite tedavisinin etkinliği ve güvenliği ile ilgili literatürü yorumlamada birden çok engel bulunmaktadır. Bir çok güncel çalışma, tedavi edilmemiş veya placebo control gruplarını içermemektedir ki bu, bekle-gör yönetimi ile YÜT' ten bağımsız gebelik oranının yüksek olması göz önüne alındığında sorun oluşturmaktadır. Açıklanamayan infertilite, erken over endometriosis ve hafif erkek faktörünü dahil edecek şekilde tanımlandığı bazı çalışmalar mevcuttur [82].

### **2.2.7. Uterin ve Servikal Faktörler**

Uterin kavite anormallikleri, düşük ve erken doğum gibi olumsuz gebelik sonuçları ile ilişkilendirilmektedir (bu sonuçlar sadece infertilite ile sınırlı değildir)

[83, 84]. Uterin kaviteyi bozan faktörler arasında endometrial polipler, leiomyomlar, intrauterin sineşiler ve septat uterus gibi konjenital uterin malformasyonlar bulunmaktadır. Sonohisterografi (SGH), endometrial polip ve leiomyomları, sırasıyla %91 duyarlık ve %84 özgüllük ile değerlendirmektedir[85]. Bu değerler, uterin kavite değerlendirmesinde SGH'yi HSG ve transvajinal ultrasonografiye kıyasla üstün kılmaktadır. Konjenital bir anormallik (örneğin, bikornuat uterus) varlığında, pelvik manyetik rezonans görüntüleme (MRG) veya üç boyutlu ultrasonografik değerlendirme yapılması tavsiye edilmektedir. Normal ultrasonografi veya HSG'ye sahip infertil kadınların genel popülasyonunda infertilite etiyojisi için tanısal bir test olarak histeroskopik değerlendirmenin rutin kullanımını destekleyen bir kanıt bulunmamaktadır [50].

Uterin kavite defektlerini düzeltmek için yapılan cerrahi işlemler, üreme sonuçlarını iyileştirmek amacıyla yaygın olarak gerçekleştirilmektedir. 2018 yılında yapılan bir Cochrane incelemesinde, uterin fibroidler, endometrial polipler, intrauterin adezyonlar ve septum da dahil olmak üzere belirlenen uterin kavite anormallikleri için operatif histeroskopi ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı 309 dahil olduğu 2 randomize kontrollü çalışma (RKÇ) dahil edilmiştir. Bu inceleme sonucunda endometrial poliplerin çıkarılmasının gebelik oranlarını artırabileceği sonucuna varılmıştır, ancak diğer yapısal anormallikler üzerinde cerrahinin etkinliğini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir [86].

Servikal faktöre bağlı infertilite, spermin uterusu doğal geçişini engelleyen anatomik bir bozukluk, ameliyata bağlı skar oluşumu veya azalan servikal mukus gibi durumlar olarak tanımlanır. Doğuştan gelen servikal anomaliler oldukça seyrek görülmektedir. (1/80.000) [87]; servikal darlık, geçirilmiş operasyona bağlı ortaya çıkabilmektedir (örneğin, servikal kanser için yapılan LEEP (Loop electrosurgical excision procedure) veya konizasyon), ancak servikal cerrahinin fertilite üzerinde etkisi hakkında çalışmalar küçük örneklem büyüklüğü, kısa takip süresi ve cerrahinin kapsamı hakkında yetersiz detay nedeniyle sınırlı bulunmuştur [88].

### **2.2.8. Genetik Faktör**

Tek gen bozuklukları, hastalığa ve primer infertiliteye yol açabileceği yönünde görüşler bildirilmiştir. Ancak, bu spesifik bozukluklar infertilite etiyojisinin sadece

küçük bir yüzdesine katkı sağlamakta olup, çoğu neden muhtemel olarak çok faktörlü olduğu düşünülmektedir [89]. Güncel olarak, geniş popülasyonlu genom çapında ilişkilendirme çalışmasında (genome-wide association studies- GWASs) en yaygın genetik varyasyon türü olan tek nükleotid polimorfizmleri (single-nucleotide polymorphisms -SNPs), infertiliteye yol açan hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (Odd ratio (OR), ~ 1.2) [90, 91].

### 2.3. FERTİLİTEYİ ETKİLEYEN ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Üremeyi etkileyen faktörler arasında fiziksel çevre, davranışsal, sosyoekonomik ve çevresel faktörler bulunmaktadır. Buna ek olarak, Fiziksel, davranışsal ve sosyoekonomik faktörlerin doğurganlık üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir. Fertilite ve doğurganlık üzerinde etkisi olduğu düşünülen fiziksel ve psikososyal faktörlerin yanı sıra, kimyasala artıklara maruz kalmanın fertilite üzerinde olumsuz etki bıraktığı konusunda endişeler bulunmaktadır [92].

**Endokrin bozucu kimyasallar (EBK):** Endojen hormonların etkilerini taklit etme kapasitesiyle karakterize, herhangi bir özgün fiziksel veya kimyasal özellikle sınıflandırılmayan, sentetik ve doğal oluşan kimyasallardır. Özellikle endokrin bozucular: endojen hormonların eylemlerini taklit edebilir ve antagonize edebilir, steroidojenik enzim ekspresyonunda ve/veya aktivitesinde değişikliklere neden olabilir ve dolaşan steroid hormon seviyelerini değiştirebilir [93-96]. Bununla birlikte, insan ovaryan foliküler sıvısında endokrin toksikanların kantifikasyonu ve bunların İVF tedavisi sonuçları ile olan ilişkileri yapılan in vitro çalışmalarda gözlemlenen adverse etkilerle birlikte, endokrin toksikanlara maruz kalmanın insan ovaryan fonksiyonları üzerinde olumsuz bir etkisi olabileceği endişesini desteklemektedir[97, 98].

**Obezite ve diyet:** Genel görüş, kadınlarda vücut kitle indeksinin (VKİ) >25 kg/m<sup>2</sup> olmasının, fekunditede anlamlı bir azalmayla ilişkili olduğudur [99]. VKİ'si <20 veya >25 kg/m<sup>2</sup> olan erkekler, azalmış sperm kalitesi ile ilişkilendirilmiştir[100]. Buna ek olarak, kadınlardaki fertilite azalması, serum ve foliküler sıvıdaki göreceli yüksek leptin seviyesi artışı ile ilişkilendirilmiştir [101]. Meta-analiz raporu, artmış VKİ'YE sahip kadınların, normal VKİ'ye sahip kadınlara

oranla daha kötü İVF sonuçlarına sahip olduğunu belirtmektedir. Rapor ayrıca, daha yüksek siklus iptal oranları, daha az toplanmış oosit sayısı, daha az mevcut embriyo ve daha düşük canlı doğum oranlarının olduğunu belirtmiştir [102-105].

**Kafein ve Alkol kullanımı:** Kafeinli ve alkollü içecekler dünyada en yaygın tüketilen içecekler arasında yer almaktadır. Ulusal anketlere göre, Amerika Birleşik Devletleri nüfusunun %85'i günlük olarak kafeinli içecek tüketmekte ve 12 yaş veya daha büyük bireylerin %50.8'i son ay içinde alkol alımı yaptığı belirtilmiştir [106]. Önceki çalışmalar, doğal gebelikte daha yüksek kafein alımının düşük doğum ağırlığı ve daha yüksek gebelik kaybı riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir [107]. Benzer şekilde, alkol insan sağlığı üzerindeki zararlı etkisi bilinmekle beraber kadınlarda azalmış fekundabilite ile ilişkilendirilmiştir [108].Yapılan sistemik analizde, kafein tüketimi ve İVF/İCSİ ile oluşan gebelik veya canlı doğum arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak, kadınların haftalık 84 gramdan fazla alkol tüketimi İVF/İCSİ tedavisi sonrası azalmış gebelik oranı ile ilişkilendirilmiştir. Buna ek olarak, erkeklerin haftalık 84 gramdan fazla alkol tüketimi İVF/İCSİ tedavisi sonrası azalmış canlı doğum oranı ile ilişkilendirilmiştir [109].

**Sigara kullanımı:** Sigara kullanımı, prematür mortalite ile ilişkilendirilmesine rağmen, birçok toplumda yaygın bir yaşam tarzı bağımlılığı olmaya devam etmektedir. Sigara dumanı, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve aromatik aminler gibi bir dizi teratojen içermektedir ki bu maddelerin inhalasyonu sadece genel sağlığı değil, aynı zamanda doğurganlık üzerinde de olumsuz bir etki yapabilmektedir [110, 111]. Sigara kullanımı İVF uygulaması altındaki infertil çiftler üzerinde büyük etki yaratmaktadır. İVF tedavisi gören kadınlardan elde edilen foliküler sıvının, içilen sigara sayısı ile ilişkili nikotin, kotinin, Bap ve kadmiyum içeren teratojenler içerdiği bildirilmiştir. Sigara içmenin İVF sonuçları üzerinde olumsuz etkilerini öngören çok sayıda çalışma olmasına karşın, aynı zamanda karşıt verilerde mevcuttur [112].

## 2.4. OVARYUM VE DNA ÇİFT ZİNCİR KIRIKLARI

Doğum öncesinde oluşan primordial foliküller, puberte sonrasında primer, sekonder ve antral foliküllere evrilirler. İnsanın üreme yaşamı süresince, çok az miktarda folikülü ovule olur ve çoğunluğu atrezi sürecinden geçer. Ovaryum doğumda yaklaşık bir milyon primordial folikül barındırmaktadır, fakat yetişkinlik döneminde folikül rezervi her ay yaklaşık olarak 1000 folikül kadar azalmaktadır [113, 114]. 50 yaşına gelindiğinde, over rezervi neredeyse tamamen tükenmektedir [64].

Kadınlarda üreme ömrü boyunca, rezervlerindeki foliküller 50 yıla kadar dormant kalabilmektedir. Oositler ve granuloza hücreleri de dahil olmak üzere tüm hücreler yaşla birlikte DNA hasarına maruz kalmaktadır. Ancak, oositler, mayotik rekombinasyon, ultraviyole (UV) ve X ışınları veya mutajenik kimyasallar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle indüklenen deoksiribonükleik asit (DNA) hasarını onarabilmektedir [115].

İlerleyen maternal yaş, oositlerin azalan gelişimsel yeteneğine katkıda bulunmasının yanı sıra oositlerdeki DNA çift zincir kırıklarının (DNA damage double-strand break-DSB) onarımı bozulmaktadır [116]. Buna ek olarak, ilerleyen maternal yaşla birlikte oositlerde ve embriyolarda anöploidi artışı görülmektedir [117]. Telomerlerdeki DNA hasarı telomer yıpranmasına katkıda bulunarak, nondisjunksiyon'a, Down sendromuna ve gebeliğin abort ile sonuçlanmasına yol açabilmektedir [118-120]. Kısa telomerler, homolog eşleşmeyi ve rekombinasyonun azalmasına, metafazda anormal kromozom hizalanmasına ve iğ ipliklerinin bozulmasına neden olan mayotik anormalliklere yol açarak, anöploidiye neden olmaktadır [121-123].

### 2.4.1. Kumulus Ooforus Hücreleri (KH)

Kumulus ooforus hücreleri (KH), granuloza hücrelerinden meydana gelmektedir [124] ve her oosit üzerindeki korona radiata hücre tabakasını çevreler. Bu hücreler, sinyal ve besin maddelerinin oosite aktarılmasını kolaylaştıran ara bağlantılar (gap junction) aracılığıyla oositlerle yakın ilişki göstermektedir ve yakın ilişki, oositlerin fertilizasyonunu ve olgunlaşmasına olanak tanımaktadır [125-127]. Ovulasyon sırasında dökülen kumulus hücrelerinin, fertilizasyon yeteneğine ulaşmış

bir oositin olgunlaşmasının belirteci olduğu düşünülmektedir [128]. Kumulus hücreleri, FSH ve LH aracılığıyla oositlerin olgunlaşmasını düzenlemektedir [129]. Ayrıca, sperm-yumurta etkileşimleri için yapısal geçitlerin oluşumu ve akrozom reaksiyonlarını indüklemek için progesteron salgılanması yoluyla oositlerin döllenişinde kritik bir role sahiptir [125, 129-132]. Ayrıca, kumulus hücrelerinin implantasyonda olumlu bir rolü olduğu ve ko-kültürlerde embriyo morfolojisini iyileştirdiği ve blastokist oluşumunu desteklediği gösterilmiştir [133-135]. Örnek olarak, gremlin 1 (GERM1) ve hyaluronan sentaz 2 (HAS2) ekspresyonu, oositlerin gelişimsel yeteneği ile ilişkilendirilmiştir [136]. Kumulus hücrelerindeki telomer uzunluğu, oosit ve embriyo yetkinliğini öngörmekte olup, kumulus hücrelerinin sınırlı sayısı nedeniyle klinik açıdan yeterince ayırım sağlayıcı olamayacağı düşünülmüştür [137]. Kumulus hücrelerindeki gen ekspresyonundaki kayıp, anormal ya da işlevsiz kumulus hücrelerinde gözlemlenmiştir ve bu durum, devamındaki embriyo gelişiminin zayıf performansı ile ilişkilendirilmiştir [138]. Bu nedenle kumulus hücrelerinin DNA durumunun belirlenmesi, oositlerin ve embriyoların kantifikasyonu için yararlı olabileceği gibi İCSİ başarısının da tahmin edilmesi için önem taşımaktadır [131].

#### **2.4.2. DNA Çift Zincir Kırığı (DSB) Belirteci Olarak $\gamma$ -H2AX**

DSB, iyonize radyasyon (IR), genotoksik kimyasallara veya radyomimetik ilaçlara ek olarak kanser kemoterapötiklere maruz kalımına bağlı meydana gelmektedir. DSB' nin onarılamaması veya yanlış onarımı, genomik istikrarsızlığa neden olmaktadır. Gen dozajındaki değişiklikler veya kromozomal anormalliklerin oluşumu, tümör oluşumu ve diğer yaşla ilişkili hastalıklara yol açabilmektedir [139, 140].

H2AX çekirdek histon varyantı H2A.X, DSB' nin indüksiyonunu takiben DNA hasar yanıtında önemli bir rol oynamaktadır. H2A.X, insan hücrelerinde nükleozomal H2A'nın yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır [141]. DSB oluşumunu takiben, DNA kırıklarının yakınındaki H2A.X histonları fosfatidil-inozitol-3-kinaz ilişkili kinazlar (phosphatidylinositol-3-kinase-related kinases – PIKKs) ailesinin üyeleri tarafından fosforlanmaktadır. DNA hasar belirteci olan bu fosforlanmış histon H2A.X formuna  $\gamma$ -H2A.X denmektedir. İndüklenmiş bir DSB'yi takiben,  $\gamma$ -

H2A.X saniyeler içinde birikmeye başlar, kırık bölgesini saran binlerce DNA bazının üzerine yayılır ve DNA hasar tepkisi sinyal kaskadının amplifikasyonunda rol oynamaktadır [142, 143]. Pulsed-Jel Elektroforezi ve comet assay gibi birçok yöntem DSB'yi tespit etmek ve nicelendirmek için kullanılmaktadır. Ancak, daha basit, kesin ve diğer tekniklere göre daha duyarlı olmasının yanı sıra  $\gamma$ -H2AX kullanımını tek bir DSB'nin varlığını tespit etmektedir [144].

Birçok hücre çeşidi gibi oositler ve granuloza hücreleride dahil olmak üzere, yaşlandıkça ve dış faktörlerin etkisi altında DNA hasarı artmaktadır. DSB oluştuktan sonra, Ser139 üstünden fosforlanan histon H2A.X DNA hasarlarının yerlerinde  $\gamma$ -H2A.X oluşturmaktadır [145]. Bu durum, granuloza hücrelerinde DSB'lerin derecesini ölçme imkanı sağlamaktadır. Rhesus maymunlarında yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarda, granuloza hücrelerindeki DSB artışlarını,  $\gamma$ -H2A.X odaklarındaki artış ve BRCA1 (Breast Cancer gene 1- Meme kanseri gen 1) odaklarında azalmayla karakterize olan yetersiz bir onarım yolunun ovaryan yaşlanmayla ilişkili olduğunu göstermiştir [146]. İnsan ve kemirgen hayvan çalışma modellerinde, oositlerde maternal yaş ile birlikte DSB'lerin arttığı ve bazı DSB onarım genlerinin (örneğin, BRCA1) oositlerdeki karşılık gelen ekspresyonunun azaldığını göstermiştir [116, 147].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu prospektif araştırma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde yapılmıştır. 20.06.2022- 20.06.2023 tarihleri arasında hastanemize başvuran başvuran, 35 yaş ve altı Tüp bebek kliğine başvuran, Anti-müllerien Hormon (AMH) düzeyi 1ng/mL'nin altında olan 49 düşük over rezervi hasta ve 1.5 ng/mL'nin üzerinde olan 42 açıklanamayan infertil hasta olmak üzere toplam 91 hasta dahil edilmiştir. Kronik hastalığı olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmamız, hastanemizin etik kurulu tarafından 7 sayılı 2022 tarihli karar ile onaylanmıştır.

Hastaların yaş BMI, IVF deneme sayısı, infertilite süresi (ay), Anti-müllerian hormon, FSH, Estradiaol, TSH, Prolaktin, Antral folikül sayısı, Toplanan oosit sayısı, Maturasyon oranı, M1 oosit, M2 oosit, Zigot sayısı (2 PN), Fertilizasyon oranı, Transfer edilen embriyo sayısı, Transfer günü, Grade 1 embriyo, 3. gün kaliteli embriyo oranı ve 5. gün kaliteli embriyo oranı dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalara siklusun 2.-3. Gününde kontrollü ovaryan stimülasyon için GnRH antagonist protokolü uygulanmıştır. Tedaviye hastanemizin tüp bebek konseyinde belirlenen 75-450 IU arasında dozlar uygulanmıştır. Dominant folikül 13 mm'ye ulaştıktan sonra doz ekleyerek tetiklenme gününe kadar devam edilmiştir. Estradiol düzeyleri takip edilerek seri transvajinal ultrason takibi yapılmıştır. Dominant folikülün 18 mm'ye ulaşmasıyla 250 µgr rekombinant hCG (Ovitrelle®) uygulanmıştır. Ovulasyon tetiklenmesinden 36 saat sonra oosit toplama işlemi yapılmıştır.

ICSI uygulanacak tüm kadınlara transvajinal ultrasonografi eşliğinde oosit toplama (Oocyte Pick-Up/OPU) işlemi uygulanmıştır. OPU işleminde 18 mm ve daha büyük çaplı foliküllerden toplanan foliküler aspirat 10 cm'lik flasklarda stereo mikroskop altında incelendi. Rutin olarak oosit ve granüloza hücreleri toplanarak uygun medyuma transfer edildikten sonra foliküler sıvı 15 ml'lik konik tüplerde toplandı.

Toplanan foliküler sıvı, proje ortağı olan Yeditepe Üniversitesi Doku Tipleme Laboratuvarına teslim edildi. Bu hücreler laboratuvarında 70 mikron porlu

filtrelerden süzülerek tek hücre süspansiyonu elde edilmiş, hücreler 300 g hızda üç dakika santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılarak ve hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) içinde süspansiyon edilmiştir. Foliküler sıvıda en yaygın olarak bulunan kontaminantlar CD45+ hücrelerdir (1). Bu hücreleri analizde ekarte etmek amacıyla PBS içinde süspansiyon edilen hücreler, 15 dakika karanlık ortamda oda ısısında Krome Orange florokrom konjuge anti- CD45 antikoru (Beckman Coulter, A96416) ile işaretlenip, inkübasyon sonunda hücreler %1 paraformaldehit (pH: 7.2-7.6) ile fikse edilecek, fiksatif solüsyonu uzaklaştırılarak %0.1 Triton X-100 ve %1 sığır serum albumin (BSA) blok solüsyonu içeren PBS ile permeabilizasyon sağlanmıştır. Fiksasyon ve permeabilizasyon aşamaları, her iki süreç de yarım saat olarak karanlık ortamda 4°C’de gerçekleştirilmiştir. Permeabilize hücreler %1 BSA içerikli PBS içinde süspansiyon edilerek, Alexa Fluor® 647 konjuge Histon H2A.X (Biolegend, 600205) ve Alexa Fluor® 488 florokrom konjuge Gamma H2A.X (phospho S139) antikoları (Biolegend, 613405) ile 4°C’de karanlık ortamda yarım saat süresince inkübe edilerek hücre içi boyama gerçekleştirilmiştir. Hücreler DxFLEX akan hücre ölçer sistemi kullanılarak okutulup, veriler CytExpert for DxFLEX yazılımı ile analiz edilmiştir. Veri analizi için CD45- hücre popülasyonu üzerinden kapılama yapılmış ve Histon H2A.X ile fosforile formu Gamma H2A.X protein seviyeleri belirlenmiştir.

### **İstatistiksel Analiz**

Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama ve standart sapma; kategorik değişkenlerin tanımlanmasında ise frekans (n) ve yüzde (%) değerleri verilmiştir. Değişkenlerin normallik varsayımları Kolmogorov Smirnov testi ve Histogram ile incelenmiştir.

Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin iki grup arasında karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi; üç ve üzeri gruplar arasında karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi sonucunda anlamlı bir farklılığın elde edilmesi durumunda farkın hangi gruplar arasından kaynaklandığını belirlemek amacıyla ise Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi yapılmıştır. Normallik varsayımının karşılandığı durumlarda ise ikili gruplarda Bağımsız Örneklerde t test (Independent samples t test) üç ve üzeri

gruaplarda ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. ANOVA analizinde anlamlı bir farklılığın elde edilmesi durumunda ise Post-Hoc analizi uygulanmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki kare/Fisher exact analizi ile, sürekli değişkenler arasındaki ilişkiler ise normallik varsayımlarının karşılandığı durumda Pearson (Pearson's product-moment correlation) korelasyon analizi ile; normallik varsayımları karşılanmıyor ise Spearman (Spearman's rho) korelasyon analizi ile incelenmiştir. Bütün analizlerde IBM SPSS.25 programı kullanılmış ve anlamlılık düzeyi olarak  $p < 0.05$  değeri kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 1. Tanımlayıcı bulgular ve gruplar arası karşılaştırmalar

Araştırmaya 42 (%46.2) açıklanamayan infertilite, 49 (%53.8) düşük over rezervi grubunda olmak üzere toplam 91 hasta dâhil edildi. İki grup arasında yaş, BMI, IVF deneme sayısı, infertilite sayısı (ay), anti müllerian hormon, FSH, Estradiaol, TSH, Prolaktin, Antral folikül sayısı, Toplanan oosit sayısı, Maturasyon oranı, M1 oosit, M2 oosit, Zigot sayısı (2 PN), Fertilizasyon oranı, Transfer edilen embriyo sayısı, Transfer günü, Grade 1 embriyo, 3. gün kaliteli embriyo oranı ve 5. gün kaliteli embriyo oranı karşılaştırıldı. Analizler öncesinde bütün parametrelerin normal dağılım özellikleri gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ve histogram teknikleri ile incelendi.

Açıklanamayan infertilite grubunun anti müllerian hormon değeri ( $1.96 \pm 0.80$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $.67 \pm 0.46$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < .001$ ).

Açıklanamayan infertilite grubunun FSH değeri ( $7.40 \pm 4.46$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $8.68 \pm 3.17$ ) anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p = .001$ ).

Açıklanamayan infertilite grubunun Estradiaol değeri ( $56.19 \pm 17.87$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $40.60 \pm 12.44$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < .001$ ).

Açıklanamayan infertilite grubunun antral folikül sayısı değeri ( $12.40 \pm 3.62$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $7.04 \pm 3.65$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < .001$ ).

Elde edilen bu bulgulara karşın açıklanamayan infertilite grubu ile düşük over rezervi grubu arasında Tablo 1’de belirtilen diğer değişkenler açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p > .05$ ).

**Tablo 1:** Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarının biyokimyasal ve sosyodemografik parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	Grup				p
	Açıklanamayan infertilite		Düşük over rezervi		
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
Yaş*	29.83	3.07	30.71	3.25	.132
BMI**	25.02	4.63	26.08	5.74	.342
IVF deneme sayısı*	1.40	.66	1.37	.73	.709
İnfertilite sayısı (ay)*	51.50	26.03	45.31	31.17	.150
Anti müllerian hormon*	1.96	.80	.67	.46	<.001
FSH(mIU/mL)*	7.40	4.46	8.68	3.17	.001
Estradiol(pg/mL)*	56.19	17.87	40.60	12.44	<.001
TSH(µIU/mL)*	2.03	1.00	2.32	.95	.087
Prolaktin(ng/mL)*	19.08	10.56	20.15	10.38	.438
Antral folikül sayısı*	12.40	3.62	7.04	3.65	<.001

\*Mann-Whitney U test; \*\*Independent t testi.

Tablo 2’de gösterildiği gibi, açıklanamayan infertilite grubunun toplanan oosit sayısı ( $10.12 \pm 5.89$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $5.41 \pm 3.66$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < .001$ ).

Açıklanamayan infertilite grubunun M2 oosit değeri ( $7.48 \pm 4.34$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $3.51 \pm 2.59$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < .001$ ).

Açıklanamayan infertilite grubunun Zigot sayısı (2 PN) ( $4.14 \pm 2.66$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $2.08 \pm 2.01$ ) anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < .001$ ).

Açıklanamayan infertilite grubunun 3. gün kaliteli embriyo oranı ( $.50 \pm .28$ ) düşük over rezervi grubuna göre ( $.73 \pm .25$ ) anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p = .003$ ).

Elde edilen bu bulgulara karşın açıklanamayan infertilite grubu ile düşük over rezervi grubu arasında Tablo 2’de belirtilen diğer değişkenler açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p > .05$ ).

**Tablo 2:** Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarının emriyoloji laboratuvar takibi değerlendirmeleri karşılaştırılması

Parametreler	Grup				P
	Açıklanamayan İnfertilite		Düşük Over Rezervi		
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
Toplanan oosit sayısı*	10.12	5.89	5.41	3.66	<.001
Maturasyon oranı*	.73	.18	.66	.32	.485
M1 oosit*	.69	.87	.51	1.02	.118
M2 oosit*	7.48	4.34	3.51	2.59	<.001
Zigot sayısı (2 PN)*	4.14	2.66	2.08	2.01	<.001
Fertilizasyon oranı*	.56	.24	.51	.35	.464
Transfer edilen embriyo sayısı*	.90	.37	.78	.62	.171
Transfer günü*	3.70	.97	3.48	1.00	.387
Grade 1 embriyo*	1.76	1.04	1.55	.87	.422
3. gün kaliteli embriyo oranı*	.50	.28	.73	.25	.003
5. gün kaliteli embriyo oranı*	.39	.24	.60	.37	.240

\*Mann-Whitney U test

Ayrıca açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi grupları arasında anlamlı çıkan parametrelerin şekilsel gösterilmesi Şekil 1-8 arasında gösterilmiştir.

Tablo 3'te gösterildiği gibi, fertilizasyon ve hasta grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ve açıklanamayan infertilite grubunda başarılı fertilizasyon hastaların oranı (%88.1), düşük over rezervine göre (%67.3) anlamlı olarak daha yüksektir (p=.019). Buna karşın, açıklanamayan infertilite grubunda klinik gebelik olan hastaların oranı (%33.3), düşük over rezervine göre (%20.4) daha yüksek bulunsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=.052). Transfer yapılmayan hastalar analiz dışı tutulduğunda da benzer olarak açıklanamayan infertilite grubunda klinik gebelik olan hastaların oranı (%37.8), düşük over rezervine göre (%30.3) daha yüksek bulunsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=.507). Açıklanamayan infertilite grubunda en sık fertilizasyon başarısızlığı nedeni 3 (%60) hasta ile “kötü embriyo gelişimi”, düşük over rezervi grubunda ise 8 (%50) hasta ise “kötü embriyo gelişimi”ydi.

**Tablo 3:** Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi grupları arasında fertilizasyon, gebelik ve fertilizasyon başarısızlığının karşılaştırılması

	Gruplar				p
	Açıklanamayan İnfertilite		Düşük Over Rezervi		
	n	%	n	%	
<b>Fertilizasyon*</b>					.019
Başarısız	5	11.9	16	32.7	
Başarılı	37	88.1	33	67.3	
<b>Gebelik*</b>					.052
Transfer yapılmadı	5	11.9	16	32.7	
Gebelik yok	23	54.8	23	46.9	
Klinik gebelik	14	33.3	10	20.4	
<b>Gebelik*</b>					.507
Gebelik yok	23	62.2	23	69.7	
Klinik gebelik	14	37.8	10	30.3	
<b>Fertilizasyon başarısızlığı**</b>					-
Kötü embriyo gelişimi	3	60.0	8	50.0	
Embriyo gelişimi olmadı	2	40.0	3	18.8	
Oosit maturasyonunun olmaması	0	0.0	5	31.2	

\*Ki kare analizi, \*\*Ki kare analizinin varsayımları (assumptions) karşılanmadığı için p değeri verilememiş, sadece sıklık ve yüzde değerleri raporlanmıştır.

Tablo 4'te gösterildiği gibi açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi grupları arasında p- H2AX MFI, H2AX MFI, p- H2AX / H2AX MFI, p- H2AX %, H2AX % ve p- H2AX / H2AX % parametreleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

**Tablo 4:** Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarının protein parametrelerinin karşılaştırılması

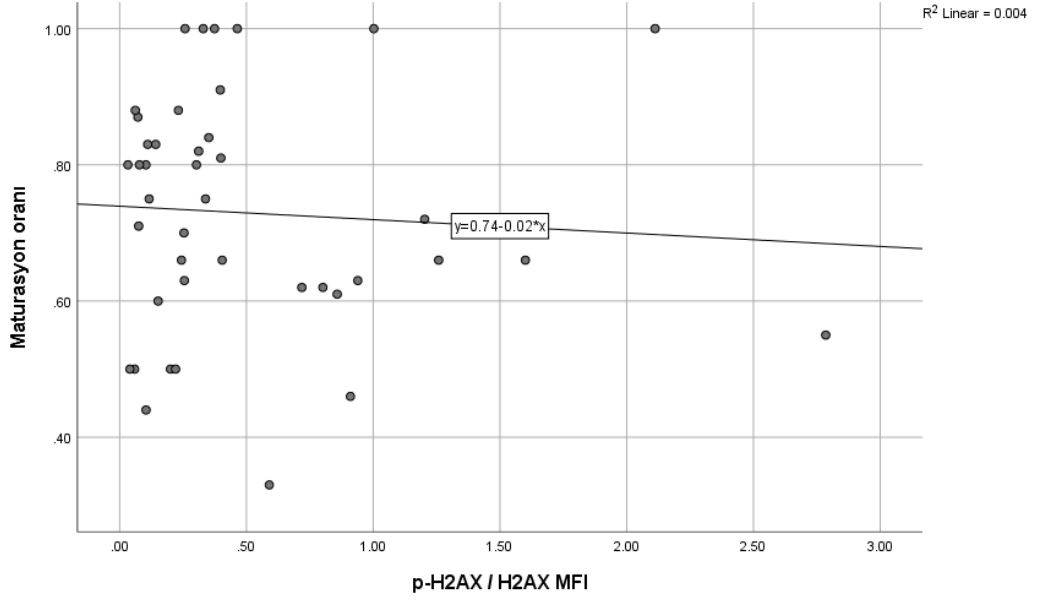
Parametreler	Grup				p
	Açıklanamayan İnfertilite		Düşük Over Rezervi		
	Ort.	SS.	Ort.	SS.	
p- H2AX MFI*	11352.83	3872.88	12586.63	5163.74	.400
H2AX MFI*	55844.11	47760.13	47271.71	38079.71	.659
p- H2AX/H2AX MFI*	.51	.58	.56	.63	.519
p- H2AX %**	37.77	17.08	33.42	18.56	.259
H2AX %*	97.55	3.44	95.27	9.41	.318
p- H2AX / H2AX %**	38.78	17.53	35.64	20.86	.451

\*Mann-Whitney U test; \*\*Independent t testi.

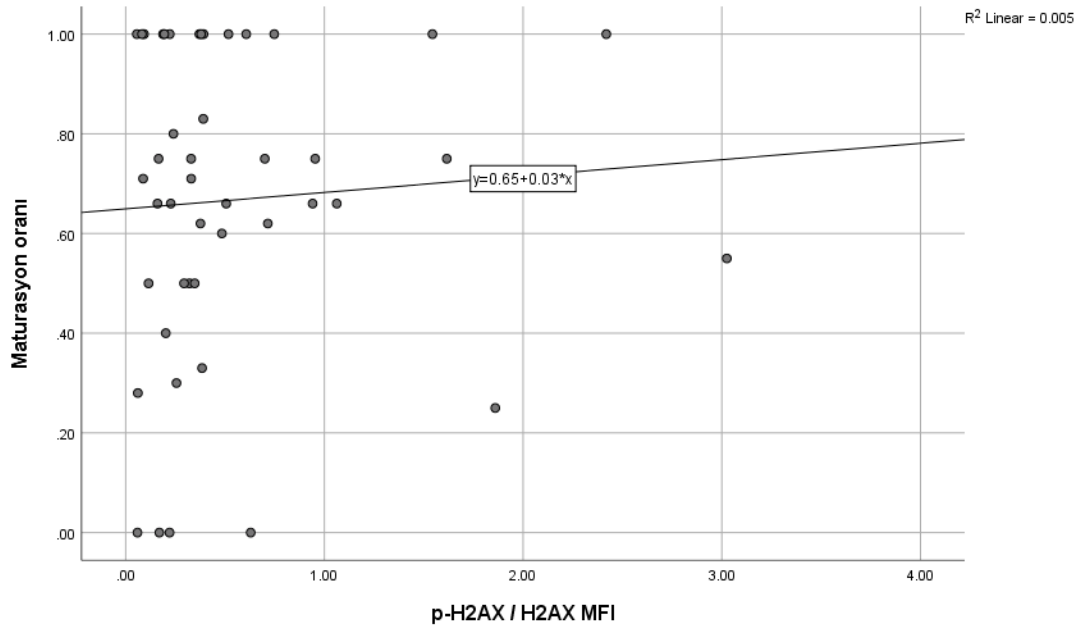
## 2) p- H2AX/H2AX Mean Flourescence Intensity (MFI) ile maturasyon oranı arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Sürekli değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde Spearman korelasyon analizi kullanılmış ve analizler “açıklanamayan infertilite” ve “düşük over rezervi” grubunda ayrı ayrı yapılmıştır.

Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile maturasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=-.004$ ,  $p=.979$ ) (Şekil 1).



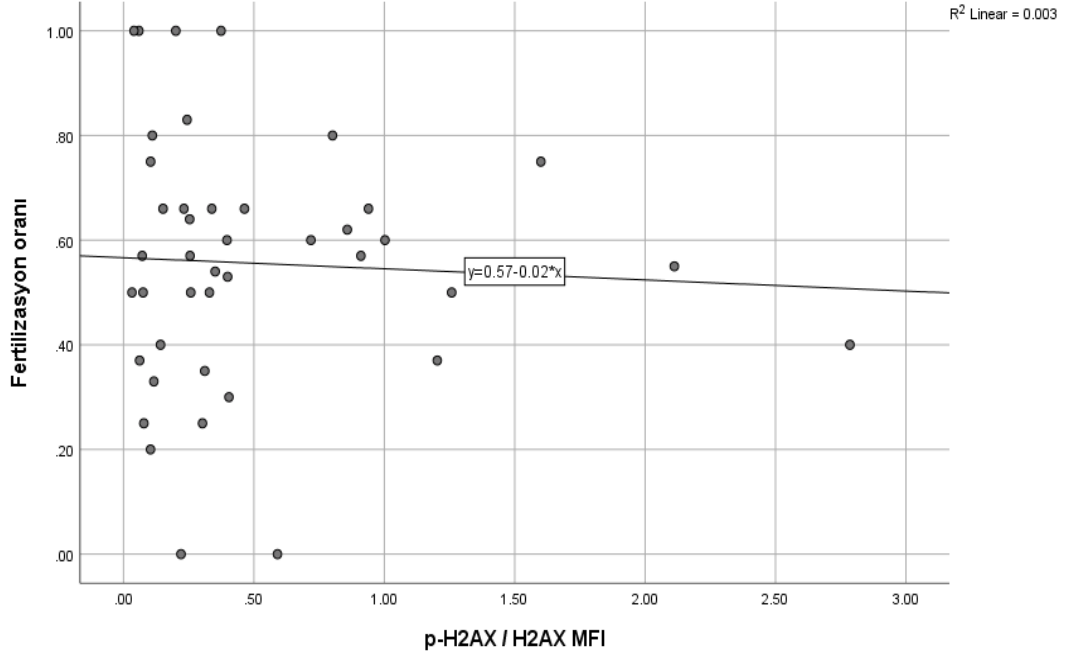
**Şekil 1:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile maturasyon oranı arasındaki ilişki Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile maturasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=.088$ ,  $p=.564$ ) (Şekil 2).



**Şekil 2:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile maturasyon oranı arasındaki ilişki

### 3) p- H2AX/H2AX MFI ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişkinin belirlenmesi

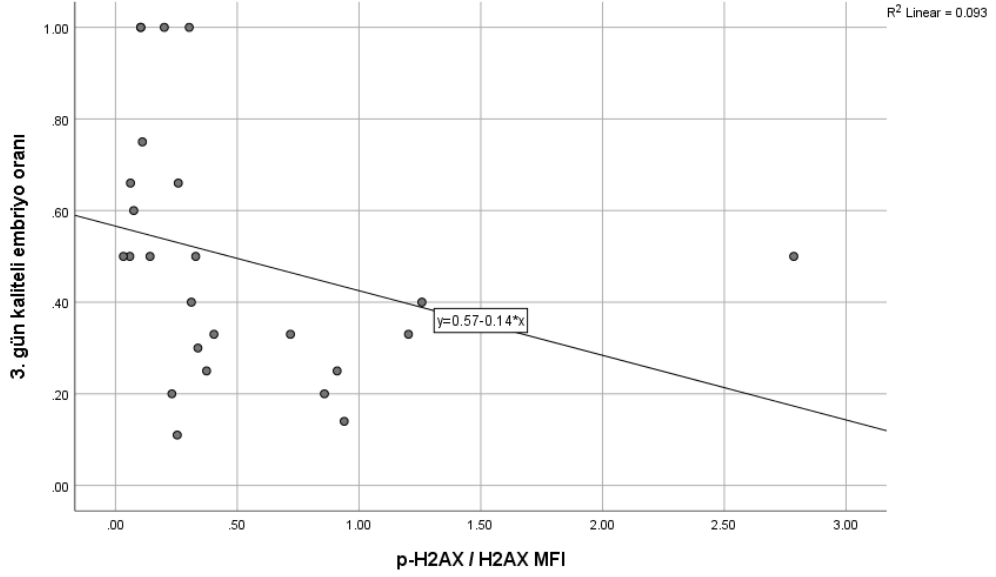
Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile fertilizasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=-.013$ ,  $p=.937$ ) (Şekil 3).



**Şekil 3:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişki

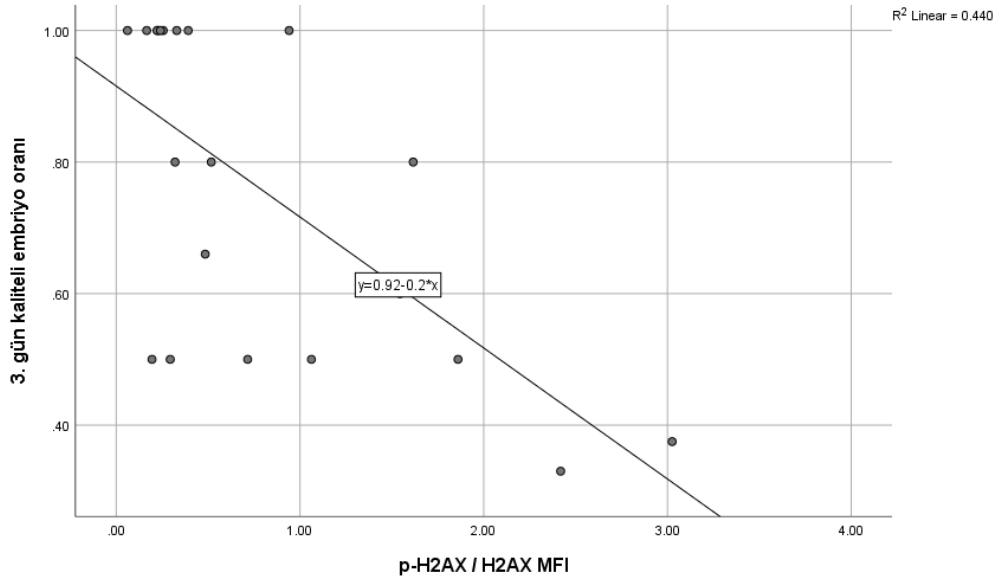
Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile fertilizasyon oranı arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $r=.309$ ,  $p=.039$ ) (Şekil 4). Bir diğer ifade ile p- H2AX/H2AX MFI değeri arttıkça fertilizasyon oranı artmakta veya tam tersi olarak p- H2AX/H2AX MFI değeri azaldıkça fertilizasyon oranının azaldığı belirlendi.





**Şekil 5:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

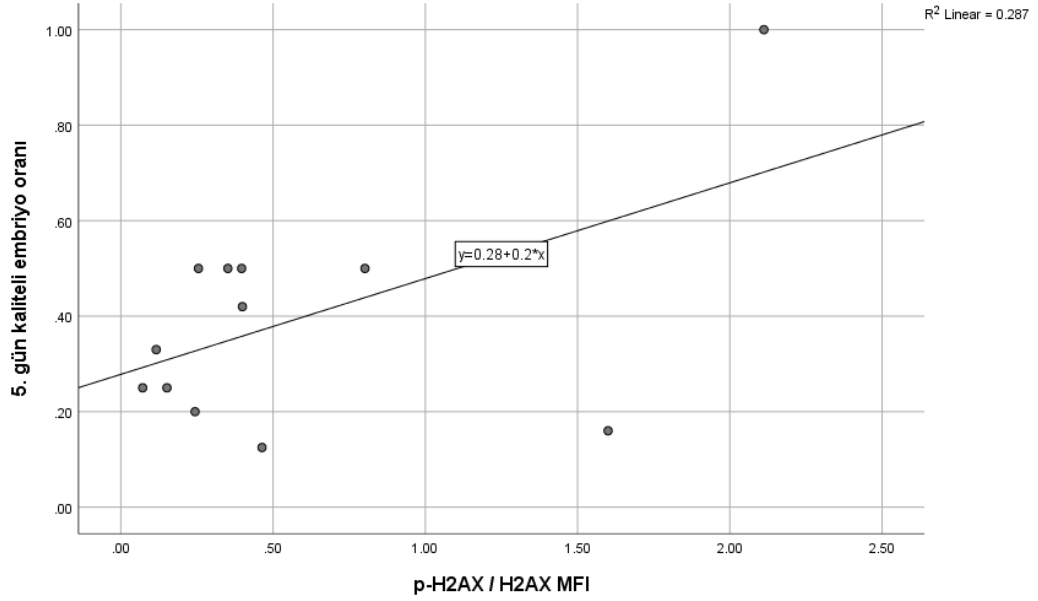
Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 3. Gün embriyo oranı arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $r=-.625$ ,  $p=.002$ ) (Şekil 6). Bir diğer ifade ile p- H2AX/H2AX MFI değeri arttıkça 3. Gün embriyo oranı azalmakta veya tam tersi olarak p- H2AX/H2AX MFI değeri azaldıkça 3. Gün embriyo oranının arttığı belirlendi.



**Şekil 6:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

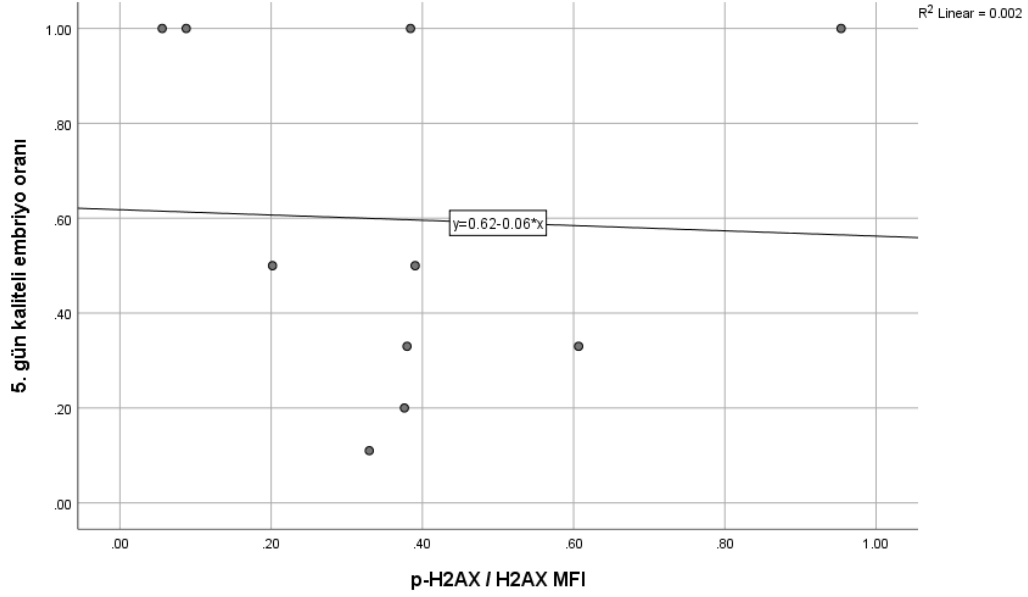
#### 4) p- H2AX/H2AX MFI ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 5. Gün embriyo oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=.228$ ,  $p=.476$ ) (Şekil 7).



**Şekil 7:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 5. Gün embriyo oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=-.069$ ,  $p=.849$ ) (Şekil 8).



**Şekil 8:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

### 5) p- H2AX/H2AX MFI değerinin gebelik sonuçlarına göre karşılaştırılması

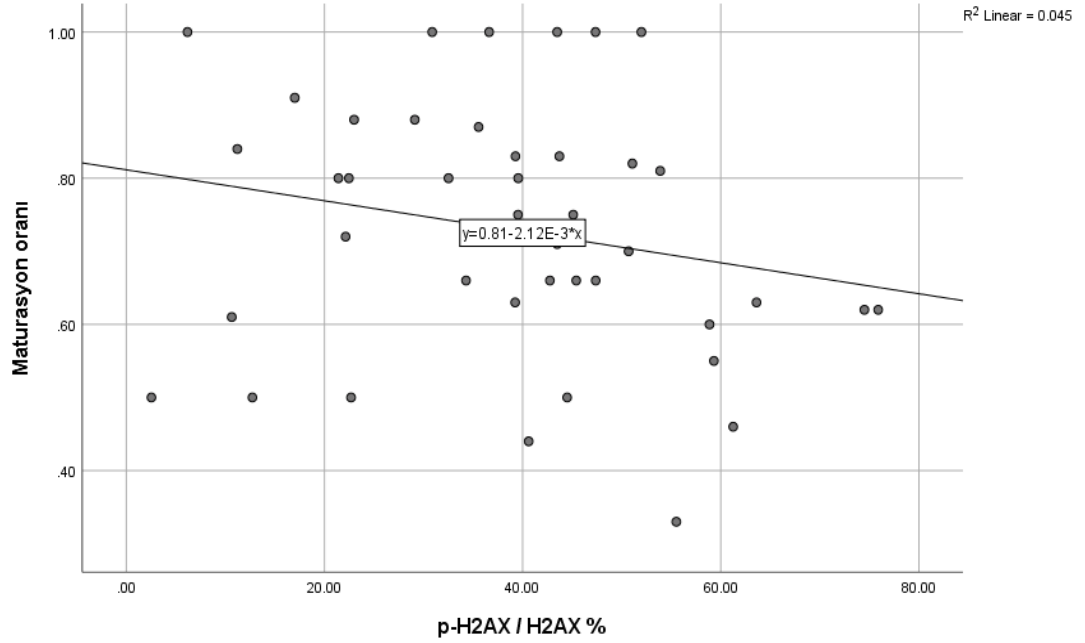
Tablo 5'te gösterildiği gibi hem açıklanamayan infertilite grubunda hem de düşük over rezervi gruplarında gebelik durumuna göre p- H2AX/H2AX MFI değerinin anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur ( $p > .05$ ).

**Tablo 5:** Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarında gebelik durumuna göre p- H2AX/H2AX MFI değerinin karşılaştırılması

	Gebelik durumu						p
	Transfer yapılmadı		Gebelik yok		Klinik gebelik		
	Ort.	SS.	Ort.	SS.	Ort.	SS.	
<b>Açıklanamayan infertilite grubunda</b>							
p- H2AX/H2AX MFI	.39	.41	.52	.63	.52	.58	.834
<b>Düşük over rezervi grubunda</b>							
p- H2AX/H2AX MFI	.31	.24	.78	.81	.39	.28	.136

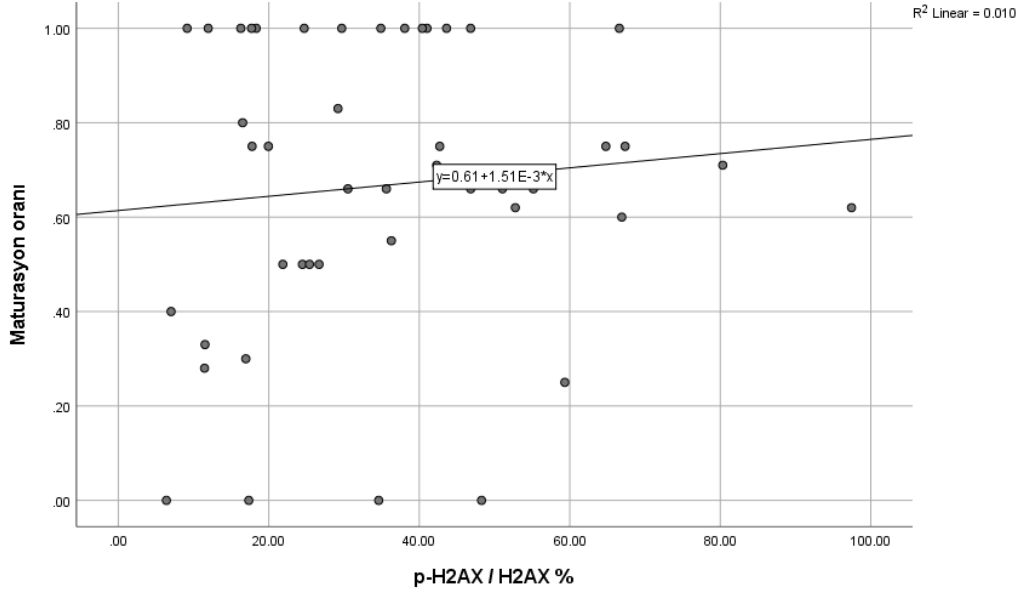
### 6) p- H2AX/H2AX % ile maturasyon oranı arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile maturasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=-.258$ ,  $p=.099$ ) (Şekil 9).



**Şekil 9:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile maturasyon oranı arasındaki ilişki

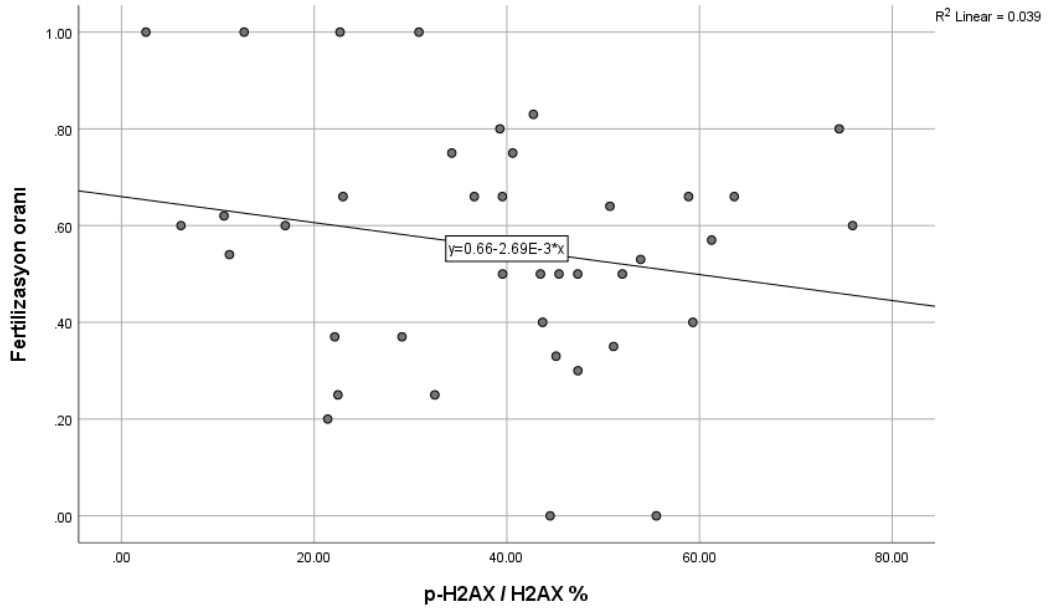
Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile maturasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=.075$ ,  $p=.626$ ) (Şekil 10).



**Şekil 10:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile maturasyon oranı arasındaki ilişki

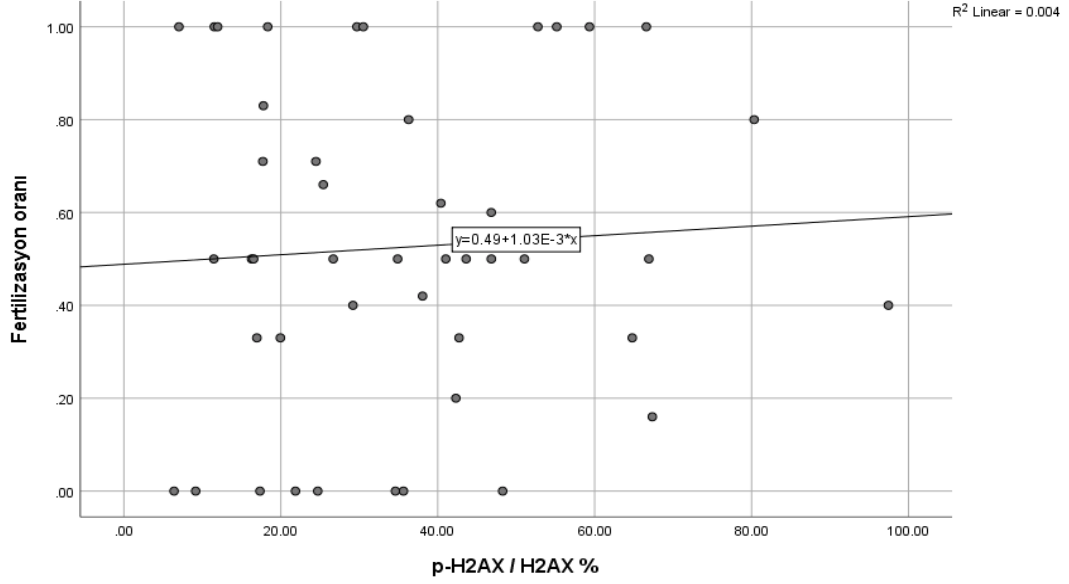
### 7) p- H2AX/H2AX % ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile fertilizasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=-.184$ ,  $p=.245$ ) (Şekil 11).



**Şekil 11:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişki

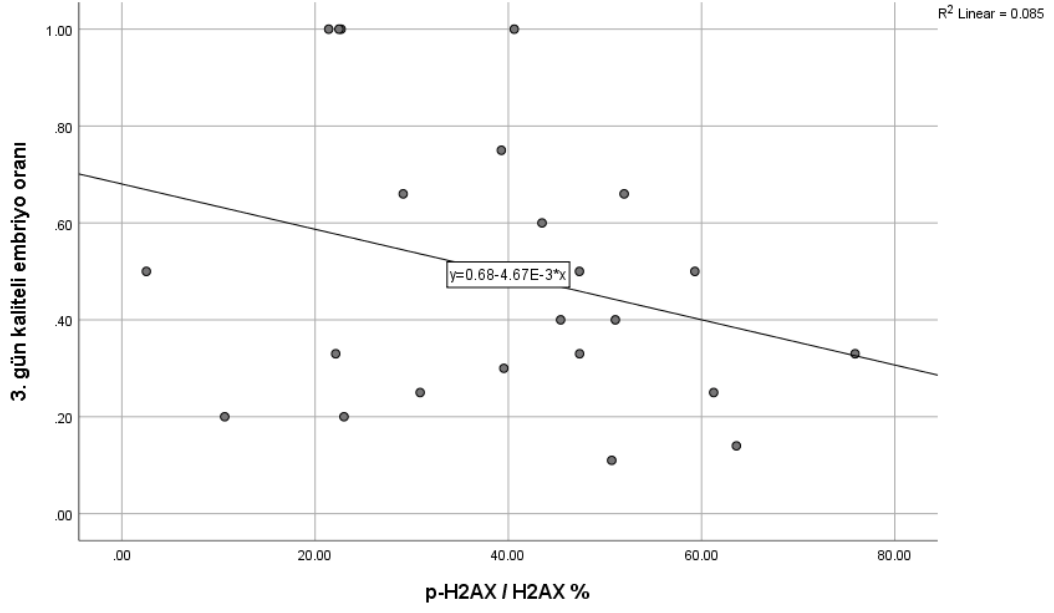
Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile fertilizasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=.047$ ,  $p=.757$ ) (Şekil 12).



**Şekil 12:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişki

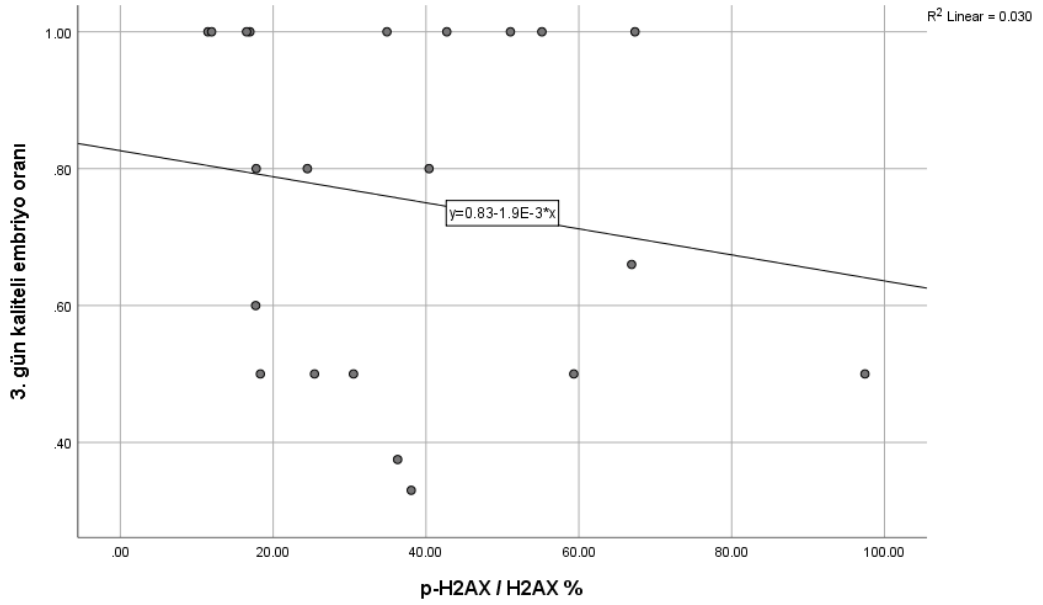
### 8) p- H2AX/H2AX % ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile 3. Gün embriyo oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=-.286$ ,  $p=.165$ ) (Şekil 13).



**Şekil 13:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

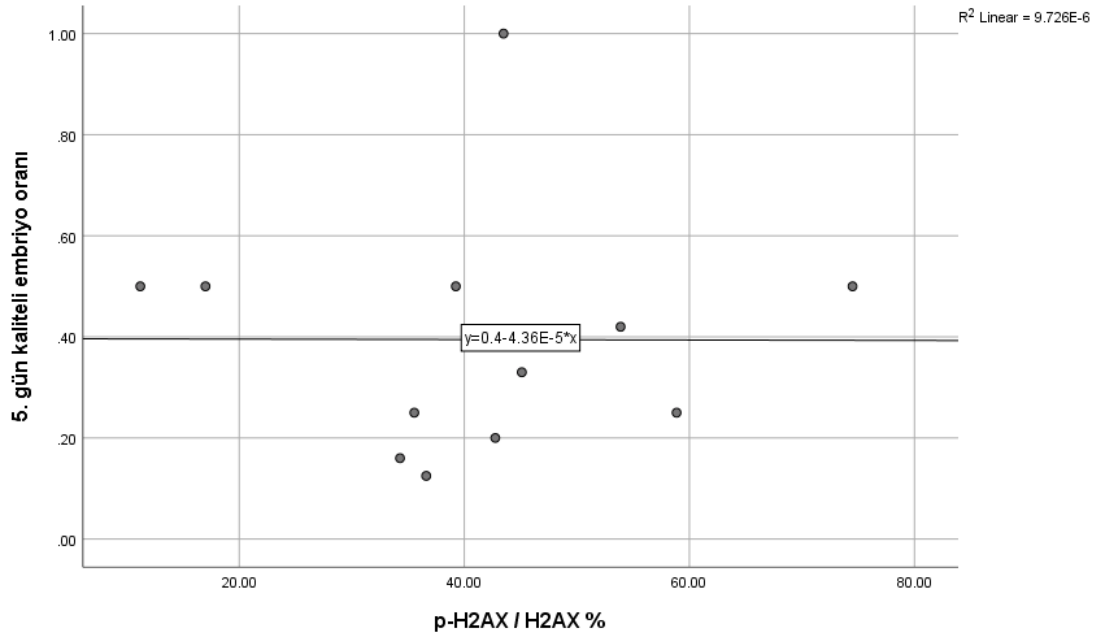
Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile 3. Gün embriyo oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=-.201$ ,  $p=.383$ ) (Şekil 14).



**Şekil 14:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile 3. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

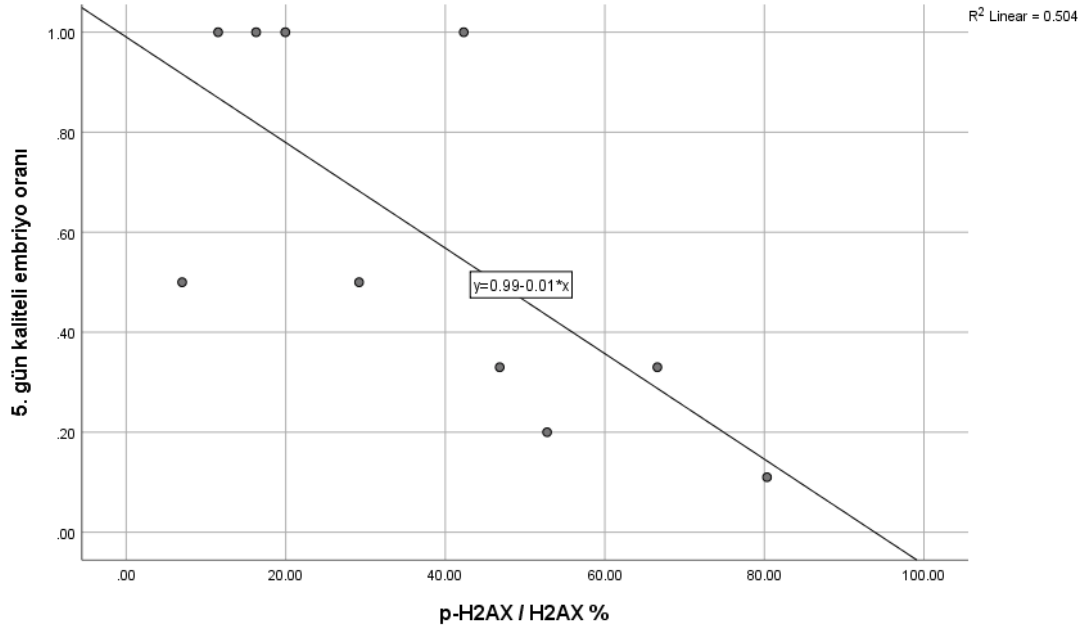
### 9) p- H2AX/H2AX % ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile 5. Gün embriyo oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $r=.086$ ,  $p=.791$ ) (Şekil 15).



**Şekil 15:** Açıklanamayan infertilite grubunda p- H2AX/H2AX % ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile 5. Gün embriyo oranı arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $r=-.755$ ,  $p=.012$ ) (Şekil 16). Bir diğer ifade ile p- H2AX/H2AX % değeri arttıkça 5. Gün embriyo oranı azalmakta veya tam tersi olarak p- H2AX/H2AX % değeri azaldıkça 5. Gün embriyo oranının arttığı belirlendi.



**Şekil 16:** Düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % ile 5. Gün embriyo oranı arasındaki ilişki

#### 10) p- H2AX/H2AX % değerinin gebelik sonuçlarına göre karşılaştırılması

Tablo 6’da gösterildiği gibi hem açıklanamayan infertilite grubunda hem de düşük over rezervi gruplarında gebelik durumuna göre p- H2AX/H2AX % değerinin anlamlı olarak farklılaşmadığı bulunmuştur ( $p>.05$ ).

**Tablo 6:** Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi gruplarında gebelik durumuna göre p- H2AX/H2AX % değerinin karşılaştırılması

	Gebelik durumu						p
	Transfer yapılmadı		Gebelik yok		Klinik gebelik		
	Ort.	SS.	Ort.	SS.	Ort.	SS.	
<b>Açıklanamayan infertilite grubunda</b>							
p- H2AX/H2AX %	30.28	20.82	43.42	18.32	34.21	13.39	.102
<b>Düşük over rezervi grubunda</b>							
p- H2AX/H2AX %	32.18	16.12	37.32	24.92	36.92	17.60	.852

## 5. TARTIŞMA

Dokular ve hücreler arasındaki etkileşimler organların fonksiyonu üzerinden hayati öneme sahiptir, bu açıdan bakıldığında folikül sıvısının bileşimine etki eden faktörlerin oosit fonksiyonu üzerine belirleyici etkileri olmakta ve oositin fizyolojik karakterine önemli katkı sağlamaktadır. Oosit dışındaki over folikülü bileşenleri over folikülü gelişiminde ve oosit matürasyonunda önemli rol oynamaktadır [148]. Ayrıca oositi çevreleyen foliküler sıvının biyokimyasal özelliklerinin, oosit maturasyonunu belirlemede ve sonrasında fertilizasyon ve embriyo gelişiminde kritik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir [149].

Bu çalışmada, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta gruplarında oosit mikroçevre elemanlarının (kumulus ooforus hücreleri, granuloza hücreleri) DNA hasar oranları ile aynı hasta gruplarına ait YÜT tedavi sonuçları arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı. Granuloza hücrelerindeki DNA hasar oranları ile, YÜT tedavilerinin belirlenen sonuç çıktıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ilişkisi saptanmadı.

Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta grupları arasında, foliküler sıvıda, p- H2AX MFI, H2AX MFI, p- H2AX / H2AX MFI, p- H2AX %, H2AX % ve p- H2AX / H2AX % parametreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta grupları arasında YÜT tedavileri ardından yapılan embriyoloji laboratuvar değerlendirmeleri ve klinik gebelik sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir. DNA hasra belirteci olarak, p- H2AX / H2AX MFI ve p- H2AX / H2AX % oransal parametreler her iki grup için ayrı ayrı embriyoloji laboratuvar takip parametreleri (maturasyon oranı, fertilizasyon oranı, 3. Gün kaliteli embriyo oranı, 5. Gün kaliteli embriyo oranı) ve gebelik sonuçları ile karşılaştırılmıştır;

- Düşük over rezervi hasta grubunda p- H2AX/H2AX MFI değeri ile fertilizasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif yönlü korelasyon ilişkisi bulunmasına rağmen 3. güne ait kaliteli embriyo oranı ile p- H2AX/H2AX MFI değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönde bir korelasyon ilişkisi saptanmıştır. Bir başka ifade ile düşük over

rezervi hasta grubunda DNA hasar miktarı arttıkça fertilizasyon şansı azalmaktadır. Ancak fertilize olmuş oositlerin 3. Güne ait kaliteli embriyo oranlarında DNA hasar miktarlarıyla ters orantılı bir ilişki izlenmiştir. Buna ek olarak, düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX % değeri arttıkça 5. Gün kaliteli embriyo oranı azaldığı görülmüştür. Ayrıca, düşük over rezervi grubunda p- H2AX/H2AX MFI ve p- H2AX/H2AX % değerleri arttıkça 5. Gün kaliteli embriyo oranı azaldığı görülmüştür. Düşük over rezervi grubunda H2AX/H2AX MFI ve p- H2AX/H2AX % değerlerinin gebelik sonuçlarıyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ilişkisi saptanmamıştır. Sun ve arkadaşlarının yürüttüğü hasta gruplarını genç ( $\leq 29$ ) ve ileri yaş ( $\geq 37$ ) olarak belirlediği bir çalışmada, 3. Gün embriyo kalitesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da, 5. Gün kaliteli embriyo oranı, implantasyon oranı ve klinik gebelik oranlarının istatistiksel olarak ileri yaş grubunda düştüğü belirtilmiştir. Aynı çalışmada, ileri yaş grubunda, bakılan  $\gamma$ -H2AX pozitiflik oranı genç hasta grubuna göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir [137]. Çalışma sonuçlarımız Sun ve arkadaşlarının verilerini desteklemekte ve ek olarak düşük over rezervi grubundaki artmış DNA hasarı miktarının klinik gebelik sonuçlarıyla arasında istatistiksel olarak bir korelasyon ilişkisi olmadığını ortaya koymaktadır. Bu bulgu bu konuda yapılmış tek çalışma özelliğini taşımaktadır.

- Açıklanamayan infertilite hasta grubunda H2AX/H2AX MFI değeri ile 3. Gün kaliteli embriyo oranı arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ilişkisi bulunmuştur. Bir başka ifade ile açıklanamayan infertilite hasta grubunda H2AX/H2AX MFI değeri arttıkça 3. Gün kaliteli embriyo oranı azalmaktadır. Açıklanamayan infertilite hasta grubundaki p- H2AX/H2AX MFI ve p- H2AX/H2AX % değerlerinin gebelik sonuçlarıyla ilişkisi incelendiğinde DNA hasar belirteçleri ile klinik gebelik sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ilişkisi tespit edilmemiştir. İdil ve arkadaşları tarafından yapılan, açıklanamayan infertilite ve tubal faktör hasta gruplarının dahil olduğu çalışmada DNA nick-end labeling yöntemiyle apoptoz oranının açıklanamayan faktör grubunda arttığı belirtilmiştir [150].

Literatür incelendiğinde, granuloza hücrelerindeki yüksek apoptotik cisim insidansının IVF tedavi prognozunu olumsuz şekilde etkilediği iddia edilmektedir [151-153].

Çalışmamızda hastaların bazal FSH ve Estradiol parametreleri hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. Açıklanamayan infertile hasta grubunun FSH değerinin düşük over rezervi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak daha düşük, Estradiol değerinin istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi grubu hastaların hormonal düzeyde önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. FSH ve Estradiol düzeyleri arasında farklılıklar, iki hasta grubunun AMH değerindeki anlamlı farklılığı açıklamaktadır. Bu sonuçlar örneklem gruplarımızın mevcut klinikleri ile uyumludur.

Oosit maturasyonu, oosit fertilizasyonu, 3. Ve 5. Gün kaliteli embriyo değerlendirmeleri Gardner-Schoolcraft ve Alpha-ESHRE İstanbul Kansensüsü kriterine göre yapılmıştır [154, 155]. Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta grupları ile karşılaştırıldığında maturasyon oranları, 5. Gün kaliteli embriyo oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Açıklanamayan infertilite grubunda düşük over rezervi hasta grubuna kıyasla toplanan oosit sayısı, M2 oosit sayısı, zigot sayısı ve fertilizasyon oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Ancak açıklanamayan infertile hasta grubunun 3. Gün kaliteli embriyo oranı düşük over rezerviyle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Alasmari ve arkadaşlarının dahil olduğu, açıklanamayan infertilite ve erkek faktörü nedenli İCSİ işlemi uygulanan hastalarda, fertilizasyon oranının açıklanamayan infertil hasta grubu lehine yüksek bulunmuş olsada klinik gebelik oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [156]. Çalışmamız Alasmari ve arkadaşlarını destekler niteliktedir. Yao ve arkadaşlarının dahil olduğu genç ( $\leq 34$ ) ve ileri ( $\geq 35$ ) yaş düşük over rezervi hastalarına uygulanan YÜT tedavi sonuçları karşılaştırıldığında, oosit maturasyon oranları genç yaş düşük over rezervi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak 5. Gün kaliteli embriyo oranları ve klinik gebelik oranları iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirtilmiştir [157].

Bu çalışmada, açıklanamayan infertilite grubunun klinik gebelik oranı düşük over rezervi grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuş olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Transfer yapılmayan hastalar gebelik sonuçları açısından analiz dışı tutulduğunda da benzer olarak, açıklanamayan infertilite grubunda klinik gebelik olan hastaların oranı, düşük over rezervi grubuna göre daha yüksek bulunsada istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çok merkezli olarak yapılan çalışmanın ESHRE raporuna göre, açıklanamayan infertilite hasta grubunun YÜT tedavisiyle başalı gebelik oranı %25.7 olarak belirtilmiştir [158]. Yun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, düşük over rezervi grubunda uygulanan YÜT tedavisi sonucunda siklus başına elde edilen klinik gebelik oranı %11.5 olarak belirtilmiştir. Sonuçlarımız güncel literatürle uyumludur.

Kohort büyüklüğünün az olması ve foliküler aspiratın her hasta için bir havuzda toplanmış olması çalışmamızın limitasyonları arasındadır. Örneklem gruplarının sayısının artırılmasının ve her oosite ait foliküler aspiratın ayrı ayrı ilgili oosit ve embriyonun gelişimiyle ilişkilendirmesinin konu ile ilgili çalışmalara fayda sağlayacağına inanıyoruz. Gelecekte foliküler sıvı bileşenlerini ve oosit mikro-çevre elemanlarının oosit ile ilişkisinin ortaya konması halinde infertilite etiyojisinin aydınlatılması ve tedavi seçeneklerinin genişletilmesi noktasında üreme tıbbına değerli katkılar sağlayacağına inanıyoruz.

## 6. SONUÇLAR

Hipotezimiz, granuloza hücrelerinde bakılan DNA hasarının, YÜT tedavi başarılarını öngörmekte başarılı olabileceğini varsaymaktadır. Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi hasta gruplarında folüküler sıvıda bakılan DNA hasar belirteç oranları ve embriyoloji takipleri arasında anlamlı farklar olsa da gebelik sonuçlarıyla kıyaslandığında anlamlı bir korelasyon ilişkisi bulunamamıştır.



## 7. KAYNAKLAR

1. Ishihara, O., et al., *International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies, 2007*. Fertil Steril, 2015. 103(2): p. 402-13.e11.
2. Zegers-Hochschild, F., et al., *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2005*. Fertil Steril, 2014. 101(2): p. 366-78.
3. Messerlian, C. and A.J. Gaskins, *Epidemiologic Approaches for Studying Assisted Reproductive Technologies: Design, Methods, Analysis, and Interpretation*. Current Epidemiology Reports, 2017. 4(2): p. 124-132.
4. van Eckelen, R., et al., *IVF for unexplained subfertility; whom should we treat?* Hum Reprod, 2019. 34(7): p. 1249-1259.
5. Smith, S., S.M. Pfeifer, and J.A. Collins, *Diagnosis and management of female infertility*. Jama, 2003. 290(13): p. 1767-70.
6. Ray, A., et al., *Unexplained infertility: an update and review of practice*. Reprod Biomed Online, 2012. 24(6): p. 591-602.
7. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Evidence-based Clinical Guidelines. Guideline Summary No. 3: the management of infertility in secondary care*. BJU Int, 1999. 83(6): p. 641-5.
8. Cooper, A.R., et al., *The time is now for a new approach to primary ovarian insufficiency*. Fertility and sterility, 2011. 95(6): p. 1890-1897.
9. Rasool, S. and D. Shah, *Fertility with early reduction of ovarian reserve: the last straw that breaks the Camel's back*. Fertility Research and Practice, 2017. 3(1): p. 15.
10. Devine, K., et al., *Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181,536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System*. Fertil Steril, 2015. 104(3): p. 612-19.e3.
11. *Recent advances in medically assisted conception. Report of a WHO Scientific Group*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1992. 820: p. 1-111.
12. Sreerangaraja Urs, D.B., et al., *Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility*. Int J Mol Sci, 2020. 21(10).
13. Szamatowicz, M., *Assisted reproductive technology in reproductive medicine - possibilities and limitations*. Ginekol Pol, 2016. 87(12): p. 820-823.
14. Wyndham, N., P.G. Marin Figueira, and P. Patrizio, *A persistent misperception: assisted reproductive technology can reverse the "aged biological clock"*. Fertil Steril, 2012. 97(5): p. 1044-7.

15. Zegers-Hochschild, F., et al., *The International Glossary on Infertility and Fertility Care*, 2017. Hum Reprod, 2017. 32(9): p. 1786-1801.
  16. Steptoe, P.C. and R.G. Edwards, *Birth after the reimplantation of a human embryo*. Lancet, 1978. 2(8085): p. 366.
  17. Jain, M. and M. Singh, *Assisted Reproductive Technology (ART) Techniques*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
18. *Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion*. Fertil Steril, 2020. 114(2): p. 239-245.
  19. Barratt, C.L.R., et al., *The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities*. Hum Reprod Update, 2017. 23(6): p. 660-680.
  20. Alukal, J.P. and D.J. Lamb, *Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)--what are the risks?* Urol Clin North Am, 2008. 35(2): p. 277-88, ix-x.
  21. Oehninger, S. and G.D. Hodgen, *9 Induction of ovulation for assisted reproduction programmes*. Baillière's clinical obstetrics and gynaecology, 1990. 4(3): p. 541-573.
  22. Fauser, B.C. and P. Devroey, *Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2003. 14(5): p. 236-242.
  23. De Geyter, C., et al., *ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE*. Hum Reprod Open, 2020. 2020(1): p. hoz038.
  24. Al-Inany, H.G., et al., *Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(5): p. Cd001750.
  25. Magon, N., *Gonadotropin releasing hormone agonists: Expanding vistas*. Indian J Endocrinol Metab, 2011. 15(4): p. 261-7.
  26. Madani, T., M. Ashrafi, and L.M. Yeganeh, *Comparison of different stimulation protocols efficacy in poor responders undergoing IVF: a retrospective study*. Gynecol Endocrinol, 2012. 28(2): p. 102-5.
  27. Schally, A.V., *Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis*. Peptides, 1999. 20(10): p. 1247-62.
  28. ML., G., *Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology*. Obstet Gynecol, 2011. 118(3): p. 706-707.
  29. Del Gadillo, J.C., et al., *Comparison of GnRH agonists and antagonists in unselected IVF/ICSI patients treated with different controlled ovarian hyperstimulation protocols: a matched study*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002. 102(2): p. 179-83.
  30. Prapas, N., et al., *GnRH agonist versus GnRH antagonist in oocyte donation cycles: a prospective randomized study*. Hum Reprod, 2005. 20(6): p. 1516-20.
  31. Aletebi, F., *Comparing gonadotrophin-releasing hormone agonists or gonadotrophin-releasing hormone antagonists in poor responder in IVF*. Middle East Fertility Society Journal, 2007. 12(2): p. 123.

32. Bodri, D., S.K. Sunkara, and A. Coomarasamy, *Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis*. Fertil Steril, 2011. 95(1): p. 164-9.
33. Wang, Q. and Q.Y. Sun, *Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors*. Reprod Fertil Dev, 2007. 19(1): p. 1-12.
34. Ozturk, S., *Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies*. Mol Reprod Dev, 2020. 87(10): p. 1021-1036.
35. Hoshino, Y., *Updating the markers for oocyte quality evaluation: intracellular temperature as a new index*. Reprod Med Biol, 2018. 17(4): p. 434-441.
36. Lasiene, K., et al., *Morphological criteria of oocyte quality*. Medicina (Kaunas), 2009. 45(7): p. 509-15.
37. Balaban, B. and B. Urman, *Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation*. Reprod Biomed Online, 2006. 12(5): p. 608-15.
38. Setti, A.S., et al., *Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011. 159(2): p. 364-70.
39. Ebner, T., et al., *Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review*. Hum Reprod Update, 2003. 9(3): p. 251-62.
40. Desai, N.N., et al., *Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study*. Hum Reprod, 2000. 15(10): p. 2190-6.
41. *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting*. Hum Reprod, 2011. 26(6): p. 1270-83.
42. Gardner, D.K. and W.B. Schoolcraft, *Culture and transfer of human blastocysts*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1999. 11(3): p. 307-11.
43. *Infertility FAQs*. [cited 2023 September]; Available from: <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility/index.htm>.
44. *Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion Summary, Number 781*. Obstet Gynecol, 2019. 133(6): p. 1294-1295.
45. Gelbaya, T.A., et al., *Definition and epidemiology of unexplained infertility*. Obstet Gynecol Surv, 2014. 69(2): p. 109-15.
46. Audu, B.M., et al., *Prevalence of utero-tubal infertility*. J Obstet Gynaecol, 2009. 29(4): p. 326-8.
47. *Role of tubal surgery in the era of assisted reproductive technology: a committee opinion*. Fertil Steril, 2015. 103(6): p. e37-43.
48. Broeze, K.A., et al., *Are patient characteristics associated with the accuracy of hysterosalpingography in diagnosing tubal pathology? An individual patient data meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2011. 17(3): p. 293-300.
49. Tan, J., et al., *The effect of unilateral tubal block diagnosed by hysterosalpingogram on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination cycles: systematic review and meta-analysis*. Bjog, 2019. 126(2): p. 227-235.

50. Carson, S.A. and A.N. Kallen, *Diagnosis and Management of Infertility: A Review*. Jama, 2021. 326(1): p. 65-76.
51. *Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion*. Fertil Steril, 2015. 103(6): p. e44-50.
52. Sirmans, S.M. and K.A. Pate, *Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome*. Clin Epidemiol, 2013. 6: p. 1-13.
53. *Obesity and reproduction: a committee opinion*. Fertil Steril, 2015. 104(5): p. 1116-26.
54. Boutari, C., et al., *The effect of underweight on female and male reproduction*. Metabolism, 2020. 107: p. 154229.
55. Ozkan, S., W. Murk, and A. Arici, *Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1127: p. 92-100.
56. *Endometriosis and infertility: a committee opinion*. Fertil Steril, 2012. 98(3): p. 591-8.
57. Odisho, A.Y., et al., *Temporal and geospatial trends in male factor infertility with assisted reproductive technology in the United States from 1999-2010*. Fertil Steril, 2014. 102(2): p. 469-75.
58. Kruger, T.F., et al., *Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1988. 49(1): p. 112-7.
59. van der Steeg, J.W., et al., *Role of semen analysis in subfertile couples*. Fertil Steril, 2011. 95(3): p. 1013-9.
60. *Management of nonobstructive azoospermia: a committee opinion*. Fertil Steril, 2018. 110(7): p. 1239-1245.
61. Garcia, J.E., et al., *Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II, 1981*. Fertil Steril, 1983. 39(2): p. 174-9.
62. Pellicer, A., et al., *Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation*. Fertil Steril, 1987. 47(5): p. 812-5.
63. Keay, S.D., et al., *Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation*. Br J Obstet Gynaecol, 1997. 104(5): p. 521-7.
64. Faddy, M.J., et al., *Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause*. Hum Reprod, 1992. 7(10): p. 1342-6.
65. van Kooij, R.J., et al., *Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1996. 66(5): p. 769-75.
66. Hanoch, J., et al., *Young low responders protected from untoward effects of reduced ovarian response*. Fertil Steril, 1998. 69(6): p. 1001-4.
67. El-Toukhy, T., et al., *Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve--an eight year study*. Hum Reprod, 2002. 17(6): p. 1519-24.
68. La Marca, A., et al., *Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction*. Reprod Biomed Online, 2011. 22(4): p. 341-9.
69. Khader, A., et al., *External validation of anti-Müllerian hormone based prediction of live birth in assisted conception*. J Ovarian Res, 2013. 6(1): p. 3.

70. Levi, A.J., et al., *Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve*. Fertil Steril, 2001. 76(4): p. 666-9.
71. Elter, K., et al., *Antral follicle assessment after down-regulation may be a useful tool for predicting pregnancy loss in in vitro fertilization pregnancies*. Gynecol Endocrinol, 2005. 21(1): p. 33-7.
72. Broer, S.L., et al., *Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach*. Hum Reprod Update, 2013. 19(1): p. 26-36.
73. Galey-Fontaine, J., et al., *Age and ovarian reserve are distinct predictive factors of cycle outcome in low responders*. Reprod Biomed Online, 2005. 10(1): p. 94-9.
74. La Marca, A. and S.K. Sunkara, *Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice*. Hum Reprod Update, 2014. 20(1): p. 124-40.
75. Ferraretti, A.P., et al., *ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria*. Hum Reprod, 2011. 26(7): p. 1616-24.
76. Ferraretti, A.P. and L. Gianaroli, *The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision?* Hum Reprod, 2014. 29(9): p. 1842-5.
77. Collins, J.A. and A. Van Steirteghem, *Overall prognosis with current treatment of infertility*. Human reproduction update, 2004. 10(4): p. 309-316.
78. Zegers-Hochschild, F., et al., *The international glossary on infertility and fertility care, 2017*. Human reproduction, 2017. 32(9): p. 1786-1801.
79. Guzick, D., et al., *Efficacy of treatment for unexplained infertility*. Fertility and sterility, 1998. 70(2): p. 207-213.
80. Diamond, M.P., et al., *Letrozole, gonadotropin, or clomiphene for unexplained infertility*. New England Journal of Medicine, 2015. 373(13): p. 1230-1240.
81. Control, C.f.D. and Prevention, *Assisted reproductive technology national summary report*. In American Society for Reproductive Medicine SfART. US Dept of Health and Human Services, 2015. 2017.
82. Hansen, K.R., et al., *Predictors of pregnancy and live-birth in couples with unexplained infertility after ovarian stimulation–intrauterine insemination*. Fertility and sterility, 2016. 105(6): p. 1575-1583. e2.
83. Venetis, C.A., et al., *Clinical implications of congenital uterine anomalies: a meta-analysis of comparative studies*. Reprod Biomed Online, 2014. 29(6): p. 665-83.
84. Chan, Y.Y., et al., *Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies: a systematic review*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2011. 38(4): p. 371-82.
85. Bittencourt, C.A., et al., *Accuracy of saline contrast sonohysterography in detection of endometrial polyps and submucosal leiomyomas in women of reproductive age with abnormal uterine bleeding: systematic review and meta-analysis*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2017. 50(1): p. 32-39.
86. Bosteels, J., et al., *Hysteroscopy for treating subfertility associated with suspected major uterine cavity abnormalities*. Cochrane Database Syst Rev, 2018. 12(12): p. Cd009461.

87. Fujimoto, V.Y., et al., *Congenital cervical atresia: report of seven cases and review of the literature*. Am J Obstet Gynecol, 1997. 177(6): p. 1419-25.
88. Martyn, F., F.M. McAuliffe, and M. Wingfield, *The role of the cervix in fertility: is it time for a reappraisal?* Hum Reprod, 2014. 29(10): p. 2092-8.
89. Joshi, N. and J.L. Chan, *Female Genomics: Infertility and Overall Health*. Semin Reprod Med, 2017. 35(3): p. 217-224.
90. Telenti, A., et al., *Deep sequencing of 10,000 human genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(42): p. 11901-11906.
91. McClellan, J. and M.C. King, *Genetic heterogeneity in human disease*. Cell, 2010. 141(2): p. 210-7.
92. Younglai, E.V., A.C. Holloway, and W.G. Foster, *Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success*. Human Reproduction Update, 2005. 11(1): p. 43-57.
93. Soto, A.M., et al., *The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants*. Environmental health perspectives, 1995. 103(suppl 7): p. 113-122.
94. Kelce, W.R., et al., *Persistent DDT metabolite p, p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist*. Nature, 1995. 375(6532): p. 581-585.
95. Chapin, R., et al., *The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function*. Toxicological Sciences, 1997. 40(1): p. 138-157.
96. Crellin, N.K., et al., *Inhibition of basal and stimulated progesterone synthesis by dichlorodiphenyldichloroethylene and methoxychlor in a stable pig granulosa cell line*. Reproduction, 2001. 121(3): p. 485-92.
97. Younglai, E.V., et al., *Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum, and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization*. Arch Environ Contam Toxicol, 2002. 43(1): p. 121-6.
98. Gray, L.E., et al., *Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals*. Hum Reprod Update, 2001. 7(3): p. 248-64.
99. Hassan, M.A. and S.R. Killick, *Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity*. Fertil Steril, 2004. 81(2): p. 384-92.
100. Jensen, T.K., et al., *Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men*. Fertil Steril, 2004. 82(4): p. 863-70.
101. Bützow, T.L., et al., *Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(9): p. 3135-9.
102. Supramaniam, P.R., et al., *The correlation between raised body mass index and assisted reproductive treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis of the evidence*. Reproductive health, 2018. 15(1): p. 1-15.
103. Kudesia, R., et al., *The effect of female body mass index on in vitro fertilization cycle outcomes: a multi-center analysis*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2018. 35: p. 2013-2023.

104. Luke, B., *Adverse effects of female obesity and interaction with race on reproductive potential.* Fertility and Sterility, 2017. 107(4): p. 868-877.
105. Ding, W., et al., *Impact of female obesity on cumulative live birth rates in the first complete ovarian stimulation cycle.* Frontiers in Endocrinology, 2019. 10: p. 516.
106. Mitchell, D.C., et al., *Beverage caffeine intakes in the U.S.* Food Chem Toxicol, 2014. 63: p. 136-42.
107. van Dam, R.M., F.B. Hu, and W.C. Willett, *Coffee, Caffeine, and Health.* N Engl J Med, 2020. 383(4): p. 369-378.
108. Wood, A.M., et al., *Risk thresholds for alcohol consumption: combined analysis of individual-participant data for 599 912 current drinkers in 83 prospective studies.* Lancet, 2018. 391(10129): p. 1513-1523.
109. Rao, W., et al., *The association between caffeine and alcohol consumption and IVF/ICSI outcomes: A systematic review and dose-response meta-analysis.* Acta Obstet Gynecol Scand, 2022. 101(12): p. 1351-1363.
110. Fowles, J. and E. Dybing, *Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke.* Tob Control, 2003. 12(4): p. 424-30.
111. Dechanet, C., et al., *Effects of cigarette smoking on reproduction.* Hum Reprod Update, 2011. 17(1): p. 76-95.
112. Ozbakir, B. and P. Tulay, *Does cigarette smoking really have a clinical effect on folliculogenesis and oocyte maturation?* Zygote, 2020. 28(4): p. 318-321.
113. Faddy, M.J., *Follicle dynamics during ovarian ageing.* Mol Cell Endocrinol, 2000. 163(1-2): p. 43-8.
114. te Velde, E.R., et al., *Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging.* Mol Cell Endocrinol, 1998. 145(1-2): p. 67-73.
115. Ashwood-Smith, M.J. and R.G. Edwards, *DNA repair by oocytes.* Mol Hum Reprod, 1996. 2(1): p. 46-51.
116. Titus, S., et al., *Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans.* Sci Transl Med, 2013. 5(172): p. 172ra21.
117. Nagaoka, S.I., T.J. Hassold, and P.A. Hunt, *Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem.* Nat Rev Genet, 2012. 13(7): p. 493-504.
118. Finch, C.E., *The evolution of ovarian oocyte decline with aging and possible relationships to Down syndrome and Alzheimer disease.* Exp Gerontol, 1994. 29(3-4): p. 299-304.
119. Wang, Z.B., H. Schatten, and Q.Y. Sun, *Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging?* Physiology (Bethesda), 2011. 26(5): p. 314-25.
120. Ghosh, S., et al., *Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth.* Hum Genet, 2010. 127(4): p. 403-9.
121. Liu, L., et al., *Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(17): p. 6496-501.

122. Keefe, D.L. and L. Liu, *Telomeres and reproductive aging*. *Reprod Fertil Dev*, 2009. 21(1): p. 10-4.
123. Treff, N.R., et al., *Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy*. *PLoS Genet*, 2011. 7(6): p. e1002161.
124. Abu-Hassan, D., et al., *Comet assay of cumulus cells and spermatozoa DNA status, and the relationship to oocyte fertilization and embryo quality following ICSI*. *Reprod Biomed Online*, 2006. 12(4): p. 447-52.
125. Fair, T., *Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence*. *Anim Reprod Sci*, 2003. 78(3-4): p. 203-16.
126. Eppig, J.J., M. O'Brien, and K. Wigglesworth, *Mammalian oocyte growth and development in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 1996. 44(2): p. 260-73.
127. Raman, R.S., et al., *Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection*. *Hum Reprod*, 2001. 16(5): p. 831-5.
128. Hakuno, N., et al., *Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia*. *Endocrinology*, 1996. 137(5): p. 1938-48.
129. Mattioli, M. and B. Barboni, *Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. 161(1-2): p. 19-23.
130. Zhuo, L. and K. Kimata, *Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation*. *Cell Struct Funct*, 2001. 26(4): p. 189-96.
131. Sinkó, I., et al., *Effect of cigarette smoking on DNA damage of human cumulus cells analyzed by comet assay*. *Reprod Toxicol*, 2005. 20(1): p. 65-71.
132. Lindley, E.M., et al., *Cryopreservation of human cumulus cells for co-cultures and assessment of DNA damage after thawing using the comet assay*. *J Assist Reprod Genet*, 2001. 18(10): p. 534-8.
133. Stewart, D.R. and C.A. VandeVoort, *Relaxin secretion by human granulosa cell culture is predictive of in-vitro fertilization-embryo transfer success*. *Hum Reprod*, 1999. 14(2): p. 338-44.
134. Mansour, R.T., et al., *Co-culture of human pronucleate oocytes with their cumulus cells*. *Hum Reprod*, 1994. 9(9): p. 1727-9.
135. Quinn, P. and R. Margalit, *Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos*. *J Assist Reprod Genet*, 1996. 13(1): p. 9-14.
136. Bhardwaj, R., et al., *GREM1, EGFR, and HAS2; the oocyte competence markers for improved buffalo embryo production in vitro*. *Theriogenology*, 2016. 86(8): p. 2004-11.
137. Sun, X.L., et al., *The activated DNA double-strand break repair pathway in cumulus cells from aging patients may be used as a convincing predictor of poor outcomes after in vitro fertilization-embryo transfer treatment*. *PLoS One*, 2018. 13(9): p. e0204524.
138. Dhali, A., et al., *Temporal expression of cumulus cell marker genes during in vitro maturation and oocyte developmental competence*. *J Assist Reprod Genet*, 2017. 34(11): p. 1493-1500.
139. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. *Carcinogenesis*, 2002. 23(5): p. 687-96.

140. Fenech, M., et al., *Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells*. *Mutagenesis*, 2011. 26(1): p. 125-32.
141. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. *J Biol Chem*, 1998. 273(10): p. 5858-68.
142. Celeste, A., et al., *Genomic instability in mice lacking histone H2AX*. *Science*, 2002. 296(5569): p. 922-7.
143. Celeste, A., et al., *Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks*. *Nat Cell Biol*, 2003. 5(7): p. 675-9.
144. Valdiguiesias, V., et al.,  *$\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies*. *Mutat Res*, 2013. 753(1): p. 24-40.
145. Nishihara, K., S.A. Shahane, and M. Xia, *Determination of Histone H2AX Phosphorylation in DT40 Cells*. *Methods Mol Biol*, 2016. 1473: p. 71-6.
146. Zhang, D., et al., *Increased DNA damage and repair deficiency in granulosa cells are associated with ovarian aging in rhesus monkey*. *J Assist Reprod Genet*, 2015. 32(7): p. 1069-78.
147. Govindaraj, V., R. Keralapura Basavaraju, and A.J. Rao, *Changes in the expression of DNA double strand break repair genes in primordial follicles from immature and aged rats*. *Reprod Biomed Online*, 2015. 30(3): p. 303-10.
148. Yalçinkaya, E., E. Çalışkan, and O. Budak, *In vitro maturation may prevent the cancellation of in vitro fertilization cycles in poor responder patients: A case report*. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2013. 14(4): p. 235-7.
149. Leroy, J.L., et al., *Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum*. *Theriogenology*, 2004. 62(6): p. 1131-43.
150. Idil, M., et al., *Does granulosa cell apoptosis have a role in the etiology of unexplained infertility?* *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004. 112(2): p. 182-4.
151. Nakahara, K., et al., *The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs*. *Fertil Steril*, 1997. 68(2): p. 312-7.
152. Oosterhuis, G.J., et al., *Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome*. *Fertil Steril*, 1998. 70(4): p. 747-9.
153. Nakahara, K., et al., *Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program*. *Fertil Steril*, 1997. 67(2): p. 302-8.
154. Balaban B, B.D., Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, Gardner D, Hardarson T, Lundin K, Magli MC, Mortimer D, Mortimer S, Munné S, Royere D, Scott L, Smitz J, Thornhill A, Van Blerkom J, Van Den Abbeel E., *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting*. *Hum Reprod*, 2011. 26(6): p. 1270-83.
155. Schoolcraft, W.B., et al., *Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs*. *Fertil Steril*, 1999. 72(4): p. 604-9.

156. Alasmari W, E.F., Albar Z, et al., *Comparable Reproductive Outcomes of ICSI for Couples with Unexplained Infertility and Couples with Male Factor Infertility*. Middle East Fertility Society Journal, 2018. 4(23): p. 393-398.
157. Yao, L.N., et al., *Comparative study of assisted reproductive outcomes between young patients with occult premature ovarian insufficiency and advanced-age patients*. J Int Med Res, 2020. 48(6): p. 300060520934656.
158. Crosignani, P.G., D.E. Walters, and A. Soliani, *The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report\**. Human Reproduction, 1991. 6(7): p. 953-958.

