

T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**TEKRARLAYAN BAŞARISIZ
İNTRAUTERİN İNSEMİNASYONU
TAKİBEN BAKILAN İN VİTRO
FERTİLİZASYON SİKLUSLARINDA
FOLLİKÜLER SIVIDA TOTAL OKSİDAN
VE ANTİOKSİDAN SEVİYELERİNİN
BELİRLENMESİ VE KLİNİK GEBELİKLE
KORELASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Seray KAYA TOPDAĞI

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bünyamin BÖREKÇİ

ERZURUM-2018

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

TIPTA UZMANLIK TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi Arş.Gör.Dr.Seray KAYA TOPDAĞI'nın "Tekrarlayan Başarısız İntrauterin İnseminasyonu Takiben Bakılan İn Vitro Fertilizasyon Sikluslarında Folliküler Sıvıda Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi ve Klinik Gebelikle Korelasyonunun Araştırılması" konulu tezini incelemek üzere oluşturulan tez jürisine üye olarak seçildiğimizin ilgi yazınızla bildirilmesi üzerine jüri üyeleri, 25.12.2018 tarihinde toplanmış ve ilgili öğrenci tez savunmasına alınmıştır.

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunmasının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezi jüri üyelerince oy birliği ile kabul edilmiştir.

Bilgilerinize arz ederiz.


Prof.Dr.Yakup Kumtepe
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Bünyamin BÖREKÇİ
Jüri Üyesi

Doç.Dr.Ayşe Nur Aksoy
Jüri Üyesi

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nın 09.03.2018 tarihli oturumunda “Tekrarlayan Başarısız İntrauterin İnseminasyonu (IUI) Takiben Bakılan İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Sikluslarında Folliküler Sıvıda Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi ve Klinik Gebelikle Korelasyonunun Araştırılması”, isimli uzmanlık tezinin Prof. Dr. Bünyamin BÖREKÇİ yöneticiliğinde araştırma görevlisi Dr. Seray KAYA TOPDAĞI tarafından çalışılması uygun görülmüştür. Cerrahi Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı'nın 13.03.2018 tarihli '42190979-050.01.04-E.1800085654' sayılı oturumunda tez çalışması olarak yapılması kabul edildi. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 29.03.2018 tarih ve ' B.30.2.ATA.0.01.00/143' sayılı toplantısının 37 no'lu kararı ile araştırmanın etik kurallara uygun olduğu kararı alındı.

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Açıklanamayan İnfertilite	4
2.2. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi	4
2.2.1. Jinekolog Açısından Erkek infertilitesinin Değerlendirilmesi	4
2.2.2. Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	6
2.2.3. İleri Değerlendirme	9
2.2.3.1. Anatomik Faktörlerin Değerlendirilmesi.....	10
2.2.3.2. Açıklanamayan İnfertilite ve Minimal Endometriozis	13
2.3. Açıklanamayan İnfertilite Tanısı Alan Hastalarda Tedavi Yönetimi	13
2.3.1. Açıklanamayan İnfertilitenin Bekleyerek (Ekspektan) Tedavisi	13
2.3.2. Açıklanamayan İnfertilitenin Tek Başına KS veya Tek Başına IUI Tedavisi	14
2.3.3. Açıklanamayan İnfertilitenin KS ve IUI ile Beraber Tedavi Edilmesi	14
2.4. Açıklanamayan İnfertilite Tedavisinde Uygulanan Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT-ART)	14
2.4.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI)	14
2.4.2. In Vitro Fertilizasyon (IVF)	18
2.4.2.1. IVF Tedavisinde Kontrollü Overyan Hiperstümülasyon (KOH)	19
2.4.2.2. Ovulasyonun Tetiklenmesi	21
2.4.2.3. KOH Takibi	22
2.4.2.4. Luteal Faz Desteği	22
2.4.2.5. OPU İşleminin Zamanlaması.....	23

2.4.2.6. Klasik IVF (Tüp Bebek) veya ICSI (Mikroenjeksiyon).....	24
2.4.2.7. Embriyo Transferi.....	25
2.4.2.8. Gebelik Testi ve İzlem Aşaması.....	25
2.5. YÜT Siklusları ve İmplantasyon.....	25
2.5.1. YÜT’de İmplantasyon Başarısızlığı ve Nedenleri.....	26
2.6. Oksidatif Stres (OS) ve Doku Hasarı.....	29
2.6.1. Moleküler Oksijenin Özellikleri ve Serbest Radikalın Tanımı.....	29
2.6.2. Serbest Radikal Kaynakları.....	30
2.6.3. Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP) /(ROS)/(ROT).....	30
2.6.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri.....	32
2.7. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Hücrel Savunma.....	33
2.7.1. Antioksidan Savunma Sistemi.....	33
2.8. Total Antioksidan Status (TAS/TAK).....	36
2.9. Total Oksidan Status (TOS).....	36
2.10. Oksidatif Stres İndeksi (OSI).....	36
2.10.1. Oksidatif Stresin İnfertilite ile İlişkisi.....	37
2.10.1.1. Oksidatif Stres ve Folikülogenez.....	37
2.10.1.2. Oksidatif Stres ve Oosit- Embriyo Kalitesi.....	38
2.10.1.3. Oksidatif Stres ve Abortus.....	39
2.10.1.4. Oksidatif Stres ve Açıklanamayan İnfertilite.....	39
3. MATERYAL VE METOD.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	40
3.1.2. Kullanılan Reaktif Malzemeler.....	41
3.2. Metod.....	41
3.2.1. Çalışmaya Alınan Hastaların Belirlenmesi.....	41
3.2.2. Hastalara Ovulasyon İndüksiyonunun Başlanması.....	42
3.2.3. Oosit Pick-up İşlemi (OPU) Yapılması ve Folliküler Sıvı Toplanması....	43
3.2.4. TAS ve TOS Kitlerinin Çalışma Prensipleri.....	44
3.2.5. Oositin Olgunlaşması, Fertilizasyon ve Oluşan Embriyoların Kalitelerinin Belirlenmesi.....	46
3.2.5.1. Fertilizasyon Aşaması.....	47

3.2.5.2. Embriyo Kalitelerinin Belirlenmesi.....	48
3.2.5.3. Embriyo Transferi.....	50
3.3. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre Değerlendirilmesi	53
4.1.1. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre Yaş ve Hormonal Değerlerinin Karşılaştırılması	53
4.1.2. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre 12.Gün hCG ve Progesteron Değerleri ile Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerlerinin Karşılaştırılması	54
4.1.3. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre Gebelik Durumları ile Embriyo Kalitelerinin Karşılaştırılması	56
4.2. Hastaların Vücut Kitle İndekslerine (VKİ) Göre Değerlendirilmesi.....	57
4.2.1. Hastaların Vücut Kitle İndekslerine (VKİ) Göre Yaş, HbA1c, Kortizol Hormonu ve Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerlerinin Karşılaştırılması	57
4.2.2. Hastaların Vücut Kitle İndekslerine (VKİ) Göre Gebelik Durumları ile Embriyo Kalitelerinin Karşılaştırılması	58
4.3. Hastaların Embriyo Durumlarına Göre Değerlendirilmesi	58
4.3.1. Hastaların Embriyo Kalitelerine Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerleri, Yaş ve Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması.....	58
4.3.2. Hastaların Embriyo Kalitelerine Göre 12. gün hCG ve Progesteron Değerlerinin Karşılaştırılması	60
4.3.3. Hastaların Transfer Edilen Embriyo Sayılarına Göre Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması.....	61
4.4. Hastaların Mesleklerine Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI Değerleri ile Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması	61
4.5. Hastaların Primer/Sekonder İnfertilite Durumlarına Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerleri ile Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması.....	62
4.6. Hastaların Gebelik Durumlarına Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI Değerleriyle Birlikte Yaş Durumunun Karşılaştırılması.....	63

4.7. Hastaların Gebelik Durumlarına Göre Eşlerinin Spermiogram	
Sonuçlarının Karşılaştırılması	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR	80



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmaya katılan hastaların hastaların hormonal durumları ve bazı demografik özellikleri.	52
Tablo 2. Çalışmaya katılan hastaların farklı demografik özellikleri.	53
Tablo 3. Sigara kullanma alışkanlıklarına göre hastaların yaş, bazal hormon ve diğer hormon değerleri.....	54
Tablo 4. Sigara kullanma alışkanlıklarına göre hastaların 12.gün Hcg, 12.gün progesteron değerleri ve folliküler sıvılarındaki TAS,TOS,OSI değerleri.....	55
Tablo 5. Hastaların Sigara Alışkanlıklarına Göre Biyokimyasal Gebelik ve Klinik Gebelik Oluşması Durumları ile Embriyo Kalitelerinin Karşılaştırılması	56
Tablo 6. VKİ'lerine göre hastaların yaş, HbA1c, kortizol Hormonu ve folliküler sıvılarındaki TAS, TOS, OSI değerleri	57
Tablo 7. Hastaların VKİ'lerine göre biyokimyasal gebelik oluşması ve klinik gebelik oluşması durumları ile embriyo kalite durumları	58
Tablo 8. Hastaların embriyo kalitelerine göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS, OSI değerleri, biyokimyasal gebelik, klinik gebelik durumları ile yaş durumları.....	60
Tablo 9. Hastaların embriyo kalitelerine göre transfer sonrası 12.gün bakılan Hcg ve Progesteron değerleri	60
Tablo 10. Embriyo transfer sayılarına göre biyokimyasal gebelik ve klinik gebelik durumları	61
Tablo 11. Hastaların mesleklerine göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI değerleri ile biyokimyasal gebelik ve klinik gebelik durumları	62
Tablo 12. Hastaların primer/sekonder infertilite durumlarına göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS, OSI değerleri ile gebelik durumları	63
Tablo 13. Hastaların gebelik durumlarına göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI değerleri ile yaş durumu	64
Tablo 14. Hastaların gebelik durumlarına göre sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı ve sperm hareketlilik durumu.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 2010 WHO Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen kitabındaki referans değerler	5
Şekil 2. Menstrüel siklustaki hormonal değişiklikler	9
Şekil 3. The classification system of Mullerian duct anomalies used by the American Fertility Society.	11
Şekil 4. Klasik IVF ve ICSI Tekniği.....	19
Şekil 5. Biradikal	30
Şekil 6. Delta O2.....	30
Şekil 7. Sigma O2	30
Şekil 8. Süperoksit Oluşumu	31
Şekil 9. Hidrojen Peroksit Oluşumu	32
Şekil 10. Folikülometri ile Antral Folikül Takibi (Usg Görüntüsü)	43
Şekil 11. Oositin Olgun Faza Ulaşma Aşamaları	46
Şekil 12. Normal Fertilizasyon, Pronukleus Görüntüsü	48
Şekil 13. Embriyo Gelişim Süreci (Sakkas et al. Fertil Steril 2001; 76: 1150)	49

KISALTMALAR DİZİNİ

AFS	: Antral folikül sayısı
AMH	: Antimüllerian hormon
E2	: Estradiol
ET	: Embriyo transferi
FS/FF	: Folliküler sıvı
FSH	: Folikül stimulan hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
HbA1c	: Glikozillenmiş hemoglobin
Hcg	: İnsan koryonik gonadotropin
HMG	: İnsan menopozal gonadotropini
HSG	: Histerosalpingografi
ICSI	: İntra stoplazmik sperm enjeksiyonu
IUI	: İntra uterin inseminasyon
IVF	: İn vitro fertilizasyon
KOS	: Kontrollü ovaryan stimülasyon
KS	: Klomifen sitrat
LH	: Luteinizan hormon
m²	: Metrekare
mcg	: Mikrogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NICE	: Ulusal Sağlık ve Bakım Enstitüsü
OHSS	: Ovaryan hiperstimülasyon sendromu
OSI	: Oksidatif stres indeksi
P	: Progesteron
PKOS	: Polikistik over sendromu
ROS/ROT/ROP	: Reaktif oksijen partikülleri/türleri
T4	: Tiroksin
TAS	: Total antioksidan status
TOS	: Total oksidan status
TSH	: Tiroid stimulan hormon
TV-USG	: Transvaginal ultrasonografi
VKİ	: Vücut kitle indeksi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µl	: Mikrolitre

TEŞEKKÜR

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince bizleri yetiştirmek için büyük çaba sarf eden, bilgilerini ve mesleki deneyimlerini bizimle paylaşan, daima saygı duyarak özlemle hatırlayacağım değerli hocalarım; Prof. Dr. Yakup KUMTEPE, Prof. Dr. Bünyamin BÖREKÇİ, Prof. Dr. Metin İNGEÇ, Prof. Dr. Ragıp Atakan AL, Doç. Dr. Ömer Erkan YAPÇA, Dr. Öğr. Üyesi Emsal Pınar TOPDAĞI YILMAZ, Dr. Öğr. Üyesi Gamze Nur CİMİLLİ ŞENOCAK'a,

Eğitimim süresince ve ayrıca tezimi hazırlamamda, bilgi ve deneyimi ile her türlü yardımda bulunan, aynı zamanda bize gösterdiği ilgi ve desteği her zaman hatırlayacağım kıymetli tez danışman hocam Prof. Dr. Bünyamin BÖREKÇİ'ye,

Tezimin verilerinin biyokimya laboratuvarında kitlerle çalışılması ve istatistiksel değerlendirmesinde her zaman hoş görülü şekilde ve büyük yardımseverlikle bana yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan sevgili Dr. Nezahat ÖZKAN KURT'a,

Tezimin verilerinin toplanmasına yardımcı olan Embriyoloji laboratuvar sorumlusu Öğr. Gör. Müge Şentürk ve Öğr. Gör. İlhan ÖZDEMİR'e

Asistanlığım süresince omuz omuza çalıştığım ve en zor zamanlarımı paylaştığım, severek ve özleyerek hatırlayacağım sevgili asistan arkadaşlarıma;

Kliniği aile ortamına çeviren, birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım ve hep destek gördüğüm tüm hemşire, ebe ve sağlık personeli arkadaşlarıma,

Bana her zaman destek olup, uzakta da olsalar yanımdaymış gibi sevgilerini hep hissettiren canım annem, babam ve kız kardeşim Dr. Nilay KAYA'ya,

Ve bu süreçte yanımda olduğu için çok şanslı olduğum eski kıdemlim, hayat arkadaşım ve sevgili eşim, Dr. Öğr. Üyesi Yunus Emre TOPDAĞI'na,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER EDERİM.

ERZURUM - 2018

Dr. Seray Kaya TOPDAĞI

ÖZET

Tekrarlayan Başarısız İntrauterin İnseminasyonu (IUI) Takiben Bakılan İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Sikluslarında Folliküler Sıvıda Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi ve Klinik Gebelikle Korelasyonunun Araştırılması

Giriş ve Amaç: Açıklanamayan infertilite, 1 yıl korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edemeyen çiftlerde yapılan temel değerlendirmede herhangi bir patolojiye rastlanmaması olarak tanımlanmaktadır. Kliniğimizde açıklanamayan infertilitesi olan ve en az 2 kez IUI (Intra Uterin İnseminasyon) yapılmasına rağmen gebelik durumu oluşmamış 200 hastaya IVF/ICSI tedavi protokolü başlandı. Bu hastalardan yumurta toplama işlemi (Oosit-Pick-Up; OPU) esnasında atık folliküler sıvılarından örnek alındı. Bu sıvılarda Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeks (OSI) düzeylerine bakıldı. Bu parametrelere bakarak açıklanamayan infertilite nedenlerinden olarak görülen reaktif oksijen türevi (ROS) maruziyetinin gebelik ve embriyo üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metod: 2018 yılı içerisinde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran; 20-44 yaş aralığında açıklanamayan infertilitesi olup, tekrarlayan IUI başarısızlıkları olan ve IVF/ICSI tedavisi başlanan 200 hasta çalışmaya alındı. Bu hastaların OPU günlerinde toplanan, embriyologlar tarafından oositi ayrıştırılmış olan atık folikül sıvısı örneklerinden bir miktar alıp daha sonra TAS ve TOS kitleriyle biyokimya laboratuvarında çalışılıp TAS, TOS, OSI değerleri ölçüldü. Aynı zamanda bu hastaların yaş, bazal hormonlar, HbA1c (Glikozillenmiş hemoglobin), kortizol, tiroid fonksiton testi, AMH (Anti Müllerian Hormon) değerleriyle birlikte meslek, VKİ (Vücut Kitle İndeksi), sigara kullanımı gibi özellikleri de kayıt edildi.

Bulgular: Çalışılan 200 hastada gebelik durumu açısından baktığımızda hem biyokimyasal gebelik hem klinik gebelik oluşan hastalarda folliküler TOS ve OSI değerleri anlamlı olarak farklı bulunmazken TAS değerleri ise gebelik durumu olanlarda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Embriyo kalitelerine bakıldığında ise Grade 1 ve Grade 2 embriyolar arasında foliküler sıvı TAS, TOS ve OSI seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken Grade 1 embriyo transferi yapılan hastalarda

gebelik oranları anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). Sigara kullanan hastalarda da folliküler sıvı TAS değeri kullanamayanlara göre anlamlı olarak düşükken; TOS ve OSI değerleri ise anlamlı olarak yüksek bulundu.

Sonuç: Açıklanamayan infertilitede altta yatan nedenleri bulmak için daha geniş hasta grubuyla çalışarak; daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç olduğu görülse de oksidatif stres maruziyetinin infertilite etkeni olup; ROS 'ların folliküler sıvıda OSI'ini artırarak TAS seviyelerini düşürdüğü ve bu yüzden antioksidan takviyesine duyulabileceği olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Açıklanamayn İnfertilite, Folliküler sıvı, ROS (Reaktif Oksijen Türevi), TAS (Total Antioksidan Status), TOS (Total Oksidan Status), OSI (Oksidatif Stres İndeksi)

ABSTRACT

Determination of Total Oxidant and Antioxidant Levels in Follicular Fluid in In Vitro Fertilization Cycles Following Recurrent Failed Intrauterine Insemination and Investigation of Correlation with Clinical Pregnancy

Introduction and Aim: Unexplained infertility is defined as the absence of any pathology in the basic evaluation performed in couples who cannot achieve pregnancy after 1 year of unprotected sexual intercourse. In Atatürk University Medical Faculty Hospital Gynecology and Obstetrics Clinic, in vitro fertilization (IVF)/intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment protocol was started in 200 patients with unexplained infertility who could not get pregnant despite at least two intrauterine inseminations (IUIs). The samples were taken from waste follicular fluids during oocyte collection from these patients (Oocyte-Pick-Up; OPU). Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), and oxidative stress index (OSI) levels were examined in these fluids. The aim of this study was to investigate the effects of reactive oxygen species (ROS) on pregnancy and embryos.

Materials and Methods: This study included 200 patients, aged between 20–44 years, admitted to Atatürk University Medical Faculty Hospital Gynecology and Obstetrics Clinic in 2018 with unexplained infertility, who had recurrent IUI failures and hence started IVF/ICSI treatment. Some amounts of waste follicular fluid samples were collected by embryologists from oocytes of these patients during the OPU procedure. Then, TAS, TOS, and OSI values were calculated in the biochemistry laboratory. At the same time, the age; basal hormone, glycosylated hemoglobin, cortisol, thyroid function test and anti-Mullerian hormone levels; and characteristics such as job, body mass index, and smoking habit of patients were also recorded.

Results: In terms of pregnancy status in 200 patients, both follicular TOS and OSI values were not significantly different in patients with biochemical pregnancy and clinical pregnancy, whereas TAS values were significantly higher in patients with pregnancy ($p < 0.05$). In terms of embryo quality, no significant difference was observed in TAS, TOS, and OSI values between Grade 1 and Grade 2 embryos,

whereas pregnancy rates were significantly higher in patients who received Grade 1 embryo transfer ($p < 0.05$). However, the follicular fluid TAS levels were significantly lower in smoking patients than in those who did not smoke; TOS and OSI levels were significantly higher.

Conclusions: This study showed that exposure to oxidative stress might be a causative factor for infertility. Also, ROS decreased the level of TAS by increasing OSI in the follicular fluid and therefore antioxidant supplementation might be a necessity. However, more prospective studies on a wider group of patients are needed to find the underlying causes of unexplained infertility.

Key words: Follicular fluid, OSI (oxidative stress index), ROS (reactive oxygen species), TAS (total antioxidant status), TOS (total oxidant status), unexplained infertility.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1 yıl boyunca düzenli ve korunmasız cinsel ilişki olmasına rağmen gebe kalamama durumu olarak tanımlanır. Çiftlerin yaklaşık %80-85'inde bu süre içinde gebelik oluşurken, %15'inde ise gebelik elde edilemez (1). Kadınlarda yaşa bağlı olarak fertilitede azalma gözlenir, bu yüzden 35 yaş üzerindeki hastalarda 6 aylık sürede gebelik oluşmazsa infertilite tanısı konur ve tedavi sürecine geçilir. Eğer hasta 40 yaş üstüyse ve hastada geçirilmiş pelvik cerrahi öyküsü, oligomenore, kemo-radyoterapi öyküsü, erkek subfertilite öyküsü, geçirilmiş şüpheli utero-tubo-peritoneal hastalık öyküsü vb. durumları mevcutsa 6 ay beklenmeden tedaviye hemen başlanmalıdır (2).

1 yıl korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilemeyen çiftlerde yapılan analizlerde herhangi bir patolojiye rastlanmaması durumuna açıklanamayan infertilite denir. Ultrasonografik değerlendirme over ve uterusu bağlı patolojileri saptamada önemli role sahiptir. (3).

İnfertilitenin sebeplerini araştıran testlere bakılırsa çiftlerin neredeyse %15'inde herhangi bir sebbep bulunamamaktadır. Açıklanamayan infertilitede prevalansı %22-28 arasında değişmektedir. İnfertil çiftlerde yapılan bir çalışmada; 35 yaş altında %21 ve 35 yaş üstünde ise prevalansın %26 olduğu ortaya konmuştur (4). Etiyolojisi ise; oldukça karmaşıktır. İnfertilite ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz spermatozoanın fertilizasyon profili ve zona pellusida penetrasyonu ile ilgili spesifik testlerin bulunmaması da açıklanamayan infertilite tanısının artmasına neden olmuştur.

Servikal patolojiler, transport ile ilgili sorunlar, hafif ovulatuvar disfonksiyon, embriyonun implantasyonunda başarısızlık, endometriozis, folikülün rüptüre olmadığı (LUF), antioksidan dengesizliği, artmış peritoneal makrofaj aktivitesi, sperm-oosit ya da zona pellusidaya karşı gelişen antikorların oluşması durumları açıklanamayan infertilite nedenleri arasındadır ve bu konuda daha çok prospektif çalışma yapılmalıdır.

Temel infertilite değerlendirmesinde yer alması gereken tetkikler; Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre belirlenen semen analizi, ovulasyonu tespit

eden testler, ovaryan rezervin ultrasonografik antral folikül sayımı ile değerlendirilmesi ve östrojen (E2) seviyesi ölçümü, klomifen sitrat testi, ve HSG'yi içerir (5).

Açıklanamayan infertilitede rutin olaral laparoskopi (L/S) işlemi yapılması uygun değildir. ASRM kriterlerine göre laparoskopi işlemi; klinik semptomları da olan şiddetli endometriozis ve adhezyonlara bağlı tubal patolojilerden şüphelenilen hastalarda klinisyen gerekli görürse öncelikli olarak yapılması gerekebilir. (3, 6). Açıklanamayan infertilite tedavisinde ; çift olarak değerlendirilen ve spesifik durumlarına göre hastalara en alt basamaktan tedaviye başlanıp, son olarak tekrarlayan IUI başarısızlığı (en az 2 kez denenmiş) varsa, bu hastalara hemen IVF/ICSI tedavisi siklusu başlanır (6).

Organizmada fizyolojik olarak oluşan ve yüksek derecede reaktif, ancak unstabil olan serbest radikallerin oluşması ve bunların antioksidan mekanizmalarla kaldırılması her zaman denge içindedir. Oksidatif stres (OS) bu dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır (7). Fizyolojik dozda serbest radikaller ovulasyon, folikülogenez, oosit maturasyonu, implantasyon ve embriyo gelişiminde önemli etkilere sahiptir. Kadın infertilitesine bakacak olursak; endometriozis, polikistik over sendromu ve açıklanamayan infertilite patogenezinde serbest radikal üretiminin ileri düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu gruptaki hastalara antioksidan ajanların oral ya da intravenöz uygulanması yada in vitro fertilizasyon planlanan hastalarda kültür mediumlarına antioksidan maddelerin ilave edilmesi hastalarda fertilitte başarısını ve yardımcı üreme tekniklerinin etkinliğini arttırabileceğini kanıtlayan çalışmalar mevcuttur.

Gebelik sonuçlarını artırmak için oosit, sperm ve embriyonun en az hasara uğraması için bir çok yeni teknik geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanları in vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) prosedürüdür. Oksidatif stres IVF başarısında oldukça önemli bir faktördür. Oosit ve granuloza hücreleri birbirleriyle korele olarak çalışır. Granuloza hücreleri oositin gelişimi-matürasyonu, fertilizasyon için faydalı olup; antioksidanları üreterek oositi oksidatif stresin arttırdığı apoptozisten korurlar. Oosit folliküler sıvı çevresinde gelişir. Folliküler sıvı, oosit kalitesini, sperm ile etkileşime kabiliyetini, embriyonun

implantasyonu ve embriyonik gelişimini oldukça etkiler. Folliküler sıvıda antioksidanlar az olursa veya yokluğunda; ROT (Reaktif Oksijen Türleri) seviyelerinde artışa neden olur. Yapılan son çalışmalarda, folliküler sıvı ve granüloza hücreleri oositin kalitesini ve aktivitesini oldukça fazla etkilediğinden, folikül sıvı içeriğinin incelenmesi ile elde edilen sonuçlar, açıklanamayan infertilite etyolojisine ışık tutmakla birlikte , IVF/ICSI başarısını tespit etmede kullanılabilir (8, 9, 10, 11).

Kliniğimizde yaptığımız çalışmaya; Ocak 2018 - Ağustos 2018 tarihleri arasında, infertilite polikliniğimize başvuran; 20-44 yaş aralığında açıklanamayan infertilitesi olup, tekrarlayan IUI başarısızlıkları olan ve IVF/ICSI tedavisi başlanan 200 hasta alındı. Yapılan bu prospektif çalışmada amacımız:

1. Yumurta toplama işlemi (OPU-Oocyte pick-up) esnasında toplanan yumurtalardan arta kalan ATIK follikül sıvılarındaki total antioksidan status (TAS), total oksidan status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeks (OSI) düzeylerini ölçmek ve bununla birlikte hastaların yaş, hormon, ek hastalık, embriyo transfer süreci ve sonrasındaki bir takım parametrelere de bakarak karşılaştırma yapmak.

2. Baktığımız bu parametrelerde biyokimyasal/klinik gebelikle sonuçlanan ve sonuçlanmayan iki hasta grubu içerisinde anlamlı bir fark olup olmayacağını değerlendirmek.

3. Eğer anlamlı bir sonuç elde edersek oksidatif strese maruz kalmış hasta grubunun tedavisinde kullanılabilecek antioksidan tedavinin, tüp bebek tedavisindeki başarı şansı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite terimi korunmasız, düzenli ilişkiye rağmen; 1 yıl içinde ovulasyon testleri, tubal patolojileri ve erkek infertilitesine yönelik sperm analizi vs. değerlendirilen tetkiklerinde herhangi bir anormal bulgu saptanmayan olgularda tanımlanan durumdur. İnfertilite reproduktif çağıdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir (12, 13).

Normal şartlar altında çiftlerin %85'i ilk yıl gebe kalabilmektedir. Bu süre içinde incelemeyi derinleştirmek doğru değildir; çünkü yanlış pozitif test sonuçları yüzünden hastalar boşu boşuna ileri tetkik yaptırıp bu süre içinde spontan gebelik şansı varsa da kaçırabilirler. 1 yılı beklemeyen araştırılması gereken çiftler:

1. 35 yaş üzeri kadınlar.
2. Oligo/amenoreesi olan ya da disfonksiyonel uterin kanaması olanlar
3. Uterin, tubal patoloji ya da şiddetli semptomları olan endometriozisli kadınlar.
4. Cerrahi geçiren kadınlar.
5. Spermogramda anormal bulguları olan erkekler.
6. Cerrahi öyküsü olan ve genital patoloji tespit edilen erkekler.
7. Daha önce cinsel hastalık geçirme öyküsü olan erkekler.

Açıklanamayan infertiliteye yol açan potansiyel faktörler:

Tubalarda patoloji, ovulasyon bozuklukları, korpus luteum yetmezliği ve implantasyon anomalileri infertiliteye sebep olabilir. Son zamanlarda erken evre minimal endometriozis de açıklanamayan infertilite nedenleri arasındadır.

2.2. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

2.2.1. Jinekolog Açısından Erkek infertilitesinin Değerlendirilmesi

İnfertil bir erkek değerlendirilmesi yapılırken ilk önce yapılacak işlem; 4 - 6 hafta ara ile 2 ya da daha fazla semen örneğinin incelenmesidir. Dikkat edilmesi

gereken, semenin ortalama 4-5 günlük cinsel ilişkisiz dönem sonrası alınmalı ve ortalama 1 saatte değerlendirilmelidir.

İnfertil çiftler için ilk araştırmalarda, infertil hastaların neredeyse %50 sinde anormal olan semen analizi bulunmuştur. Bu, kadın hastanın tetkikleri ile eş zamanlı yapılır.

<u>Parametre</u>	<u>WHO 1999</u>	<u>WHO 2010</u>
1. Miktar (volüm)	2.0 ml	1.5
2. ph	≥7.2	≥7.2
3. ml de sperm sayısı (konsantrasyon)	≥20 milyon/ml	≥15 milyon/ml
4. Total sperm sayısı	≥40 milyon/ml	≥39 milyon/ml
5. Hareketlilik (motilite)	%50 (a+b)	%40(PR+NP**) %32 PR*
6. Şekil (morfoloji)	≥%14	≥%4
7. Canlılık (viability)	≥%50	≥58
8. Lökosit (iltihap hücresi)	≤1 milyon/ml	≤1 milyon/ml

Şekil 1. 2010 WHO Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen kitabındaki referans değerler

WHO kriterlerine göre eğer örnekteki parametreler normale tek test yeterlidir. Fakat, iki veya üzeri yapılan örneklemede anormal bulgu varsa, bu hasta için üroloji kliniğinden konsültasyon istenir. Değerlendirmede pretestiküler, testiküler ve posttestiküler infertiliteye sebep olabilecek nedenler araştırılmalı ve gerekiyorsa ultrasonografik, endokrinolojik, genetik testler ve en son aşamada biyopsiye başvurulmalıdır. Tüm bunlardan sonra, infertilitenin medikal ya da cerrahi girişimlerle ile iyileştirilemeyeceği anlaşılırsa IUI ya da YÜT kullanılacak hastaların belirlenmesi ve eğer gebelik olursa fetüsü etkileyecek genetik anormalliklerin belirlenmesi için oldukça aydınlatıcı olacaktır.

Oligozoospermi (mL de 20 milyonun altındaki spermatozoa sayısı), teratozoospermi (<%4 normal form) ve astenozoospermi (<%50 motil spermatozoa) ayrımının yapılması gerekir. Sıklıkla her üç patoloji de, oligo-asteno teratozoospermi sendromu olarak adlandırılır. Azospermide (standart mikroskopik incelemede sperm olmaması durumu) olduğu gibi, şiddetli OAT sendromu durumunda da (mL de 1

milyonun altında spermatozoa olması), genetik bozukluk oranında ve genital sistemin tıkanıklık sıklığında artış tespit edilmiştir.

Erkek infertilite nedenlerini anatomik olarak 3'e ayırırsak ; (18)

- 1) Pretestiküler nedenler:** Kromozomal bozukluklar, endokrin patolojiler, hipogonadotropik hipogonadizm, ejakulasyonda yetersizlik.
- 2) Testiküler nedenler:** Konjenital problemler (inmemiş testis, vas deferens yokluğu), infeksiyon , antispermatojenik ilaçlar (kemoterapi, x-ray), vasküler (torsiyon, varikosel), tümörler , immünolojik, idiyopatik.
- 3) Posttestiküler sebepler:** Obstruktif durumlar (vazal, epididimal) ve bezlerde infeksiyon.

2.2.2. Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Kadın infertilitesinde sıklık ve dağılım:

- Ovulatuvar fonksiyon bozuklukları ~%40
- Tubal patolojiler ~%40
- Nadir durumlar (serviks ve uterusda görülebilen patolojiler) ~%10
- Sebebi belli olmayan infertilite ~%10

İlk değerlendirmeyi anamnez ve fizik muayene oluşturmaktadır.

Anamnez: infertilite süresi, kullanılan kontrasepsiyon methodları, sistemik hastalıklar, daha önceki gebelikler, menstruel düzensizlikler, seksüel öykü, koitus sıklığı, geçirilmiş batin operasyonları, erken menopoza öyküsü, sigara kullanımı, tiroid ve diğer endokrin fonksiyon bozuklukları, alkol veya ilaç bağımlılığı, pelvik ağrı, şiddetli adet ağrısı, normal olmayan smear sonuçları, genetik araştırma açısından anomalili bebek hikayesi araştırılmalıdır.

Fizik Muayene: Vücut kitle indeksi (VKİ) saptanmalıdır (normal VKİ: 20-25 kg/m²). Pelvik muayene yapılmalı ve spekulum muayenesi ile vajen ve serviks anatomisi değerlendirilmelidir. Vagina (hymen imperforatus, septum, Mayer-Rokitansky-Küstner-Hauser sendromu: primer amenorenin en sık sebebi; vajinanın konjenital yokluğu açısından) ve serviks (akıntı, servikal lezyonlar, konjenital servikal

lezyonlar açısından) açıkça ortaya konmalıdır. Rektovaginal tetkik gerekirse yapılabilir (19).

Tetkikler: En iyi tanısal araçlar yüksek tanısal güvenilirlik ve duyarlılığa sahip, ucuz ve minimal invaziv olanlardır. İleri yaştaki kadınlarda (özellikle 35 yaş üstü) yaklaşım, daha genç olanlardan farklıdır. Bu hastaların azalmış ovaryan rezerve bağlı fertilité şansları oldukça düşüktür. Bu hastalara zaman kaybetmeden hızlıca YÜT tedavileri başlamak gerekebilir.

Ovulasyonun Değerlendirilmesi

Ovulasyonda kullanılan testler direkt ya da indirekt olarak 2 ye ayrılır: Direkt yöntemler; ovulasyonu direkt olarak gördüğümüz USG ve laparoskopidir. İndirekt yöntemler ise; ovulasyonla beraber ortaya çıkan faktörlerdir. İndirekt testler: Bazal vücut ısısı takibi (progesteronun termojenik etkisi ile midluteal fazda vücut ısısının 0.5°C yükselmesi), östrojen ve LH ölçümü, luteal fazın ortasında progesteronun ölçümü (adet gününden 1 hafta önce yapılması uygundur ve 3 ng/ml'nin üzerindeki değerler ovulasyonun olduğunu gösterir) ve son olarak endometrial örneklemedir (20).

Menstüral Öykü

Aylık düzenli menstruel kanama gören mittelschmerz (yumurtlama ağrısı) tarifleyen ve huzursuz edici semptomları olan (şişkinlik, baş ağrısı ve memelerde duyarlılık gibi) kadınlar tipik olarak ovulatuardır. Kesin kanıtlanmış disfonksiyonel uterin kanama, oligomenore (siklus uzunluğu 35 günden fazla olan) veya amenoresi olan hastalar tipik olarak anovulatar ve oligoovulatuardır.

Seri Transvajinal Ultrason

Dominant folikülün büyümesini göstermek ve ovulatar folikülün kollabe olduğunun izlenmesi oldukça önemli olup; douglasta mayi görülmesi ve net olarak belirlenmiş foliküler sınırın kaybı ile internal ekojenitelerin izlenmesi ile ovulasyon ve luteinizasyon için oldukça iyi kanıtlardır. Fakat bu metot pahalıdır ve öncelikle luteinize rüptüre olmamış folikül sendromu (LUF) olan hastalarda kullanılmalıdır.

LUF; LH piki ve granülosa hücrelerinin luteinizasyonuna rağmen, folikül duvarı rüptüre olmayıp oosit folikül içinde hapsediğinde gerçekleşir. İnfertilitenin çözümü en zor sebeplerindendir (21). LUF'un; açıklanamayan infertilite ve

prostaglandin sentezini inhibe eden indometazin gibi non steroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (22, 23).

Bazal Vücut Sıcaklığı (BBT)

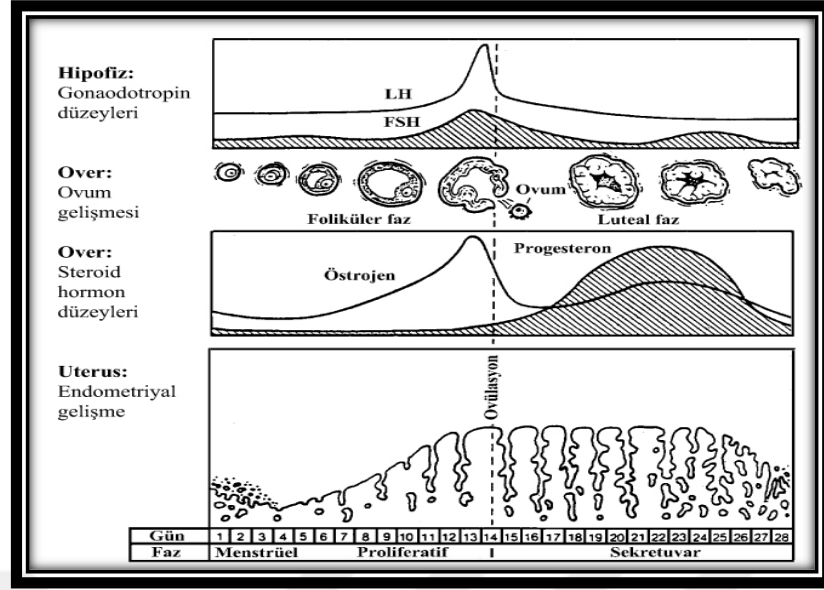
BBT’da değişiklik ovulasyonun gerçekleştiğini belgelemenin ucuz ve basit bir yolu olup progesteronun bazal sıcaklık üzerindeki biyolojik etkisine bağlıdır. Bu durum, over tarafından üretilen progesteronun termojenik etkisine bağlıdır ki, hipotalamik set point’te yaklaşık 0. 4-0. 8 F yükselme yapar. BBT, sabah uyanırken ve kalkmadan önce ölçülür. BBT sıklıkla 97 F’den 98 F’a ve luteal faza ilerledikçe 98 F’ın üzerine çıkar. BBT’de en önemli değişiklik serum progesteron seviyeleri 5 ng/ml veya üzerine çıktığında gerçekleşir. Ovulasyonu değerlendirmede sık kullanılsa da kesin bir yöntem değildir. (24, 25, 26)

Serum Progesteron Düzeyi

Kanda serum progesteron seviyesi foliküler fazda genellikle 1 ng/ml’nin altındadır, LH surge’ünün (yükselmeye başlaması) başlangıcından sonraki 12 saat içinde artmaya başlar ve ovulasyondan yaklaşık 7 ile 8 gün sonra pik yapar. 3ng/ml’lik serum progesteron seviyesi ovulasyonun gerçekleşmiş olabileceğini düşündürür (27). Ovulasyonun tespiti için en uygun zaman mid luteal fazda, pik yaptığı dönemdir. Mid-geç luteal fazda progesteron salınımı epizodik olup pulsatil LH salınımı ile koreledir. Ayrıca doğal sıkluslarda, 10 ng/ml’nin üzerindeki progesteron konsantrasyonları, 10 ng/ml’nin altındaki progesteron seviyelerine göre daha yüksek gebelik oranı ile ilişkilendirilmiştir (28).

Üriner Luteinizan Hormon (LH)

Midsiklus yaklaştıkça, dominant folikülden kaynaklanan östrojen (E2) yüksekliği, LH pikini başlatan durumdur. Ovulasyon tipik olarak LH pikinin başlamasından 34-36 saat sonra gerçekleşir. LH’nın yükselmeye başlaması, pikinin gerçekleşmesi yakın ovulasyonun en güvenilir göstergesidir (29). LH kısa yarı ömürlüdür, hemen idrarla atılır ve ovulasyonun hesaplanmasında test olarak kullanılır. Tüm bireylerde yapılabilen bu testlerin kitleri (ovulasyon veya LH öngörme kitleri) idrarda LH ölçümüne dayanır. İlk pozitif testten sonraki gün genellikle cinsel birliktelik veya IUI planlamanın yapılması en uygun zamanıdır.



Şekil 2. Menstrüel siklustaki hormonal değişiklikler

Speroff L, Fritz MA, İnfertilite. İç: Erk A, Günalp S, editörler; Klinik Jinekolojik Endokrinoloji Ve İnfertilite. Ankara-İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri; 2007.s.1013- 1274.

Endometrial Biyopsi

Ovulasyondan sonra korpus luteum tarafından salınan progesteron, endometriumda sekretuar transformasyona sebep olur. Daha sık olarak geç luteal dönemde alınan endometrial biyopside görülen sekretuar histoloji; ovulasyonu gösterir (30).

2.2.3. İleri Değerlendirme

Anovulatuvar olduğu ya da ovulasyon disfonksiyonu olduğu anlaşılan hastalarda ileri tetkiklere de ihtiyaç vardır. Anamnez, fizik muayene, Folikül Stümüle eden Hormon (FSH), Tiroid Stimüle eden Hormon (TSH) ve Prolaktin (PRL) değerlerinin bakılması amenorenin en sık nedenlerini tesbit eder. Amenorenin en sık 4 sebebine bakarsak; 1. Polikistik Over Sendromu 2. Hipotalamik amenore 3. Hiperprolaktinemi 4. Overyan yetmezlik Overyan rezervin siklusun 3. günü FSH veya Klomifen Sitrat Challenge testi ile belirlenmesi, 35 yaş üstü, tek overi olan veya ovaryan cerrahi, eksojen gonadotropinlere zayıf yanıt, kemoterapötikler veya iyonizan radyasyona maruziyet ve açıklanamayan infertilite öyküsü olan kadınlarda önemli prognostik bilgiler sağlayabilir.

Transvajinal ultrason (TVUSG)'da görülen küçük antral foliküllerin sayısı gonadotropinlere ovaryan yanıt ile doğrudan ilişkili görünmektedir (31, 32). Serum

FSH, İnhibinB ve Estradiol (E2) gibi erken foliküler faz markerlerinden farklı olarak Müllerian İnhibiting Substance (MIS)/Anti Müllerian Hormon (AMH) serum seviyeleri potansiyel avantajlar sunar: 1) AMH, yaşla en erken değişen markerdir. 2) Siklus içi değişkendiği en az olandır. 3) Siklusun herhangi bir günü bilgilendirici olabilir (33).

2.2.3.1. Anatomik Faktörlerin Değerlendirilmesi

a. Servikal Faktörlerin Değerlendirilmesi

Servikal mukus incelemesi, post koital test (Sims Hauser testi) ve anti sperm antikorların araştırılması günümüzde oldukça kısıtlı olarak kullanılmaktadır. Bu test servikal mukusun reseptivitesini ve spermelerin yeterliliği belirlemek üzere önerilmekle beraber rutin infertilite tetkiklerinde kullanılması önerilmemektedir. (34).

b. Tubal Faktörlerin Değerlendirilmesi

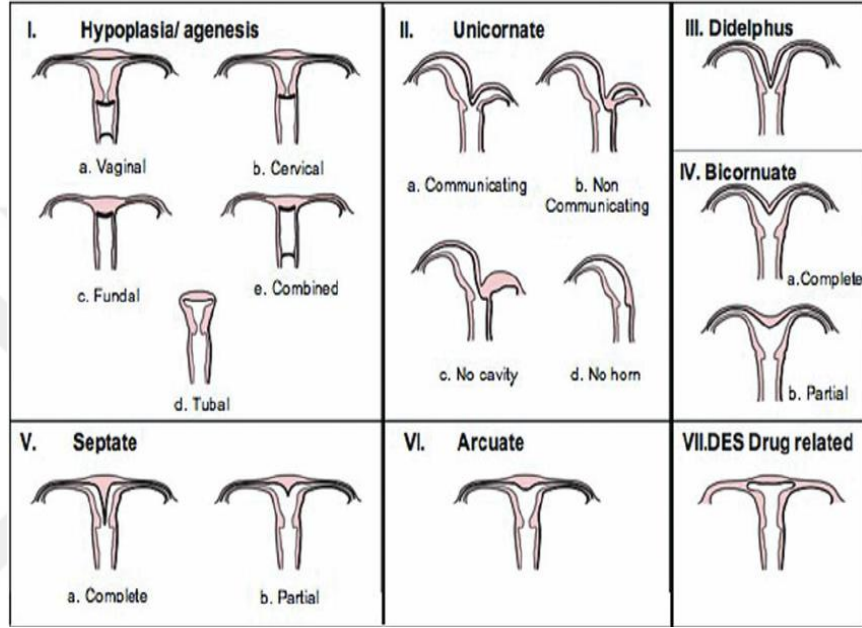
Tuboperitoneal faktörler (enfeksiyon sonrası tubal hasar, tubal obstrüksiyon ve pelvik adhezyonlar) infertilitenin belirlenebilen en sık sebebidir. Özellikle pelvik inflamatuvar hastalık (PID) tubal hasarın majör sebebidir. PID hastalarının %50'den fazlasına Chlamydia Trachomatis'in etken olduğu gösterilmiştir (35). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, distal tubal hastalıklarda patoloji eğer hafif ise laparoskopik cerrahi sonrası gebelik oranlarının %40-50 oranında artabileceği görülmüştür. Fakat şiddetli distal tubal hasarı olan hastalarda en uygun tedavi IVF olmalıdır. IVF başarısı bu hastalarda cerrahi tedavinin %10-35'lik başarısına göre anlamlı olarak yüksektir. Bu hastalarda spontan gebelik oluşursa bu gebeliğin ektopik gebelik olma ihtimali daha yüksektir (36).

Histerosalpingografi (HSG)

HSG çekimi; genelde menstrüel kanamadan 2 -5 gün sonra yapılır. Böylece erken gebelik ihtimali dışlanır. Fakat % 1 enfeksiyon oluşabilir. Servikal ostan girilerek uterin kavite içine radyoopak bir madde verilir ve buradan fallop tüplerine geçiş izlenir. Bu esnada fluoroskopi altında görüntüler kaydedilir. HSG, uterin kavite ve tubal potensi değerlendirmede oldukça yararlıdır. HSG uterusun dış yapısını tespit edemez ve septum ya da bicornuate uterusu güvenilir olarak ayırt edemez, fakat; en sık karşılaşılan submüköz myom, endometrial polip ve intrauterin adhezyonlar gibi

anormallikler için yeterli görüntü sağlar. Fundal leiomyomlar ise, HSG’de bikornuat uterusu taklit edebilirler (38).

HSG çekiminde uterovajinal anomalileri tesbit edebilmek mümkündür. Müllerian kanal anomalilerinde en çok kullanılan sınıflandırma, Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (American Society for Reproductive Medicine; ASRM) tarafından önerilen sınıflandırma sistemidir (37).



Şekil 3. The classification system of Mullerian duct anomalies used by the American Fertility Society.

Klamidya Antikor Testi (CAT)

Tubal patolojilerin büyük bir kısmı Klamidya enfeksiyonuna bağlıdır ve serumda Klamidya antikor testi (CAT), tubal infertilite için bir tarama testi olarak kullanılmaktadır. Amaç, ucuz ve non-invaziv olmakla birlikte L/S’ye en uygun hasta grubunu seçmektir.

Laparoskopi (L/S)

Laparoskopi, invaziv ve pahalı bir işlem olup özellikle HSG’si normal olan çiftlerde genellikle infertil çiftin tedavisini değiştirmez. L/S bize hem tanı hem tedavi olanakları sağlar. Dilüe indigo karmin veya metilen mavisi ile yapılan ‘kromotübasyon’ ve laparaskopi, tubal potansi veya tubal obstrüksiyonu göstermek için var olan en iyi testtir. HSG ile kıyaslandığında endometriozis, pelvik/peritubal adezyonlar, ve tubal patoloji de dahil olmak üzere pelvis hakkında oldukça bilgi sunar.

Genellikle semptomatik endometriozisi olan ve HSG’de tedavi edilebilen tubal obstrüksiyon gibi tubal hastalık olduğunu düşündüren hastalarda özellikle IVF geçerli bir alternatif olmazsa; L/S yapılır.

c. Uterin Faktörlerin Değerlendirilmesi

Histerosalpengografi (HSG)

Sonohisterografi (SHG)

Steril su veya salin uygulanmasını takiben (Salin İnfüzyon Sonografi/SİS), TVUSG eşliğinde yapılan işlemde, kavitenin büyüklüğü ve şekli görülür; ayrıca submüköz myomlar, polipler ve sineşi tanısı için oldukça duyarlıdır. 3-D USG ile kombine edilerek görüntü sağlandığında gelişimsel uterin anomali tanısında magnetik rezonans görüntüleme (MRI) ile kıyaslanabilecek tanısal doğruluğa sahiptir (39).

Histereskopi (H/S)

Uterin kavitenin değerlendirilmesi ve ilgili anormalliklerin tanısında definitif bir metottur. Ameliyathane şartlarında histereskopi oldukça pahalı ve invaziv bir yöntem olduğundan genellikle daha az invaziv yöntemlerle tanısı konmuş anormalliklerin tedavisi ve ileri değerlendirme için kullanılır. Küçük çaplı (<3. 4 mm) fleksible H/S lar ve distansiyon için salin veya CO2 kullanılarak yapılan Office H/S günümüzde ulaşılabilir ve uterusun çabuk ve etkin değerlendirilmesi açısından hasta için de hekim için de konfor sağlar.

Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRI)

Pelvik anatomiye değerlendirirken 3 boyutta ayrıntılı bir görüş sağlar ve dokuları karakterize edebilme yetisine sahiptir. Müllerian anomalilerin değerlendirilmesini sağlar ve çoğu vakada adenomyom ve fibrinoidlerin ayrımı yapılabilir.

Hastalarda infertilitenin nedenlerini bahsettiğimiz yollarla araştırıp nedeni bulunabilirse tedaviye yönelik plan yapılır. Tüm patolojiler dışlandıktan sonra eğer neden açıklanamıyorsa o zaman açıklanamayan infertilite tanısıyla hastalara uygun yardımcı üreme teknikleri (YÜT/ART) uygulanması planlanır.

2.2.3.2. Açıklanamayan İnfertilite ve Minimal Endometriozis

Açıklanamayan infertilitede minimal endometriozis (%10) olduğunu düşünen otörler var. Bu gruptaki hastalar KOH+IUI'nın majör endikasyonlarından biridir. National Institute of Clinical Excellence (NICE) klavuzuna göre açıklanamayan infertilite tanısı alan çiftlerin tamamına IVF gibi ART tedavilerinden önce IUI önerilmelidir (40).

2.3. Açıklanamayan İnfertilite Tanısı Alan Hastalarda Tedavi Yönetimi

Açıklanamayan infertilite tanısı alan hastalarda öncelikle en alt basamaktan başlayıp sonucun olumsuz olması durumunda daha kapsamlı yardımcı üreme teknolojilerine ilerlemek şeklinde olmalıdır. İlk olarak uygulanacak olan bekleyerek tedaviden sonuç alınmadığında, bir sonraki basamak olan klomifen sitrat (KS) ve beraberinde IUI kombinasyonu ya da gonadotropinlerin kullanıldığı kontrollü over hiperstimulasyon (KOH) ve beraberinde IUI eklenmesidir. Ancak bütün bu tedaviler başarısız olursa o zaman IVF tedavisine geçilmesidir (41).

Açıklanamayan infertilitede tedavi yaklaşımı konusunda ASRM nin 1998 yılında yaptığı çalışma kilometre taşı olarak kabul edilebilir (15). Sonuçlara göre, bu hastalarda tercihen ilk yaklaşım KS'in IUI ile birlikte yapılmasıdır. Eğer başarısız olunursa KOH/IUI ve IVF uygulamaları bir sonraki adım olabilir (42,43).

2.3.1. Açıklanamayan İnfertilitenin Bekleyerek (Ekspektan) Tedavisi

Spontan gebe kalma oranı, açıklanamayan infertilite tanısı almış çiftler seçilerek yapılmış kapsamlı bir çok araştırmada, oldukça yüksek bulunmuştur (6, 15).

İnfertil çiftlerin çoğu her ay ortalama olarak %1-4 oranında spontan gebe kalabilmektedir. Yaşı daha genç olan ve infertilite süresi daha kısa olan açıklanamayan infertil çiftlerde spontan gebelik ihtimali daha yüksektir. Eğer çift 2 yıldır infertilse ve hastanın yaşı 35 yaş üzerinde ise tedavinin daha agresif olması gerekir (41, 44).

2.3.2. Açıklanamayan İnfertilitenin Tek Başına KS veya Tek Başına IUI Tedavisi

Cochrane analizinin sonuçlarına göre açıklanamayan infertilitede KS' ın tek başına kullanılması klinik gebelik başarısını arttırmamaktadır (45). Başka bir çalışmada ise açıklanamayan infertilitesi olan hastalara sadece KS, sadece IUI veya ekspektan tedavi uygulanmış ve sonuçta KS'ın tek uygulanması ya da sadece IUI yapılması anlamlı bulunmamıştır (46).

2.3.3. Açıklanamayan İnfertilitenin KS ve IUI ile Beraber Tedavi Edilmesi

KS'ın IUI ile kombinasyonu ve menstruel faza uygun olarak düzenli cinsel birliktelik karşılaştırılmıştır ve bu çalışmada KS ile birlikte IUI tedavisinde gebe kalma oranı oldukça anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki sonuca göre, inseminasyonun zamanlaması optimize edilirken, kavitede biriken sperm konsantrasyonu oldukça yüksek tutularak ortamda sperm ve oositin birleşme ihtimalleri artmaktadır (47).

Başka bir çalışmada ise KS/IUI ile gebe kalma oranı, tedavi görmeden gebe kalma oranına göre neredeyse 2 kat fazladır. Sonuç olarak; açıklanamayan infertilite tedavisinde KS ile IUI tedavisinin ilk basamak tedavi olarak görülmesi uygun bir yaklaşımdır (48).

2.4. Açıklanamayan İnfertilite Tedavisinde Uygulanan Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT-ART)

Tedavi sürecinde; basamak atlarken hangi hasta grubunda nelere dikkat etmeliyiz ve tedavi sürecini olumsuzlaştırabilecek hangi engellerle karşılaşılabilir diye bakalım.

2.4.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI)

IUI, ejaküle olmuş semen örneğinin yıkanarak ve prostoglandinlerden (PG) ayrılarak konsantre bir şekilde kültür mediumu içerisinde ve serviksten geçen bir kateter kullanılarak uterin kavite içerisine enjekte edilmesidir. Uygulanan yöntemin amacı; hem sperm hem oosit sayısını fertilizasyon bölgesinde arttırarak gebelik

olasılığını arttırmaktır. Açıklanamayan infertilite varlığında uzun yıllar boyunca ilk tedavi seçeneklerinden olmuştur.

IUI öncesi, daha önce bahsettiğimiz gibi kadın hastanın yaşı, infertilite süresi, AMH ve antral folikül sayısı (AFC), HSG değerlendirilmesi, erkeğin spermiogram sonucunun değerlendirilmesi (WHO 2010) gibi ön değerlendirme yapılır.

IUI Endikasyonları:

- **Kadın faktörü:** İmmünolojik, Yetersiz servikal mukus, Visköz servikal mukus, Açıklanamayan İnfertilite ve Minimal Endometriozis
- **Erkek Faktörü:** Ejekulatuar disfonksiyon, Retrograd ejakulasyon ve Seksüel disfonksiyon gibi hafif erkek faktörleri (49).

IUI endikasyonları etki mekanizmaları ile ilişkilidir. IUI'nin etkinliğinden sorumlu olan ana mekanizma; gamet sayısının artırılması, kadın üreme sisteminde ortaya çıkan gamet sayısının artırılması ile aynı zamanda fertilizasyon olasılığının artırılmasıdır.

Erkeklerde; sperm yıkama, motil sayı ve konsantrasyonunda artış ile sonuçlanır (50).

IUI Sonuçlarını Etkileyen Faktörler

Kadın Yaşı: IUI başarısı için en önemli prediktör faktördür. Bu, yaşı ovaryan rezerv ile oosit kalitesi üzerine olan negatif etkisine ve endometriyal reseptiviteye bağlıdır. Stone ve arkadaşları tarafından yapılmış bir retrospektif çalışmada 32 yaşından sonra konsepsiyon oranlarında anlamlı derecede azalma izlenmiş (51).

İnfertilite Süresi: Açıklanamayan infertilitesi olan hastalarda IUI sonrası konsepsiyon oranları infertilite süresi atıkça artar. Bu süre 6 yıldan az olan çiftlerde konsepsiyon şansı %20 iken, 6 yıldan daha fazla süredir infertil olan çiftlerde %10'a düşer (52).

İnfertilite Tipi: En iyi gebelik oranlarının anouvlasyon ve açıklanamayan infertilite nedeni ile IUI yapılan hastalar olduğu görülmektedir (53). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada minimal-orta endometriozisi olan hastalarda l/s eksizyondan kısa süre sonra yapılan KOH ve IUI 'ın oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (54, 55).

Folikül Sayısı: Folikül sayısı arttıkça IUI sonrası gebelik oranı artar. Örneğin tek folikül ile oran %6.2 iken, iki folikül ile %12.9'a, üç folikül ile %30 a yükselir (56, 57).

Endometrium: KOH sonrası IUI planlanan günde trilaminar endometriumun gözlenmesi gebelik için olumlu prediktördür.

Sperm Sayı ve Morfolojisi: Bazı araştırmacılar tarafından bazı semen parametreleri (total motil sperm sayısı (TMS), sperm motilitesi ve morfolojisi) IUI sonrası gebelik ve canlı doğum oranları ile direkt olarak korele bulunmuştur. Ayrıca çalışmalar %30 dan daha motil spermi olan hastaların daha az olanlara göre kümülatif gebelik oranının 4 kat daha fazla olduğunu göstermiştir (58, 59). WHO kriterlerine göre %10'un üzerinde normal morfolojide sperm bulunuyorsa IUI siklusu başına gebelik oranı %18.2 dir; %10'un altında ise bu oran %4.3'dür (60).

IUI Prosedürü ve İnseminasyon Yöntemleri

Semen Hazırlanması: Prostaglandinlere bağlı uterin kontraksiyonların önlenmesi için seminal plazmanın uzaklaştırılması ve pelvik enfeksiyon riskinin azaltılması için işlem öncesinde spermeler belli işlemlere tabi tutulurlar. En sık kullanılan yöntem kültür medyumunda spermatozoaların santrifigasyonu ya da dansite grediyenti takiben uygun kültür medyumunda re-süspansiyon yöntemidir. Hangi yöntemin daha etkin olduğu ile ilgili veriler yetersizdir (49).

Semen Kalitesi: Genel olarak; hazırlanmamış semende total sperm sayısının alt sınırı 3-10 milyon arasında, hazırlanmış semende ise 1 milyonun üzerinde olması gerektiği bildirilmektedir (49).

IUI Zamanlaması: İlk olarak LH pikinin tespiti ya da hcg (human chorionic gonadotropin) uygulanması ile IUI zamanı ayarlanabilir. LH pikinden 24 saat sonra ya da hcg uygulanmasını takiben 36-40 saatler sonra uygulanabilir (49, 61).

IUI Sonrası Yatak İstirahati: Yapılan son çalışmalarda IUI sonrası 10-15 dk yatak istirahati devam eden gebelik oranını artırır (62).

IUI Teknikleri: İntaruterin inseminasyonun yanında, İntraservikal inseminasyon, intrafallopian inseminasyon, direkt intraperitoneal inseminasyon, intrafoliküler inseminasyon, fallop tüpü sperm perfüzyonu gibi birçok farklı teknikler

vardır. Genel olarak mevcut yayınlar incelendiğinde klinik gebelik ve fekundite veya canlı bebek doğurma oranları açısından bu teknikler arasında büyük farklılıklar izlenmez (63). Fakat IUI'nin intraservikal inseminasyona kıyasla gebelik sonuçları daha başarılı bulunmuştur (64).

National Cooperative Reproductive Medicine Network 1999 yılında açıklanamayan infertilitesi olan 932 çifti 4 grup halinde randomize ederek yapılan bir çalışma yayınladı. Gebelik oranları: İCİ: %10, IUI: %18, KOH+İCİ: %19, KOH+IUI: %33 olarak bulundu (16).

Doğal Siklus-IUI

Foliküler maturasyonun takibi için 12. günden itibaren TV USG ile takip yapılır. 18- 20 mm matür folikül ve > 9mm trilaminar endometrium saptandığında hCG enjeksiyonu yapılır. 32- 40 saat sonra IUI işlemi yapılır.

IUI Öncesi Ovaryan Stimülasyon

IUI ile diğer inseminasyon formları ve KOH ile natürel siklus karşılaştırılmalıdır. İnseminasyonun zamanlaması, yapılacak IUI siklus sayısı, tek veya iki (double) inseminasyona ihtiyaç olup olmadığı, kateter tipi ve seçilecek sperm hazırlama tekniği göz önünde bulundurulmalıdır. KOH; klomifen sitrat (KS) kullanılarak, letrozol ve/veya gonadotropin kullanılarak, gonadotropin salgılatıcı hormon analogu veya antagonisti kullanılarak yapılabilir. Yapılan birçok çalışma ışığında; KS, seçilecek en kost-effektif yöntem gibi gözükmektedir (65). Spesifik olarak kapsamlı monitorizasyon gerektirmez ve gonadotropinlerle karşılaştırıldığında daha az OHSS riski ve çoğul gebelik riski taşır (66). Mitwally ve Casper tarafından yapılan yeni bir çalışmada letrozolün gebelik oranları açısından KS kadar etkili olduğu ve çoğul gebelik oranının düşük olması nedeniyle daha avantajlı olduğu belirtilmiş; ilk basamak ovulasyon indüksiyonu için mümkün olduğunca letrozol kullanılması tavsiye edilmiştir (67, 68).

Yine yapılan çalışmalarda KS/IUI ve gonadotropin/IUI karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamış. Stimüle sikluslarda gonadotropinle ovaryan stimülasyon/IUI, infertilite süresi 3 yıldan daha fazla ise efektif görünmektedir. Ancak çoğul gebelik riski artmaktadır (69).

Açıklanamayan infertilite grubunda IVF'ın, gonadotropin / IUI' a göre daha etkin olmadığı ancak; IVF'ın gebelik için gereken zamanı kısalttığı düşünülmektedir (70).

IUI Yönetimi

Yapılan çalışmalarda IUI işlemi için ideal folikül sayısı 2-4 folikül olup; 18-20mm çapında olmaları ve 15mm folikül < için kan estradiol (E2) düzeyi 150-250pgm/ml civarında olmalıdır. Bu şekilde IUI başarısının arttığı düşünülmektedir. 4'ten fazla gelişmiş folikül varlığında ve E2>1500 pgm/ml ise IUI işlemi iptal edilebilir (71). IUI başarısındaki etkenler içinde en önemlisi, sadece kadın ve erkek yaşı anlamlı biçimde IUI başarı oranını etkilemektedir (74).

Yakın zamandaki bir çalışmada, IUI uygulanan hastalarda KOH'a ek olarak platelet-activating factor verilmesinin özellikle hareketli sperm sayısının yetersiz olduğu hastalarda aşılardan sonraki ilk 12-18 saatte cinsel ilişkinin tedavi başarısını arttırdığı belirtilmiştir (72, 73, 74).

IUI işlemi en fazla kaç siklus denenebilir?

Gebelikler genellikle 1 yıllık infertil çiftlere ilk uygulanan sikluslarda meydana gelir. Gebeliklerin %88'i ilk 3 siklusa, %95.5'i ilk dört siklusa oluşur. Dört denemeden sonra IUI uygulamasına devam etmek önerilmemektedir. NICE (Sağlık ve Klinik Mükemmellik Ulusal Enstitüsü) 2013 klavuzunda açıklanamayan infertilite hariç diğer gruplara 6 siklus IUI önermektedir (75). NICE, açıklanamayan infertilite olan hastalara 2 yıl korunmasız cinsel ilişki sonrasında IUI yapılmaksızın direct IVF önermektedir. Fakat birçok klinik NICE klavuzunun aksine bu hasta grubunda benzer gebelik oranları ve maliyet avantajı nedeni ile direct IVF yerine 6 siklusa kadar IUI yapılmasını desteklemektedir (76, 77).

2.4.2. In Vitro Fertilizasyon (IVF)

IVF'ın Tarihçesi

19. yy'da ilk olarak tavşanlarda başlayan tüp bebek çalışmaları 1963'te Howard Jones ile bir fizyolog olan Robert Edwards'ın yapmış oldukları hayvan deneyleri ile geliştirilmiştir. İlk tüp bebek denemesi 1976 yılında ektopik gebelikle

sonuçlanmıştır. Son olarak 1978’de de dünyadaki ilk tüp bebek Louis Brown doğmuştur. O günlerden bugünlere tüp bebek tedavisi konusunda oldukça ileri bir teknolojik noktaya gelinmiş olsa da doğum sonrası eve giden canlı bebek konusunda pek ilerleme kaydedilememiştir (%20-30) (78).

IVF’ın Tanımı ve İçeriği

IVF, hastaya gonadotropin tedavisi başlanması ile oluşan kontrollü ovarian stimülasyonu, transvajinal ultrasonografi ile büyüyen overlerden oosit toplama işlemini, dış ortamda fertilizasyonu ve embriyoların endometrial kaviteye transferini içerir. Teknoloji geliştikçe, IVF artık oldukça geniş bir anlam taşımakta olup; ejakulat ile intra stoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) veya gamet intra fallopian transfer (GIFT), mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu (MESA) veya zigot intra fallopian transfer (ZIFT) veya testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile toplanan spermelerin intra sitoplazmik olarak enjekte edildiği yöntemleri, yardımcı embriyo tutunma tekniğini (assisted hatching) ve preimplantasyon öncesi genetik tanıyı (PGT) içermektedir (79).



Şekil 4. Klasik IVF ve ICSI Tekniği

2.4.2.1. IVF Tedavisinde Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon (KOH)

YÜT ile tedavide kullanılan KOH uygulamasında farklı tip protokoller de uygulansa asıl amaç; ekzojen verilen gonadotropinlerin uyarısı ile hastadan, ideal sayı ve oldukça iyi kalitede oosit elde etmektir. Bu amaçla FSH, LH ve HMG (insan menopozal gonadotropini) preparatları tek başına veya bir arada kullanılabilir.

Günümüzde çoğu KOH prokolü, 150- 300 IU/gün (standart başlama dozu çoğu hastada 225 IU/gün) gonadotropin dozu ile başlamaktadır (80). Klinisyenler, en başta baktıkları hasta yaşı ve USG’de antral follikül sayımı (AFC), anti-mülleryan hormon seviyesi veya erken folliküler faz FSH ve E2 seviyeleri gibi over rezerv testlerini

kullanarak tedavideki ideal başlangıç gonadotropin dozuna karar verirler. Yapılan çalışmalarda, düşük over rezervi olduğu düşünülen 35 yaş üstü kadın veya kesin olan hastalarda 450 IU'nun üzerindeki gonadotropin dozları sonunda daha fazla oosit ve daha yüksek gebelik oranlarının olmadığı görülmüştür (81).

Uzun Protokoller: Son zamanlarda en sık kullanılan KOH protokolü Gonadotropin-releasing hormone agonistlerle (GnRH-a) yapılan uzun protokol uygulamasıdır. Bir önceki siklusun erken foliküler veya midluteal döneminden başlayarak GnRH-a kullanımıyla endojen LH ve FSH baskılanır. Böylece folikül gelişimi eksojen gonadotropin preparatları ile kontrol altında gerçekleşir. Bu şekilde bir sonraki siklusta büyüyecek olan dominant folikülün seçimini sağlayan lüteofoliküler salgılanan FSH yükselmesi engellenebilir. Yeni siklus başladıktan sonra dominant folikül seçimi gerçekleşir ve çok sayıda folikül bir arada senkronize olarak büyür, birçok matür oosit elde edilmiştir. Uzun protokollerin en büyük avantajı bu senkronizasyonu sağlamaktır. Ayrıca normal-yüksek over rezervli hastalarda, oral kontraseptifler (OKS) de uzun protokol ile kombine edilebilir.

Uzun protokollerde tedavi bir önceki siklusun erken foliküler dönemi veya midluteal dönem 21. günde veya ovulasyondan 1 hafta sonra (uzun luteal protokol) başlanır. GnRH-a'nın ilk uygulandığı günlerde yaratacakları flare up etki, salgılanmış olan endojen progesteron ve östradiol sayesinde kısmen bloke olsa da 5-7 gün sürmektedir.

Kısa Protokoller: Tedavi menstruel siklusun ilk (2.-3.) günlerinde başlamaktadır. GnRH-a kullanımının yaptığı hormonal baskılanma olmaksızın, overlerin daha güçlü olarak uyarılması hedeflenir. Eksojen gonadotropinlerin verildiği hastalarda bu uyarının etkinliğini arttırmak üzere GnRH analoglarının ilk flare-up etkisinden faydalanılır. Bu etki, over rezervinin veya KOH yanıtının düşük olduğu hastalarda tercih edilir. Dezavantajı ise; kısa protokol, endojen gonadotropinleri baskılayamaz, bu yüzden spontan LH piki olabilir ve buna bağlı ovulasyon görülme riski, foliküler asenkronizasyon ve prematür luteinizasyon ihtimali yüksektir.

GnRH Antagonist Protokol: Eksojen gonadotropinlere ek olarak prematür LH yükselmesini önlemek amacıyla, pitüiter baskılanmayı agonistlerden çok hızlı yapabilen GnRH antagonistleri kullanılır. Sabit protokolde gonadotropin başlangıcının

6.günde 0.25 mg Cetorelix (Cetrotide®) veya Ganirelix (Ganirelix®) başlanır; gonadotropinlerle birlikte ovulasyon tetiklenmesine kadar kullanılır. Ayrıca bu protokolde, menstrüel periodun 3-7. günlerinden başlayarak KS veya Letrozol de gonadotropinlere eklenerek kullanılabilir. Bu uygulamanın, klinik sonuçları değıştirmediği, ancak ihtiyaç duyulan gonadotropin miktarını anlamlı derecede düşürüp, siklus maliyetini belirgin derecede azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda GnRH antagonist uygulanan sikluslarda analog sikluslara göre daha az OHSS görülmektedir.

2.4.2.2. Ovulasyonun Tetiklenmesi

Geliştirilen foliküller içinde; matür oosit (18 mm ve üzeri, 2 ve üzeri folikül olduğunda, folikül başına 200 pg/ml E2 seviyesi varlığında) bulunacak büyüklüğe ulaştığında, OPU (Oocyte Pick-Up) (Yumurta toplama) işleminden 34-36 saat önce LH piki oluşturarak bu oositlerin metafaz-2 safhasına geçişini sağlamak için yapısal benzerliği nedeniyle 5000-10.000 ünite üriner kaynaklı hcg kullanılır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile saf hcg de üretilmiş ve bu amaçla 250 µg rekombinant hcg kullanılmaktadır. Daha kısa yarı ömürlü olan r LH (Recombinant LH) da aynı amaçla kullanılabilir fakat 15.000-30.000 IU dozlara ihtiyaç vardır.

Antagonist protokolde GnRH analogunun flare etkisiyle de ovulasyon tetiklenebilir. Avantajı, oosit ve embriyo elde edilmesi ve kalitenin iyileştirilmesi, hcg nin uzun süren güçlü etkisinden kaçınarak OHSS gelişme riskinin azaltılması, dezavantajı ise GnRH analogunun luteolitik etkisinin fazla olması nedeniyle tedavinin luteal desteğinin oldukça yetersiz kalmasıdır.

Standart doz hcg'yle beraber GnRH agonistin eş zamanlı uygulanmasına “dual trigger” denir. Böylece implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının arttığı bildirilmektedir. Yetersiz folliküler maturasyon ve empty folikül sendromu olgularında uygun dozdaki GnRH agonist ve hcg'nin sıra ile; OPU işleminden 40 saat ve 34 saat önce uygulanması “double trigger” olarak tanımlanır (82). Bu yöntemin avantajları: 1- ovulasyonun tetiklenmesi ve OPU ile arada geçen zamanı uzatması, 2- GnRH agonist ile birlikte FSH pikinin sağlanması (83).

2.4.2.3. KOH Takibi

Hastaların takibinde Estradiol, LH ölçümü ve Transvajinal USG kullanılır. Folikül boyutunun ölçümünde ve hCG gününün saptanmasında ultrason son derece faydalıdır. Çapı 16-18 mm'ye erişen en az 2-3 adet folikül USG ile saptandığında hastaya Hcg verilir. Endometrium kalınlığı da bu esnada önemlidir. Endometrial kalınlık 7 mm'nin altında ölçüldüğü zaman gebelik şansı anlamlı olarak düşüktür (84).

Sağlıklı bir tedavi sürecinde geç foliküler fazda E2'nin bir gün önceki değerine oranla yarı yarıya artması, ölçülen folikül boyutunun ise 1-3 mm/gün büyümesi beklenir. LH piki E2 düzeyinin 250 pg/ml ve folikülün 13-14 mm çapa ulaşmasıyla tetiklenir. LH pikinin belirlenmesi OPU saatinin ve prematür folikül rüptürünün saptanmasında önemli belirteçtir. Süreç ortalama 10-12 gün sürer ve hCG uygulandıktan sonra OPU ortalama 34-36 saat sonra yapılır .

2.4.2.4. Luteal Faz Desteği

Luteal faz, ovulasyondan sonraki ortalama 14 günlük süreyi kapsar. Bu dönemdeki progesteron üretimi tamamen korpus luteumun fonksiyonuna bağlıdır. Korpus luteumun dejenerasyonu sonrasında, LH aracılığıyla proliferen olan kapillerler, granüloza ve luteal hücre katmanları içerisine girmeye başlar (85). Böylece hormonlar dolaşıma aktarılır. Folikülün yeterince olgunlaşması için, serum LH seviyesinin piki ve luteal dönemde salınımı granüloza ve teka hücrelerinin çalışması ve luteal fazın devamı için son derece önemlidir (86).

Progesteron östrojen ile birlikte LH'in maksimum miktarda salınımını ve bu salınımın ne kadar süreceğini ve miktarını tespit eder (87). Serumdaki progesteron seviyesi ovulasyon gerçekleşene kadar yükselir. Ovulasyon sonrası progesteron düzeyi azalır ve midluteal fazda tekrar yükselir. Böylece overlerde yeni oluşacak foliküller atreziye uğrar (3).

IVF te uygulanan bütün tedavi seçeneklerinde luteal faz yetmezliği kaçınılmaz bir durumdur (88, 89). GnRH salınım hızında azalma, LH'nin azalmasına ve korpus luteumun atreziye gitmesine neden olur. Hcg uygulaması bu nedenle önem arz etmektedir (90). Overlerin hiperstimülasyonu ile folliküler fazdaki yüksek östrojen

seviyelerinin IVF sikluslarında luteal faz anormalliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (91).

Luteal fazın hCG ya da progesteron ile desteklenmesi plasebo alan gruba kıyasla gebelik oranlarını anlamlı oranda arttırmıştır (92, 93). Fakat hCG, progesterona göre daha başarısızdır. GnRH-agonisti ile birlikte kullanıldığında OHSS riskini arttırdığı izlenmiştir (93). OPU esnasında corpus luteum zarar görebilir ve bu esnada yapılan progesteron desteği anlam kazanmaktadır (92, 93).

Luteal fazın progesteronla desteklenmesi için kullanılacak uygun yöntem kesin olarak belli değildir (94). Son yıllarda yapılan çalışmalara göre IVF sikluslarında progesteronla birlikte östrojen kullanımı tedavide implantasyon ve gebelik oranlarını arttırabilir (93, 95).

Progesteronun uygulama şekli: IM (İntramuskuler) P (progesteron) kullanımı, oral P'e göre daha etkindir. IM P (50mg/gün), oral P (600mg/gün)'e göre daha anlamlı ölçüde yüksek implantasyon oranı sağlar. Oral formülasyonla klinik ve devam eden gebelik oranları anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Oral P, ilk geçiş etkisiyle pre-hepatik ve hepatik metobolizmaya uğrar. Jel (Crinone®), kapsül (Ultragestan®) ve supositivarlar (Cyclogest®) kullanımının da gebelik oranları açısından farkı yoktur (88).

Progesteron uygulama dozu: 400 ila 600 mg mikronize oral progesteronun klinik gebelik oranları üzerine farkı yoktur. 25 mg ile 100 mg im progesteronun klinik gebelik üzerine farkı yoktur.

Bjresten ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir randomize kontrollü çalışmada doğal siklus uygulanan 435 kadın luteal destek (400 mg vaginal mikronize progesteron 2x1) yapıp yapılmamasına göre randomize edilmiştir. Luteal destek yapılan grupta canlı doğum oranları istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olarak bildirilmiştir. (%30'a karşılık %20; p = 0. 027) (88).

2.4.2.5. OPU İşleminin Zamanlaması

OPU genelde hCG uygulamasından 36 saat sonra yapılır. Hcg zamanlamasında hatalar immatür oosit toplanmasına veya ovulasyonun spontan oluşmasına sebep olabilir. İşlem erken yapıldığında immatür oositlerde fertilizasyon oranları düşer ve

polispermik fertilizasyon oranları oldukça yükselir. Geç yapılması durumunda ise GnRH agonistlerinin kullanıldığı protokollerde ovulasyon anlamlı derecede artmamaktadır, ancak işlemde daha fazla gecikme olursa ovulasyon oranları artmaktadır (96, 97).

2.4.2.6. Klasik IVF (Tüp Bebek) veya ICSI (Mikroenjeksiyon)

Döllenme in vitro fertilizasyon veya mikroenjeksiyon ile sağlanır. İkisi arasındaki tek fark döllenme şeklidir ve diğer basamaklar tamamen benzerdir. IVF daha çok erkek faktörü olmayan olgularda tercih edilirken ICSI spermogramda problem olan ve sebebin net bir şekilde ortaya konamadığı hastalarda tercih edilir. IVF’te folikül yaklaşık 100, 000 sperm ile karşılaşırken ICSI da her bir yumurtaya tek bir sperm hücresi özel bir iğne aracılığı ile enjekte edilir. ICSI yöntemi günümüzde artık rutin hale gelmiştir. Kliniğimizde çalışmaya aldığımız hastalara ICSI yöntemi uygulandı.

Embriyo Kalitesi

Döllenmiş yumurta hücresine zigot adı verilir ve bölünerek embriyo oluşur. Embriyolar, transfer edilmeden önce aralarından öncelikle en kaliteli olanları seçilir. Her bir embriyologlarca mikroskop altında değerlendirilir ve kalitesi belirlenir. Bütün embriyolara uygun laboratuvar ortamı oluşturulur ve kabaca üç parametreye bakılarak kaliteleri belirlenir. Hücrelerin sayısı, boyutlarının denk olup olmaması, “Fragmantasyon”un (canlı olmayan hücre artıkları) mevcudiyeti ile embriyo hacmine göre oransal yüzdesine bakılır.

Embriyoda hücre sayısı 1-12 arasında değişmektedir. OPU dan sonraki 3. günde, 6 veya üzerindeki hücre sayısı kaliteli embriyo olduğunu gösterirken, embriyonun 4 veya daha altında hücreden oluşması kötü kaliteyi gösterir. İyi kaliteli embriyoda fragmentasyona rastlanmaz ve hücrelerin boyutları birbirine benzerdir. Fragmentasyon oranı arttıkça, embriyo kalitesi (grade) düşer ve tedavinin başarısı önemli oranda azalır. Embriyoların kalite derecelendirmesi: (99)

Grade I : Blastomerler eşit büyüklükte, fragmentasyon yok veya < %20

Grade II : Blastomerler eşit büyüklükte değil, fragmentasyon yok veya < %20

Grade III : Fragmentasyon daha çok (%20-50) ve/veya nonhomojen sitoplazma ve/ veya multi- nüklear blastomerler mevcut

Grade IV : Fragmentasyon oldukça yüksek (> %50)

Grade I ve II iyi kalite emb-riyolar olup transfer sonrası gebelik şansı en yüksek olanlardır. Materyal ve metod kısmında daha ayrıntılı anlatılacaktır.

2.4.2.7. Embriyo Transferi

Embriyonun 2.-6. Günleri arasında bir kateter kullanılarak uterus içine transfer edilmesidir. Rutin uygulamalarda ve de özellikle kliniğimizde transfer 3. günde yapılmaktadır. Anestezi genelde gerekmez. Transferden sonra embriyolog kateteri kontrol etmelidir.

2.4.2.8. Gebelik Testi ve İzlem Aşaması

OPU işleminden yaklaşık 12-14 gün sonra gebelik testi bakılır . Bu süre içinde hastanın normal günlük hayatını devam ettirebilir. Cinsel ilişki bir süre için yasaklanmaktadır ve aşırı yorgunluk durumu olmaması ya da aşırı sportif aktivitelerde bulunmaması önerilir. hCG ve gerekirse progesteron değerleri embriyo transferinden ortalama 9-12 gün sonra bakılır. Pozitif ise hasta takibe alınır.

Beta hCG Günündeki Endometrium Kalınlığı ve Tipi

Endometriumdaki hiperekojen ve homojen görünümde gebelik oranları bariz düşük iken , endometriumun üçlü çizgi görünümünde gebelik oranlarının belirgin olarak arttığı bildirilmiştir (99,100). 6 mm'nin altındaki endometrial kalınlıklarda gebelik şansı belirgin olarak düşüktür (101).

2.5. YÜT Siklusları ve İmplantasyon

İmplantasyonun başarısı için embriyo en uygun zamanda reseptif endometriumla karşılaşması önemlidir. Endometrium siklus boyunca kendini tekrar gebelik için hazırlarken çok kısa bir zaman aralığında embriyoya reseptif durumda olur. Bu sürece implantasyon penceresi adı verilir. Ovulasyondan yaklaşık 4 gün sonra embriyo uterin kaviteye giriş yapar (102). Yumurtlamadan 6-8 gün sonra endometrium embriyo implantasyonuna hazır hale gelir (103).Yapılan bir çalışmada

transfer yapılan hastalarda hiperstimülasyona bağlı estradiol yüksekliğinin implantasyonu engellediği ortaya konmuştur (104). İmplantasyon başarısızlığının önde gelen sebeplerinden biri embriyo kalitesinin düşüklüğüdür. (105).

Embriyoda genetik anormali durumlarının artması, ileri yaşla doğru orantılıdır. Genetik anomaliler, ART başarısını oldukça olumsuz etkiliyor (106, 107).

Endometrial reseptivite mekanizmasını çözmek için halen çalışmalar devam etmektedir. Elektron mikroskopunda endometrial yapılar ayrıntılı olarak görülebilmektedir. Bu sayede endometrial reseptiviteyi gösteren pinopodlarla nükleer kanallar incelenebilir. Blastokistin endometriyal yüzeyde reseptivitenin önemli bir belirteci olan pinopod bulunan alanlara özellikle implante olduğu saptanmıştır. Pinopodlar implantasyonun sadece pencere döneminde ortaya çıkar ve sonrasında hemen kaybolur (108).

İmplantasyonda Etkin Moleküller

Ovulasyondan genelde 7–10 gün sonra, implantasyon penceresi döneminde endometriumdan birçok molekül ekspresyonu olur. Endometriumdan salgılanan sinyallere (lösemi inhibitör faktör reseptörü, insulin-benzeri büyüme faktörü, colony stimulating faktör reseptörü ve HB-EGF reseptörü) karşılık olarak embriyodan bazı faktörler salgılanır. Glycodelin, interlökin ve inhibin gibi immünmodülatör faktörlerin görevi; embriyonun reddedilmesine engel olurlar. Ayrıca VEGF ve prostoglandinler implantasyonun angiogenezis aşamasında önemli bir role sahiptir.

2.5.1. YÜT’de İmplantasyon Başarısızlığı ve Nedenleri

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları günümüzde tam olarak aydınlatılamamış problemler içindedir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı; 40 yaş altı bir kadında en az üç siklus ve en az 4 embriyo transferi sonrası gebelik oluşmaması durumudur.

Uterus, Endometriyum ve Tubalara Ait Sorunlar

İntrakaviter Lezyonlar: YÜT sikluslarına başlanmadan önce uterusu saptanan yer kaplayan lezyonlar ya da adhezyonlar gebelik başarısını artırmak için tedavi edilmelidir (109, 110). HSG'leri normal olan ve iyi kalitede embriyo transferine rağmen YÜT leri ile başarı elde edilemeyen hastalarda kaviter patolojiler akılda bulundurulmalıdır (111). Tüberküloz endometritinin de özellikle ülkemizde sık görüldüğü ve şiddetli adhezyonlara neden olabileceği hatırlanmalıdır.

Myomlar: İntrakaviter komponenti olmayan myomların tedavi başarısı üzerine etkisi net bilinmemektedir. İntramural myomların implantasyon başarısını nasıl etkileyebileceği konusunda farklı fikirler öne sürülmüştür (112, 113).

İnce Endometriyum: Çalışmalar endometrial kalınlığın yeterince olmadığı durumlarda gebelik başarısının düşük olduğunu göstermektedir (114, 115). Aksine endometrial kalınlıkla gebelik şansı arasında net bir ilişki olduğunu bulamayan prospektif ve retrospektif çalışmalar da vardır (116, 117).

Endometrial Reseptivite: İmplantasyon aşamasında farklı sitokinlerin salınımı ve yaptıkları etkilerdeki değişiklikler ile tekrarlayan implantasyon başarısızlığı arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Sağlıklı kadınlarda yetersiz olan uterin reseptivite, implantasyon başarısızlığının neredeyse üçte ikisinden sorumludur.

Trombofili ve İmplantasyon: Antifosfolip antikörlerin implantasyon başarısını düşürdüğüne dair çalışmalar mevcuttur (118, 119). Fakat heparin uygulamasının implantasyon oranını arttıracığına dair kesin bir fikir birliği yoktur. Ama yapılan son çalışmalarda antifosfolip antikör sendromunda heparinin non-antikoagulan etkileriyle birlikte heparin sülfat proteoglikanlar ve heparin binding epidermal growth factor aracılığıyla blastokist implantasyon başarısını artırabileceği öne sürülmüştür (120).

İmmünolojik Faktörler: IVF başarısızlığı olgularında periferik lenfositlerde T helper (Th) 1 ve 2 salınımının arttığı görülmüştür (121). Th 2 konsantrasyonu, Th 1'den normal gebede daha yüksektir ancak habitüel abortus ve tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları durumunda bu oran terse dönmektedir (122).

Hidrosalpinks: Hidrosalpinksli hastalarda implantasyon ve gebelik oranlarının tubal patolojisi olmayan normal hastalara göre düşük olduğu saptanmıştır (123). Hidrosalpinks varlığında salpenjektominin hem ilk YÜT siklusuna giren hem de tekrarlayan IVF başarısızlığı sonrası YÜT siklusuna giren hastalarda arttığına dair çok çalışma yapılmıştır (124, 125).

Embriyonal Faktörler

Kromozomal Kusurlar: Fertil olan gruba kıyslandığında başarısızlık yaşayan grupta translokasyonların, inversiyon, mozaizm, delesyon ve kromozom kırıklarının daha sık olduğu ortaya konmuştur (126, 127). Bu grupta sperm kromozomal bozuklukları da daha sık izlenmektedir (128). Embriyolardaki kromozomal anomalilerin sıklığı ve anoploidi tekrarlayan başarısız IVF sikluslarında bariz olarak artmıştır (129,130, 131).

Zona Pellusida: Başarılı implantasyon olması için zona pellucidanın oldukça incelenmesi ve blastokistin zona pellucidadan dışarı çıkması (hatching) gereklidir. Zona pellucidada incelenmemesi durumunda düşük implantasyon olduğuna dair çalışmalar vardır (132). In vitro kültür ortamının veya ileri kadın yaşının (35 yaş üzeri) etkisiyle zonanın sertleşmesinin; blastokistin hatching yapmasına engel olabileceği öne sürülmüştür (133). Ekspanse blastokistlerin ancak %25'inden azının in vitro koşullarda zonadan ekspanse olup ayrıldığı gözlenmiştir (134).

İn vitro kültür ortamlarının embriyo üzerindeki etkileri: embriyoların ileri yaş gibi bazı durumlarda in vitro koşullara toleransı azalmış olabilir.

Diğer Faktörler

Endometriyozis: Endometriozisin IVF üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada KOH'a cevabın, embriyo kalitesinin, implantasyon ve tabiki gebelik başarısını azalttığı ortaya konmuştur (135). Klinik çalışmaların çoğunda endometriyozisi olan hastalarla kontrol gruplarıyla karşılaştırılmalarında implantasyon açısından fark bulunmamıştır (136, 137). Yurt dışında, oosit donasyonu yapılan sikluslarda endometriyozisin etkilerine dair geniş çaplı yapılan çalışmalarda, endometriyozisin olumsuz etkisinin endometriyumdan daha çok oositler üzerinde olduğu gösterilmiştir (138, 139).

Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyonun Etkileri : Östrojen düzeylerinin fizyolojik üst sınırı aşması oosit kalitesini ve implantasyonu olumsuz yönde etkileyebilmektedir (140, 141). Gonadotropin preparatları arasında klinik sonuçlar açısından anlamlı bir fark izlenmemiştir (142, 143).

Embriyo Transfer Tekniği: Transferlerin sonuçlarını karşılaştıran bir çalışmada gebelik başarısının zor transferlerde yaklaşık %30 daha az olduğu bildirilmiştir (144).

2.6. Oksidatif Stres (OS) ve Doku Hasarı

Canlı dokularda düzenli olarak kontrollü bir şekilde serbest oksijen radikalleri (SOR) ve antioksidanlar üretilir. Doku bütünlüğünün ve fonksiyonlarının normal düzeylerde sürdürülmesi için aşırı üretilen SOR' lar, endojen glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPO), glutatyon redüktaz (GRx), glutatyon s transferaz (GST), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve diğer antioksidan (A, C, E vitaminler) savunma sistemlerince nötralize edilirler (145). Antioksidanlar, eğer oksidanları yeteri kadar nötralize edemezse oksidan/antioksidan arasındaki denge, oksidanların lehine bozulur. (146, 147). Bu dengenin oksidanların lehine bozulması oksidatif stres (OS) olarak adlandırılan doku hasarına yol açmaktadır (148). Dokudaki oksidatif hasar, bir çok faktörden kaynaklanmaktadır (149). SOR'ların fazla miktarda artması ayrıca, polimorf çekirdekli lökositlerin (PNL) aktivasyonunu artırır ve bu durum, SOR 'ların üretiminin daha çok artmasına sebep olur (150). SOR 'lar, hücre membran lipitlerini oksidasyona uğratar ve lipitlerden malondialdehid (MDA) gibi toksik ürünlerin salınımını artırırlar (151).

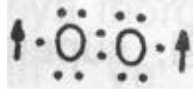
Yaşam İçin Oksijen

Total oksijen tüketimimizin %90'ından fazlasından elektron transport zinciri (ETZ), %5-10' undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Bu reaksiyonlarda bazı oksidazlar ve oksijenazlar rol oynar.

2.6.1. Moleküler Oksijenin Özellikleri ve Serbest Radikalin Tanımı

Eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar.

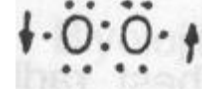
Moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır:



Şekil 5. Biradikal



Şekil 6. Delta O2



Şekil 7. Sigma O2

2.6.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından oluşabilir ve devamlı olarak üretilir (151, 152).

Endojen Kaynaklar

- Serbest radikaller mitokondride görevli ETZ tarafından katalizlenen oksijenler tarafından oluşturulur.
- Enflamasyon durumunda artan sitokinler serbest kalınca serbest radikaller bazı hücreler tarafından üretilmeye başlanır.
- ROS'ların kaynağı; lipit peroksidasyonu gibi oksidatif yollardır.
- Serbest radikaller ayrıca düz hücreleri ,trombositler tarafından da üretilir.
- Kortizol ve katekolamin gibi hormonlar vücutta stres reaksiyonlarını aktive ederek serbest radikal oluşumunu arttırırlar.
- Bağışıklık sistemi hücrelerince de ROS ürünleri ortaya çıkabilir.

Eksojen Kaynaklar

- Sigara dumanı, egzoz gazı.
- Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması, UV ışınları, volkanik faaliyetler, yangınlar
- Asbest, karbonmonoksit gibi havayı kirleten maddeler,
- Böcek ilaçları gibi kimyasallar, su kirletici maddeler,

2.6.3. Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP) /(ROS)/(ROT)

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Diğer moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren

bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri (ROP)" denmektedir (152).

Reaktif Oksijen Partiküllerinin Sınıflandırılması

ROP sıklıkla lipidler tarafından oluşturulur. Ortamdaki demir ve bakır iyonları gibi kofaktörler lipid peroksidasyonunu hızlandırır (153).

Sık Karşılaşılan Reaktif Oksijen Partikülleri:

1. **Radikaller:** Süperoksit radikal (O_2^-), Hidroksil radikal (OH^-), Alkoksil radikal (LO^-), Peroksil radikal (LOO^-)
2. **Radikal olmayanlar:** Hidrojen peroksit (H_2O_2), Lipid hidroperoksit ($LOOH$), Hipoklorik asit ($HOC1$)
3. **Singlet oksijen**

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

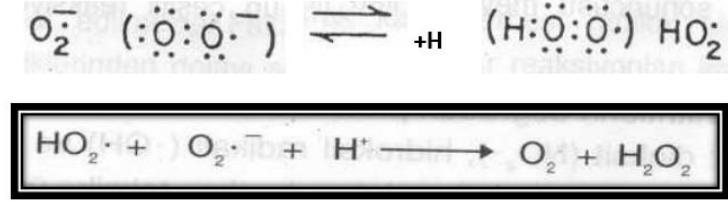
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



Şekil 8. Süperoksit Oluşumu

Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.



Şekil 9. Hidrojen Peroksit Oluşumu

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer. Çünkü Fe²⁺ veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin (O₂^{·-}) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH[·]) oluşturur.

Hidroksil Radikali (OH[·])

Hidroksil radikali (OH[·]) Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali belki de reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür.

2.6.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, DNA, protein, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali (O₂^{·-}) ve hidroksil radikali hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır ve bu etki ile membranlarda permeabilite artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları okside olarak yıkılır ve DNA okside olur (154).

Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi

Lipit peroksidasyonu çok fazla toksik madde açığa çıkarır ve açığa çıkan bu maddeler ikinci haberciler gibi hareket ederek etkilerini uzak bir alanda gösterir. Lipit peroksidasyonu bir metilen grubundan (CH₂) bir hidrojen (H) atomunun

uzaklaştırılmasıyla birlikte karbon atomu (. CH) üzerinde eşlenmemiş bir elektron oluşmasıyla sonuçlanır.

Serbest Radikallerin Proteinlere Etkisi

Serbest radikaller amino asit içeriklerine göre proteinleri değişik oranlarda etkileyebilir. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküller serbest radikaller ile daha yüksek reaktiviteye sahiptir. Serbest radikallerin protein hasarına neden olabilir. Ayrıca oksitlenmiş proteinlerin birçoğu doğada inaktiftir ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Fakat zamanla bir miktar birikebilir. Böylece hastalık yapıcı ve yaşlanmayı hızlandırıcı gibi olumsuz etkiler meydana gelir.

Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkisi

DNA, hidroksil gibi güçlü etkili serbest radikaller tarafından rahatlıkla hasara uğratılabilir. Bu serbest radikaller DNA ile reaksiyona girerek şeker parçasından hidrojen atomlarının artması veya azalmasına yol açabilir. Özellikle, pirimidinin C4-C5 çift bağı hidroksil radikalının hasarına aşırı duyarlıdır. Bu saldırılar sonucunda timin glikol, urasil glikol gibi oksidatif pirimidin hasar ürünleri ortaya çıkabilir. Serbest radikal saldırıları ayrıca poli sentetaz enziminin (ADP-riboz) aktivasyonuna neden olur. Bu enzimin aktivasyonu apoptozise ve DNA'nın parçalanmasına yol açar.

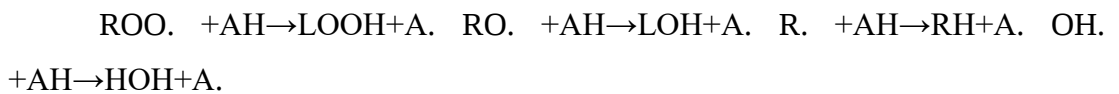
2.7. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Hücrel Savunma

2.7.1. Antioksidan Savunma Sistemi

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler.

Antioksidanların etkileri:

1. Zincir kırıcı etki; serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak, serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir.



2. Baskılayıcı etki; reaksiyon hızını azaltarak, serbest oksijen radikallerinin aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya denir. Vitaminler örnek olarak gösterilebilir.

3. Onarıcı etki; Oluşan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederler.

4. Enzimatik etki; SOD (süperoksit dismutaz) gibi antioksidan enzimler ile diğer antioksidanların sentezini arttırarak etkilerini gösterirler.

Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

Süperoksit Dismutaz (SOD): Mitokondride görevli bir enzimdir. Süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijen formuna çevirirler. Ökaryotlarda SOD enziminin 3 adet izoenzimi vardır (155, 156).

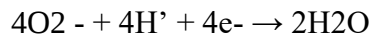


Katalaz (CAT): Glikoprotein yapısında dört tane alt üniteden oluşan bir hemoproteindir. Hücrede özellikle peroksisom ve mitokondride yoğunken ,sitoplazma ve endoplazmik retikulumunda daha az oranda bulunur. CAT, hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüştürür (157, 158).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): H₂O₂ ve yağ asidi peroksitlerinin (ROOH) indirgenmesinde rol oynar. Selenyum içerir ve sitozoliktir (159).

Glutation-S-Transferazlar (GST): Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz: Solunum zincirinin son enzimidir ve aşağıdaki reaksiyonla süperoksiti detoksifiye eder.



Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

Glutasyon (GSH); GSH-Px, glutasyon redüktaz (GSH-R), GSH transferaz enzimlerinin kofaktörüdür. GSH-Px enzimi ROOH-'ları ve H₂O₂'i metabolize ederken GSH okside olur ve okside GSH (GSSG) oluşur. GSSG toksiktir ve GSH-R enzimi ile GSH'a indirgenir (160). GSH/GSSG oranı, oldukça iyi bir oksidatif stres

göstergesidir (161, 162). GSH major enzimatik antioksidandır (163). Zigotun morula ve blastokist aşamasına ilerlemesinde de önemli rolleri vardır (164).

Sistein ve sisteamin; oositin GSH içeriğini artırır (163) Embriyoyu OS'den koruyarak fertilizasyona katkıda bulunur (165).

Albumin: plazmada bulunan albümin bakır iyonlarına bağlanır ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu ve en önemlisi hidroksil oluşumunu engeller. (166).

Bilirubin: lipid peroksidasyonunda antioksidan olarak rol oynar. Görevi albumine bağlı yağ asitlerinin peroksidasyonunu önlenmesi olarak tanımlanır.

Seruloplasmin: plazmada bakır taşıyıcı öncelikle demir metabolizmasında rol oynar. Seruloplasmin ferooksidaz aktivitesine sahiptir. Demir iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

Askorbik Asit (Vitamin C): Radikallerin etkilerini yok eder ve lipidleri oksidasyona karşı korur. Antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. C vitamini, E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonuna engel olur (167).

Vitamin E (α -Tokoferol): E vitamininin en önemli rolü, hücrelerin ve hücre içi organellerin membranlarının lipid fazında zincir kıran bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicisi olmasıdır (168). E vitamini, sabit bir lipid hidroperoksit vermek amacıyla, membran fosfolipitlerinden veya lipoproteinlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden üretilen peroksil radikalleri ile reaksiyona girer. E vitamini bu biyokimyasal reaksiyon vasıtasıyla, zararlı lipid serbest radikallerini etkin olarak azaltır ve böylece dokuları serbest radikal saldırısından korur. E vitamininin lipid peroksidasyonunu önlemedeki bu antioksidan aktivitesi, immun yanıtı da arttırmaktadır (169). Büyük miktarda yağ dokusunda depolanan E vitaminin plazmadaki konsantrasyonu 0. 5-1. 8 mg/dL arasında değişmektedir. Yapılan bir çalışmada E ve C vitamini desteğinin yaşlı kişilerde ortalama kan lipid peroksit konsantrasyonlarında bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (170). E vitamini diyetle eklenirse LDL düzeyleri önemli ölçüde artar ve güçlü antioksidan etkisi olduğu bilinmektedir.

Transferin ve Laktoferrin: demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu yavaşlatır

Karotenoidler (Vitamin A ön maddesi): A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten, son derece güçlüdür ve ROP ları ortamdaki uzaklaştırır böylece lipid peroksidasyonunu önler (171).

Ürik Asit: antioksidatif sistemin önemli ölçüde demir ve bakır bağlayarak destekler.

2.8. Total Antioksidan Status (TAS/TAK)

Plazmadaki antioksidan etkili partiküller hücreleri oksidatif hasara karşı koruyabildiği gibi, dışardan alınan antioksidanların vücudun diğer bölgelerine gitmesinde kolaylaştırabilir. Antioksidanın katkısı etkinliğine ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonuna bağlıdır (172). Antioksidan bileşiklerin çeşit olarak fazlalığı, her bir antioksidan bileşiğin ölçümünü oldukça zorlaştırmaktadır. Antioksidanların tek tek ölçümü hem pahalı hem de zaman alıcıdır. Bu yüzden tüm parametrelerin tek tek ölçümü yerine total antioksidan kapasitenin ölçümü tüm antioksidan durumunun değerlendirilmesi için uygun bir yöntemdir (173, 174). Total antioksidan aktivite (TAA), total antioksidan güç (TAOP), TAS terimleri de TAK yerine kullanılan sinonim kelimelerdir (175).

2.9. Total Oksidan Status (TOS)

Vücutta çeşitli reaksiyonlarla oluşan birçok oksidan madde; singlet oksijen, O_2^- , H_2O_2 , OH^- radikali ve nitrik oksit (NO) üretilmektedir. Bu oksidan maddelerin düzeyleri serum ve plazmada tek tek ölçülebilir fakat bunun oldukça maliyetli ve zaman alıcı olmasından dolayı son yıllarda kullanılan TOS, plazma ve vücut sıvılarındaki tüm oksidanların ölçümüne olanak sağlamaktadır. TOS, total peroksid (TP), serum oksidan aktivitesi (SOA), reaktif oksijen metabolitleri (ROM) eş anlamda kullanılan tanımlamalardır (176).

2.10. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Oksidatif yükün göstergesi olan OSI indeksi TOS değerlerinin TAS değerlerine bölünmesiyle elde edilir (177).

$$OSI \text{ (Arbitrary Unit)} = (TOS, \mu\text{mol } H_2O_2\text{eq/L}) / (TAS, \mu\text{mol Trolox eq/L})$$

2.10.1. Oksidatif Stresin İnfertilite ile İlişkisi

Reaktif oksijen türlerinin (ROT)'ların ve antioksidanların kadın üreme sisteminde hemen hemen bütün aşamalarda önemli rolleri vardır (178).

2.10.1.1. Oksidatif Stres ve Folikülogenez

Reproduktif dönemin başlangıcında overlerde toplam 400-500 bin adet primordial folikül vardır. Primordial folikül mayoz I profaz evresindeki primer oosit ve granuloza hücrelerinden oluşmaktadır. Primordial foliküllerden sadece bir tanesi mayoz I'i tamamlayarak dominant özellik kazanır ve gelişimini tamamlar. Mayoz I'e ilerlemenin ROT miktarının artmasıyla birlikte inhibisyona uğraması , (179, 180, 181) bize ROT üretiminin ovulatuvar süreçte ne kadar önemli olduğunu gösterir. Fertilizasyon ile birlikte mayoz II'ye ilerleme antioksidan sistemler tarafından başlatılır (179).

Foliküller büyüdükçe steroid üretiminde artma sitokrom p450 sisteminde artışa ve bu da ROT ların açığa çıkmasına yol açar (182). Briggs ve ark. transferrin ve reseptörlerinin granuloza hücrelerinde olduğunu ve dominant foliküllerde daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır (183). Folikülerin büyümesiyle ve olgunlaşması ile oluşan hipoksik ortam, foliküler anjiogenezi stimule eder.

Foliküler Sıvı İçeriği

Foliküler sıvı ekstrasellüler sıvının ovarian foliküllerin antrumu içinde biriken bir yerdir. Foliküler sıvı steroidleri hipofizer gonadotropinlerin kontrolü ile granuloza ve teka hücrelerinden salgılanmaktadır. Bütün antral folikül gelişim devrelerinde foliküler sıvı kumulus oosit kompleksi ile tamamıyla kaplanır ve bazı steroidler foliküler sıvıda plazmadan bin (1000) kat yüksek olabilir.

Folikül sıvısı (FF) / (FS) oosit ve oositin büyüme gelişiminin düzenlenmesi için gerekli immünolojik faktörleri içeren mikro çevredir (184). Ovaryum fonksiyonlarını etkileyebilen immün ve endokrin sistemler arasındaki iletişim bu mikro çevre aracılığıyla gerçekleşir. FF'deki düzenleyici faktörlerin organizasyonu fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimle doğrudan bağlantılıdır. FF ve doku çevresinde birçok sitokini sentezleyebilen çeşitli lenfatik yapılar bulunur. Lenfatiklere ek olarak,

sitokinler ayrıca luteal, stromal, tekal ve granüloza hücrelerinin oluşturduğu ovaryum somatik hücreleri tarafından üretilir (185).

Oosit foliküler sıvı çevresinde gelişimini tamamlar. Foliküler sıvının fertilitede rolü çok büyüktür; oosit kalitesini, oositin sperm ile etkileşimini, implantasyonu ve embriyonun gelişimi etkiler. Foliküler sıvı ve granuloza hücreleri oositle yakın ilişkide olduklarından fonksiyonlarının daha geniş kapsamlı ve ileriye dönük olarak araştırılması IVF başarısını tespit etmek için kullanılabilir (11, 186).

Oksidatif Stres ve Oosit Maturasyonu

Glutasyonun oositin sitoplazmik maturasyonunda çok önemli bir görevinin olduğu anlaşılmıştır. GSH viabilite için iyi bir belirteçdir. Yapılan bir çalışmada hamster oositlerinden alınan örneklerde metafaz II fazındaki oositlerde GSH konsantrasyonu matur olmayan germinal vezikül aşamasındaki oositlerdeki GSH konsantrasyonuna göre 2 kat daha fazladır (187). Yine başka bir çalışmada in vitro maturasyon süresinde koyun oositlerine sisteamin desteğinin morula ve blastokist gelişimini arttırdığı, böylece fertilizasyona çok olumlu katkıda bulunduğu; GSH sentezini arttırdığı ve peroksidaz içeriğini azalttığı belirtilmiştir (164, 188).

Oksidatif Stres ve Ovulasyon

Ovulasyondan önce gerçekleşen LH pikinin ardından oluşan inflamatuvar prekürsörler, ROT'ların oluşumunu artırır. Yani inflamatuvar prekürsörlerin azlığı ovulasyonu kötü yönde etkiler (189).

2.10.1.2. Oksidatif Stres ve Oosit- Embriyo Kalitesi

Sağlıklı oosit gelişimi için folikül sıvısında ROT'ların belli bir düzeyde olması kabul edilebilir. Bir çalışmada foliküler sıvıda saniyede 107 fotondan az olan ROT seviyeleri başarısız gebelik sonuçları ile ilişkili bulunmuştur. Ancak OS'in artması da oosit kalitesini ve fertilizasyonu negatif yönde etkiler (190). Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (191) fragmente embriyolarda H₂O₂ gibi oksidanlar yüksek oranda tespit edilmiştir .

2.10.1.3. Oksidatif Stres ve Abortus

İmplantasyon, embriyo ve uterin çevrenin karmaşık ilişkilerin olduğu ve iyi yönetilmiş bir süreç olduğuna göre, maternal sirkülasyonun sağlandığı erken dönemde ani bir plasental oksidatif stres artışı erken gebelik kaybına yol açabilir (192). Spontan abortuslar prooksidatif ve antioksidatif dengenin bozulduğu şartlarda görülmektedir. Ayrıca etyolojisi aydınlatılmayan tekrarlayan abortuslarda oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı da düşünülmektedir. Gebelikte polimorfonükleer lökositlerin sayısında belirgin artışın olması süperoksit anyonlarının üretimiyle sonuçlanabilir. Oksidatif stresin plasentadaki, sitotrofoblastlardaki, vasküler endotelial hücrelerdeki ve düz kas hücrelerinde bulunan sitokin reseptörlerinin ekspresyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (193).

2.10.1.4. Oksidatif Stres ve Açıklanamayan İnfertilite

İnfertilitenin nedenlerinin belirlenmesi amacı ile tuba ligasyonu nedeniyle laparoskopi yapılan kadınlarla fertil kadınların periton sıvı ROS seviyeleri karşılaştırıldığında, açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda fertil olanlara göre anlamlı derecede yüksek ROS düzeyleri gösterilmiştir (194). Açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda ROS düzeylerindeki yüksekliği; E vitamini, glutatyon gibi antioksidanların düzeylerinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. (194). Bu durum, açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda antioksidan konsantrasyonlarının, fertil kadınlara göre daha düşük olduğunu göstermektedir. Bütün bu çalışmalara göre açıklanamayan infertilitesi olan hastalarda oksidatif strese maruziyet durumunda hastaların tedavisinde antioksidan kullanımının yer alabileceği fikri benimsenmekle birlikte bu konuda daha geniş çaplı prospektif çalışmaların yapılması gerekmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu prospektif çalışma Ocak 2018 ile Ağustos 2018 tarihleri arasında Ezurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, IVF Merkezinde ICSI uygulanacak hastalardan elde edilen folliküler sıvılarda gerçekleştirildi. Tez projesi için gerekli “etik kurul onayı” AÜTF Etik Kurul Başkanlığı’ndan alınmış ve ayrıca hastalara araştırma hakkında ayrıntılı bilgi veren “bilgilendirilmiş gönüllü onam formları” okutularak, bilgi sahibi olmaları sağlandı. Hastalar yazılı ve sözlü onamları alındıktan sonra çalışmaya katıldı. Yan tutuculuğu önleyebilmek için aynı klinisyen tarafından takip edilen 200 hasta ile çalışıldı.

3.1. Materyal

Hastalardan çalışılacak olan, atık olarak değerlendirilen, oosit içermeyen, folikül sıvıları (FS), Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı IVF Ünitesi’ne infertilite nedeniyle başvurup IVF/CSI (intrastoplazmik sperm injeksiyonu ve embriyo transferi) siklusu planlanan ve KOS (kontrollü overyan stimülasyon) protokolü başlanan hastalardan oosit toplama işlemi (OPU) esnasında elde edildi. Hastalardan alınan FS örnekleri santrifuj edildikten sonra eppendorf tüplerde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı IVF Ünitesi’nde TAS ve TOS düzeyleri tayini yapılması için -80°C de derin dondurucuda saklandı.

3.1.1. Kullanılan Gereçler

1. Sandrifüj cihazı: MICRO CENTRİFUGA HERAEUS SEPATECH HAEMOFUGE
2. Derin dondurucu: BOSCH KGN86AW30N NO FROST -80 °C
3. Otomatik ve cam pipetler
4. Bio-Tek PowerWave XS USA cihazı
5. Trinity Biotech-Premier Hb9210: HBA1c cihazı
6. Rel Assay Kit Diagnostics

3.1.2. Kullanılan Reaktif Malzemeler

1. Rel Assay Diagnostics Total Antioksidan Statüs (TAS)
2. Rel Assay Diagnostics Total Oksidan Statüs (TOS)

3.2. Metod

3.2.1. Çalışmaya Alınan Hastaların Belirlenmesi

1 yıl süre ile herhangi bir korunma yöntemi kullanılmadan düzenli cinsel ilişkide bulunulmasına rağmen hiç gebelik oluşmaması nedeni ile başvuran çiftlerden erkek faktörünün ekarte edilmesi için spermiogram istendi. Spermiogram sonuçları, Üroloji kliniğine yönlendirildi ve sadece sonuçları normal aralıkta çıkan hastalar çalışmaya alındı. Belirlediğimiz bu normal aralık; 3 günlük cinsel perhiz sonrası semen analizi sonuçları WHO 2010 kriterlerine göre oligospermi (sperm sayısının normalin altında olması konsantrasyon <15milyon), azospermi (semende hiç sperm bulunmaması), treatozoospermi (< %4 normal form sperm), astenospermi (motil sperm yüzdesinin düşük olması <%32 progresif motil), oligoastenospermi (sperm sayı ve motilitesinin normalin altında olması, konsantrasyon< 15 milyon ve <%32 progresif motil) olarak değerlendirilen veya ICSI işlemi için TESE yapılarak sperm elde edilen hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Hastaların menstruel sikluslarının 2. - 3. gününde bazal hormon profili değerlendirmesi ve pelvik ultrasonografi yapıldı. Hormon profilinde sorun olmayan hastaların eşlerinin spermiogram sonuçları da IUI için uygun ise tubal faktörü ekarte etmek için uygun zamanlama ile HSG (histerosalpingografi) çekildi. HSG de bilateral/ unilateral tubal açıklığa sahip hastalara uygun indüksiyon ile IUI denendi. Fakat en az 2 kez IUI yapılmasına rağmen canlı bebekle sonuçlanan gebelik elde edilememiş hastalara ICSI tedavisi başlandı. Menstrual siklus gün 2-3 te yapılan ultrasonografide patolojik bulgular saptanan hastalara, gerekli tedaviler başlandı veya hastalar ilgili kliniklere yönlendirildi.

Çalışmaya ileri yaş hastalarda over rezerv testleri düşük saptanmış ve/veya ultrasonografide overlerde total antral follikül sayısı düşük gözlenmiş hastalar alınmadı. 44 yaşına kadar olan ve over rezervi normal sınırlarda olan hastalara dış

merkezlerde daha önce en az iki kez IUI tedavisi denendiği için zaman kaybını önlemek amaçlı hastalara direk ICSI protokolü başlandı.

Sonuç olarak tüm tetkikleri görünürde normal olarak değerlendirilen, açıklanamayan infertilitesi olan (tubal faktör, endometriyozis, düşük ovaryan rezerv (DOR), anormal ovaryan rezerv, erkek infertilitesi gibi bilinen patolojik bulguları olmayan), bilinen kronik sistemik hastalık, kanama bozukluğu veya otoimmün hastalığı olmayan hastalara en az 2 kez IUI yapılmasına rağmen klinik gebelik elde edilememiş olup, bu 200 hastaya ICSI protokolü başlandı ve klinik çalışmaya alındı.

Çalışmada hastaların menstrüel sikluslarının 2.-3. Gündeki bazal FSH, LH, E2 (Estradiol), Progesteron (P) değerlerine ve siklustan bağımsız bir günde TSH, T4, Prolaktin, HbA1c (Glikozillenmiş hemoglobin), Androstenedion, Kortizol hormonlarına, AMH (Anti Müllerian Hormon) düzeylerine ve eşlerinin spermiogramlarına bakıldı. Ayrıca hastaların sigara kullanımları, VKİ leri (kg/m²) ve meslekleri de demografik bilgiler için sorgulandı.

3.2.2. Hastalara Ovulasyon İndüksiyonunun Başlanması

Hastaların menstrüel sikluslarının 2. gününde yaş, ultrasonda (usg) antral folikül sayımı, bazal E2, FSH, LH ve gerekirse AMH düzeylerine bakılarak KOS protokolleri belirlendi ve tedaviye başlandı. Çalışmaya aldığımız hastalara standart olarak GnRH antagonist protokol uygulandı. Hastalarda genel olarak rekombinant FSH (rh FSH) (Gonal F®, Serono, Swiss veya Puregon®) ve bazen ek olarak üriner FSH (Menogon®) ile tedaviye başlandı. Tedavi boyunca foliküllerin durumuna göre belli periyodik aralıklarda hastalar TV-USG ile kontrol edildi ve Gonadotropin dozları tekrardan belirlendi. Hastalara sabit protokolde, sikluslarının 6. gününde; ortalama foliküllerin çapı 12-14 mm, serum E2 seviyeleri 200-600 pg/ml arasında iken protokole, Luteinize eden hormonu salgılatan hormon (LHRH) antagonisti (0. 25 mg Cetrotorelix (Cetrotide®) / Ganirelix ®) ilave edildi ve gün aşırı veya gerekli ise günlük kontrole çağrıldılar. Fakat değişken protokolde; folikül ölçümleri önde giden hastalara LHRH antagonisti, daha erken başlandı. En az 2 folikülü 17 mm üzerinde olanlara rhCG 250 mcg subkutan (Ovitrelle®) uygulandı. hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra sedasyon altında oosit toplama (OPU) işlemi yapıldı.

Yapılan çalışmalarda, YÜT ile tedavi sırasında yüksek doz gonadotropin verilen oositlerde artmış morfolojik bozukluk ve kromozomal anormallik izlendiği belirtildi (195). Bizim çalışmaya aldığımız hastalarda yaşlarına, hormon düzeylerine ve folikül gelişimlerine göre, Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) riski gibi komplikasyonların olabileceği de dikkate alınarak hastaya özel GnRH antagonist tedavi protokolü uygulanarak; ilaçların doz ayarlaması yapılmasına özen gösterildi.

GnRH antagonist protokol uygulanma amacı; tedavi sürecindeki kontrollerde bakılan yüksek estradiol (E2) seviyeleri implantasyon potansiyelini ve kromozomal durumu olumsuz etkileyebileceğinden, bu durumun önüne geçmeye çalışmaktır.



Şekil 10. Folikülometri ile Antral Folikül Takibi (Usg Görüntüsü)

3.2.3. Oosit Pick-up İşlemi (OPU) Yapılması ve Folliküler Sıvı Toplanması

IVF/ICSI planlanan hastalara oosit toplama işlemi hCG yapıldıktan ortalama 36 saat sonra gerçekleştirildi. OPU işlemi öncesinde hastalardan idrarlarını yapmaları istendi. Anestezi altında ve hasta dorsolitotomi pozisyonunda iken vagene spekulum takılıp ardından steril serum fizyolojik ile vagen temizliği yapıldı. Ardından OPU işlemi esnasında overlerin görüntülenmesi için üzerine jel konularak steril plastik kılıf içerisine geçirilmiş 5-7 MHz'lik vajinal ultrason probu kullanıldı ve proba steril iğne klavuzu takıldı. İşlemden önce aspirasyon iğnesi heparinli medium ile yıkandı. İşlem için optimum aspirasyon basıncı 100-150 mmHg olarak ayarlandı. Çünkü bu değerlerde folikül hızlıca aspire edilebilir. Her bir follikül dikkatlice ayrı ayrı aspire edildi. Her aspirasyondan sonra bir sonraki follikül sıvısının kontaminasyonunu önlemek için set temizlendi ve yeni toplama tüpü kullanıldı. OPU öncesinde kullanılacak ekipman 37°C 'ye ısıtıldı.

İşlem öncesinde, aspire edilecek over, ultrason probu ile pelvik yan duvar arasında hareket etmesini önleyecek şekilde sabitlenmeye çalışıldı. Bu esnada

foliküler rüptür olmaması oldukça dikkat edilerek overe fazla basınç uygulanmamasına dikkat edildi. Ultrason probu aspire edilecek folikülün en büyük çapını görecektir şekilde yönlendirildi ve foliküle tam ortasından iğne ile girilerek tüm folikül içeriği aspire edildi. Aspire edilen foliküler sıvının zarar görmemesi için ısı, ışık, hava gibi dış etkenlerden uzak tutularak hemen embriyoloğa iletilti. İşlem esnasında 10 mm'nin üzerindeki bütün foliküller aspire edildi. Böylece over boyutları küçültüldü. Amaç hastaya vereceği rahatsızlık ve gerginlik hissinin azaltılması ve sonradan gelişme ihtimali olan over torsiyon riski de azaltılmış oldu. Embriyologlarca ışık mikroskobu altında oositlerin gelişimsel evreleri kaydedildi.

OPU işlemi esnasında aspire edilen FS (her follikülden ortalama 2-6 ml sıvı alındı) örneklerinden embriyolog tarafından oositler ayrıştırıldı. Daha sonra embriyologlardan transfer işlemi esnasında embriyologların grade ve transfer edilen embriyo sayıları bilgileri net bir şekilde alınarak verilere kaydedildi. Oosit alındıktan sonra kalan atık folikül sıvıları 10 dakika 3000 rpm'de (hız) santrifuj edilerek, oluşan süpernatantlarından ayrılarak, sarı berrak renkli olan, oosit içermeyen, atık FS'ları her follikül için ayrı ayrı steril pipet kullanılarak; mümkün olduğunca eşit miktarlara bölündü ve en az 0.5 ml olacak şekilde eppendorf tüplere konuldu ve -80 °C'de derin dondurucuya konularak TAS ve TOS kitleriyle çalışılacağı güne kadar saklandı.

3.2.4. TAS ve TOS Kitlerinin Çalışma Prensipleri

Alınan örnekler derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra; oda sıcaklığına geldikten sonra Bio-Tek PowerWave XS USA cihazında çalışıldı. TOS, TAS ve OSI: TOS/TAS x 10 şeklinde her hasta için ayrı ayrı kitler kullanılarak hesaplandı.

Toplam antioksidan kapasite tayini (TAS) (Rel Assay Diagnostics ®, Gaziantep, Turkey)

Örneklerin total antioksidan kapasite düzeyleri (TAS), Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics) kullanılarak ölçüldü. Kit içeriğindeki basamaklar uygulanarak numuneler çalışıldı.

Dalga boyu	660 nm
Örnek, standart, H ₂ O	18 µL
Reagent 1	300 µL
İyice karıştırılır, 30 saniye sonra A1 absorbanı ölçülür	
Reagent 2	45 µL
İyice karıştırılır, 37 C’de 5 dakika sonra A2 absorbanı ölçülür	
Hesaplama: A2 – A1 = ΔAbs of standard, numune, H ₂ O	

$$\text{Results} = \frac{[\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Numune}]}{[\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Standard}]}$$

Testte, numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz azaltılmış ABTS formuna indirgemektedir. 660nm (nanometre)’de absorbanı değişimi, numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilgilidir. Test, geleneksel olarak bir Vitamin E analogu olan Trolox Eşdeğer olarak adlandırılan stabil bir antioksidan standart çözeltisiyle kalibre edilir (175).

Total Oksidatif Stres (TOS) (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Turkey)

Örneklerin total oksidan stres (TOS) düzeyleri, Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics) kullanılarak ölçüldü. Kit içeriğindeki basamaklar uygulanarak numuneler çalışıldı.

Dalga boyu	530 nm
Örnek, standart, H ₂ O	45 µL
Reagent 1	300 µL
İyice karıştırılır, 30 saniye sonra A1 absorbanı ölçülür	
Reagent 2	15 µL
İyice karıştırılır, 37 C’de 5 dakika sonra A2 absorbanı ölçülür	

Hesaplama: A2 – A1 = ΔAbs of standard, numune

$$\text{Results} = \frac{\Delta\text{Abs numune}}{\Delta\text{Abs Standard}} \times 10^*$$

*= standart konsantrasyonu

Testte, numunede bulunan oksidanlar ferro iyonu kompleksini ferrik iyonla okside eder. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Demir iyonu asidik bir ortamda kromojenle birlikte renkli bir kompleks yapar. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, örnekte bulunan toplam oksidan molekül miktarıyla ilgilidir. Analiz, hidrojen peroksit

ile kalibre edilir ve sonuçlar, litre başına ölçülen mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edilir ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. /L) (175).

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) (arbitrary unit) = $\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}) / \text{TAS } (\mu\text{mol Trolox Eq/L}) \times 100$

3.2.5. Oositin Olgunlaşması, Fertilizasyon ve Oluşan Embriyoların Kalitelerinin Belirlenmesi

Kliniğimizde oosit ve sperm hücresinin laboratuvar ortamında hastaların özelliklerine göre ICSI yöntemi kullanılarak fertilize olması sağlandı.

ICSI yönteminde; foliküllerden aspire edilen yumurtalar, etrafındaki hücre kümesi ile birlikte alındı. Bu hücre kümesi, yumurtaların olgunluğunun tamamlanmasını sağlar. Ortalama 1-2 saat bu hücreler yumurtanın etrafında bırakıldı. Yumurtanın son olgunlaşma aşaması da beklenecek en sonunda, hyaluranidaz enzimi ve steril cam pipetler yardımıyla yumurtanın çevresindeki hücreler enzimatik ve mekanik yöntem ile yumurtadan tamamen uzaklaştırıldı. Böylece yumurtalar artık matürasyon açısından değerlendirilebilir düzeye geldi. Denüasyon işlemi yapıldıktan 30-60 dakika sonra olgunluğunu tamamlamış yumurtalara mikroenjeksiyon işlemi uygulandı. Mikro-pipetler yardımı ile mikroskop altında spermin, kadın hastadan alınan yumurtanın içine enjekte edilmesidir. İşlemler mikroskopun ısıtılmış yüzeyinde, mikromanipulator aracılığıyla ve 200–400 kat büyütme altında yapıldı.

Oosit kalitesinin blastomer klivaj oranından çok embriyo kalitesi üzerine etkisi vardır. Oosit gelişiminin son evresinde sitoplazmada yoğun sitoplazmik organel, protein ve RNA birikimi olmaktadır. İlk 2 günde, bu organel ve moleküller embriyonun erken gelişimi için şarttır.



GV: Olgun olmayan yumurta, M1: Orta derecedeki olgun yumurta, M2: Olgun yumurta.

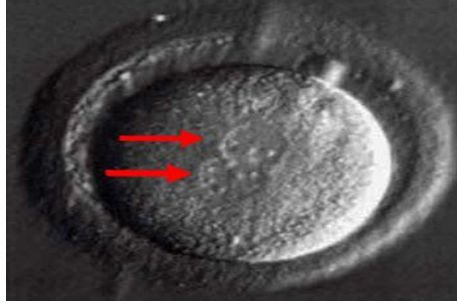
Şekil 11. Oositin Olgun Faza Ulaşma Aşamaları

Normal özelliklere sahip bir spermioqram örneğinde sperm sayısının, mililitrede en az 15 milyon, ileri hareketliliğin %40 ve normal sperm morfolojisinin

%4'ün üzerinde olması gereklidir (WHO, 2010). Sperm özellikleri bu değerlerin çok altında ise erkek kısırlığı faktörü söz konusudur ve eğer şiddetli ise; saydığımız parametreler oldukça düşüktür ve spermelerin yumurtayı dölleme yeteneği neredeyse yoktur. Şiddetli erkek kısırlığı için kesin standart bir tanım yoktur, fakat ileri hızlı hareketli ve normal morfolojideki sperm sayısının bir milyonun altında olması durumudur. Sperm ve yumurtanın tamamen normal olduğu durumlarda bile IVF/ICSI yöntemlerinin uygulanmasına rağmen dölleme olmayabilir. Açıklanamayan infertilitesi olan hastalarımıza da kliniğimizde ICSI tekniği uygun görülerek uygulandı.

3.2.5.1. Fertilizasyon Aşaması

ICSI işleminden sonra fertilizasyonun olup olmadığını belirlemek için 16-18 saat sonra mikroskopik değerlendirme yapıldı. Fertilize olan oositlerde 2 Pronukleus oluşumu (2 PN) ve embriyo oluşumu izlendi. PN sayısını ve morfolojiyi tespit etmek amacıyla fertilizasyon değerlendirmesi yapılırken yüksek büyütme (en az 200 x) altında Hoffman eşdeğeri optik düzeneğe sahip bir invert mikroskop kullanılarak yapıldı. Fertilize olan embriyolar; azot, ısı, karbondioksit, oksijen, nem gibi değişkenlerin kontrol edildiği özel bir cihazda takibe alındı. Embriyonun gelişimi için ihtiyaç duyduğu ısı, inkübatörler aracılığı ile sağlandı. Embriyonun ihtiyacı olan faktörler, içine yerleştirildiği kültür ortamı ile karşılandı. Optimum pH değerleri ise, gerek inkübatör içerisinde belirli bir düzeyde tutulan karbondioksit gazı ile, gerekse kültür ortamındaki maddeler ile sabitlendi. Laboratuvar ortamında döllemenin ve gelişimin değerlendirilebilmesi ile implantasyon olasılığı en yüksek olan embriyonun seçilmesi için belirli aralıklarla (özellikle 1., 3., 4. ve 5. günlerde) inkübatörden kısa süreliğine çıkarılıp mikroskop altında incelendi. Taze embriyo transferi (ET) sonrası hastaların kalan embriyolarından uygun kalitede olanlar, özel bir hazırlık işleminden sonra, koruyucu kültür solüsyonları (krioprotektanlar) içerisinde dengelendikten sonra kademeli olarak soğutularak donduruldu ve sıvı nitrojen (-196 °C) içerisinde depolanarak dondurulma işlemi tamamlandı.



Şekil 12. Normal Fertilizasyon, Pronukleus Görüntüsü

3.2.5.2. Embriyo Kalitelerinin Belirlenmesi

Embriyoların kalitesi morfolojik bazı özelliklerine göre belirlenir. Transfer edilecek embriyo kalitesi tüp bebek tedavisinin başarısı için önemlidir.

Yarıklanma aşamasındaki embriyoların değerlendirmesi yapılırken, hücre sayısı, boyutu ve simetrisi, fragmentasyon oranı, granülasyon ya da vakuol varlığı ve çekirdek görünümü verilerini içermesine dikkat edildi. Blastokist değerlendirilirken ise; genişleme derecesi, iç hücre kitlesinin morfolojisi, blastosöl boşluğunun büyüklüğü ve trofoektoderm hücrelerinin yapısı ayrıntılı olarak incelenmelidir. Embriyo gelişimi belli zaman aralıklarıyla görüntüleme sistemi kullanılarak da değerlendirildi.

2. Gün ve 3. Gün Embriyo Değerlendirilmesi

Daha önceden bahsedildiği gibi embriyoların durum değerlendirmesi yapılırken 3 farklı parametreye bakıldı;

1. Hücre (blastomer) sayısı
2. Fragmentasyon oranı
3. Blastomerler arası çap uyumluluğu

2. günde embriyonun hücre sayısının ideal olarak 3-4 olması beklendi. 3. günde ise ideal olan hücre sayısı 7-8'di. Öncelikle içerisinde çekirdek görünen hücreler sayılarak embriyonun hücre sayısı belirlendi. Eğer embriyo mitotik olarak gününe göre hızlı veya yavaş bölünürse, implantasyon ihtimalini azalır. Embriyo değerlendirmesi sonucu; embriyoda fragmentasyon ve çap uyumsuzluğu yok ise bu embriyo grade 1 olarak sınıflandırıldı. Embriyoda fragmentasyon veya çap uyumsuzluğu var ise bu embriyo grade 2 olarak sınıflandırıldı. Fragmentasyon oranı % 20'den fazla ise bu

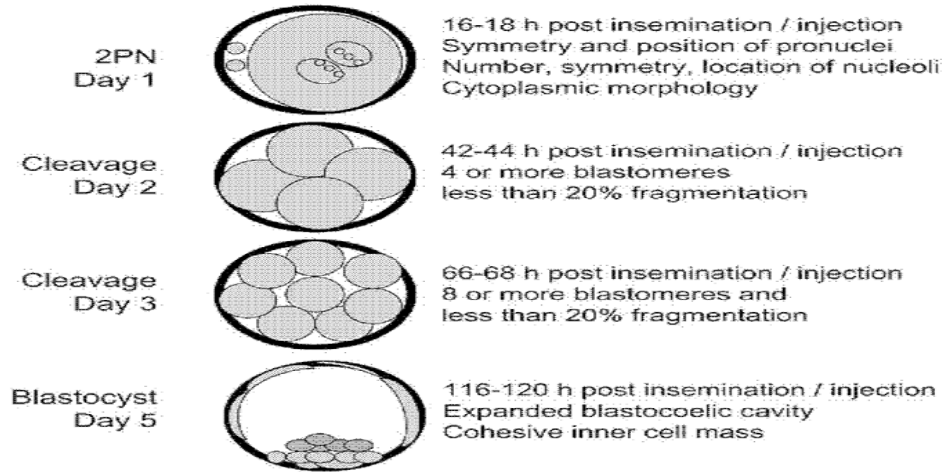
embriyo grade 3 - 4 olarak sınıflandırıldı. Çalışmamıza ise sadece 3. gün embriyosu olup grade 1 ve grade 2 embriyo transferi yapılan hastalar alındı.

5. Gün Blastokist Değerlendirilmesi

Fertilizasyondan 5 gün sonra, blastokist gelişir. Dördüncü günde morula aşamasında bulunan embriyo, 5. günde oldukça farklılaşma gösterir ve embriyonun içerisinde sıvı dolu bir kavite (blastocoel) açılmaya başlar. Blastokist aşamasındaki bir embriyo ortalama 200-300 hücreden oluşur; bu nedenle belirli bir hücre sayısından bahsedilemez.

Blastokistin durum değerlendirmesi yapılırken üç farklı parametreye bakılır;

1. Blastocoel genişlemesi ve Zona Pellucida'dan Hatch olma durumuna göre sınıflandırma (Grade 1, 2, 3, 4, 5, 6)
2. İç hücre kütlesi (ICM) sınıflandırması
3. Trofoektoderm (TE) sınıflandırması



Şekil 13. Embriyo Gelişim Süreci (Sakkas et al. Fertil Steril 2001; 76: 1150)

Özetlemek gerekirse kliniğimizde embriyoları şöyle sınıflandırdık: (99)

1. kalite embriyo (çok iyi kaliteli): eşit büyüklükte blastomer içerir ve fragmentasyon görülmez.

2. kalite embriyo (iyi kaliteli): %1-20 fragmentasyon görülür ve/veya eşit olmayan büyüklükte blastomerler görülür.

3. kalite embriyo (orta kalite): %21-50 fragmentasyon görülür ve eşit olmayan blastomerler içerir.

Yapılan çalışmalara göre blastomer/yarıkıanma oranı embriyo gelişimini ve kalitesini belirleyen en önemli faktördür. 55. saat 8 hcrenden fazla hücre içeren embriyoların implante olma ihtimali, daha az sayıda hücre içeren embriyolara göre anlamlı olarak yüksektir.

Oksidatif strese maruziyet ile 2PN blok, embriyonik arrest veya embriyonun kaybı oluşabileceği, foliküler sıvı ve semende yüksek ROS ile kötü cevap arası korelasyon olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır. Tüm bu işlemlerden sonra, transferden işleminden hemen önce, ekip tarafından; hasta, hasta dosyası ve kültür petri kaplarının iki kez kontrol edilmesi oldukça önemlidir.

3.2.5.3. Embriyo Transferi

Hastaların yaş, primer/sekonder infertil olma, evlilik süreleri, tedavi sürecinde geçirdikleri IUI ve tüp bebek denemeleri, toplanan kaliteli oosit, oluşan emmbriyo grade ve sayılarına göre hastalara anestezi gerektirmeden 1 veya 2 embriyo transferi yapıldı. Fakat vajinismus olan hastalarda embriyo transferi, anestezi altında hafif sedasyon ile gerçekleştirilebildi.

Transfer işlemi suprapubik usg ile gerçekleşti. Uterusun ultrason ekranında rahat görünebilmesi için mesane idrarla dolu olmalıdır. Bunun için işlem öncesinde hastalara bol su içirilerek idrara sıkışık hale getirildi. Embriyo transferi için jinekolojik muayene masasına alınan hastanın vajenine en uygun boyuttaki spekulum yerleştirilmesini takiben servika mukus serum fizyolojik sıvı ile temizlendikten sonra, ince bir bir kateter yardımıyla embriyo veya embriyolar tekrardan embriyologlar tarafından doğru hasta ve doğru embriyo oldukları teyit edildikten sonra uteus içine verilerek işlem gerçekleştirildi.

Tedavi sürecinde daha önce bahsettiğimiz şekilde luteal faz desteği alan hastalar, transfer işleminin 12 gün sonra hastalar kanda hcg ve progesteron bakılmak üzere kontrole çağrıldılar.

Yaptığımız bu çalışmada hastalara taze embriyo transferi yapıldı. Eğer embriyoları kaldıysa embriyoların durumu ve hastaların kendi istekleri doğrultusunda klinisyen tarafından da uygun ise dondurulma işlemine alındı.

Bu çalışmada hastaların menstruel sikluslarının 2. Günündeki bazal FSH, LH ve E2, Progesteron, Prolaktin gibi hormonlarına ek olarak tiroit fonksiyon testlerine (TFT), HbA1c, AMH, Androstenedion ve Kortizol düzeylerine, sigara kullanma durumlarına, VKİ (Vücut Kitle İndeksi)'lerine, primer/sekonder infertilite durumlarına, ev hanımı veya çalışan hasta olup olmadıklarına, transfer edilen embriyo grade ve sayısına bakılarak biyokimyasal gebelik olup olmadığına, klinik gebelik olup olmadığına bakıldı. Hastaların OPU günü alınan atık folikül sıvısındaki örneklerden TAS/TOS/OSİ değerlerine bakılarak saydığımız özelliklerle arasında anlamlı bir sonuç çıkıp çıkmadığına bakıldı. Böylece başarılı tüp bebek tedavisi için yardımcı tedavi seçenekleri olup olmadığının öğrenilmesi amaçlandı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiği SPSS 20. 0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi (sonuçlar ortalama ve min-max değerler olarak verildi). Kategorik veriler için ki-kare testi uygulandı. Numerik veriler için Kolmogrov-Smirnov testine göre normal dağılım gösteren verilere parametrik testlerden Student t-testi, normal dağılım göstermeyen veriler için ise nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi uygulandı. İki'den fazla grup karşılaştırılmasında ise normal dağılım gösteren veriler için parametrik testlerden ANOVA, normal dağılım göstermeyen veriler için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis Test kullanıldı. $p < 0, 05$ anlamlı, $p < 0, 001$ değeri ise çok anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Yapılan bu prospektif çalışma, Ocak 2018 ile Ağustos 2018 tarihleri arasında Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı Üreme Sağlığı Merkezi'ne başvuran, gerekli tetkik ve araştırmalar yapıldıktan sonra, en az 2 kez Intrauterin İnseminasyon (IUI) tedavisi denendiği halde klinik gebelik oluşmamış, açıklanamayan infertilitesi olan ve IVF/ICSI kararı alınan 200 hastanın folliküler sıvılarında gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu bulunmayan bu çalışmada, bütün hastalara GnRH antagonist protokolü tedavisi uygulandı ve hastalar demografik özellik, yaş, hormonlar, IVF tedavi sürecindeki sonuçlar açısından gebelik oluşumu yönünden kendi içinde kıyaslandı.

Çalışmaya aldığımız 200 hastaya baktığımızda yaş ortalamaları 30.67 ± 0.87 yıl olup VKİ'leri ise 25.05 ± 0.60 kg/m² idi. Bazal hormonlarına baktığımızda menstruel sikluslarının 2. ya da 3.günlerinde, tedaviye başlanan günde ölçülen FSH değerinin ortalaması 7.70 ± 1.90 mIU/mL, E2 değerleri ise 51.2 ± 0.48 pg/mL idi. Bu değerler bize, açıklanamayan infertilitesi olan hastaların yaşlarının, hormonal değerlerinin ve VKİ'lerinin standardize şekilde normal aralıklarda olduğunu gösterdi.

Tablo 1. Çalışmaya katılan hastaların hastaların hormonal durumları ve bazı demografik özellikleri.

Değişken	n=Olgu Sayısı	Minimum	Maksimum	Mean±SD
Yaş (yıl)	200	20	40	30.67 ± 0.87
VKİ (kg/m ²)	200	20	36	25.05 ± 0.60
FSH (mIU/mL)	200	4.52	9.7	7.70 ± 1.90
LH (mIU/mL)	200	1.90	18.43	5.40 ± 2.170
E2 (pg/mL)	200	18	98	51.2 ± 0.48
PRL (ng/mL)	200	2.42	45.49	18.67 ± 0.73
Kortizol (µg/dl)	200	2.7	20.2	11.9 ± 0.17
Androstenedion (ng/dl)	200	0.177	8.49	2.60 ± 0.91
TSH (uIU/mL)	200	0.37	4.7	2.5 ± 0.28
T4 (pg/mL)	200	0.76	1.9	0.85 ± 0.23
HbA1c (%)	200	4	6.3	5.52 ± 0.21
AMH (ng/mL)	200	1.04	5.2	2.2 ± 0.12

(FSH: Folikül stimulan hormon, LH: Luteinizan hormon; E2: Estradiol, PRL: Prolaktin, HbA1c: Glikozillenmiş hemoglobin, TSH: Tiroid stimulan hormon, T4: Tiroksin, AMH: Anti-Müllerian Hormon)

Çalışmaya aldığımız 200 hastanın 62 tanesi sigara kullanıyordu, 73 tanesi çalışıyordu ve %80'i ise ev hanımı idi. Bütün bu sonuçlar, hastaların folliküler sıvı OSİ parametreleri ve gebelik durumlarını karşılaştırmak için oldukça faydalı oldu.

Tablo 2. Çalışmaya katılan hastaların farklı demografik özellikleri.

Demografik özelliklere ait farklı parametreler	n=Olgu Sayısı
Çalışan kadın	73
Ev hanımı	127
Sigara kullanıyor	62
Sigara kullanmıyor	138
Primer infertil	160
Sekonder infertil	40
GnRH antagonist protokolü uygulanan hasta	200

(GnRH:Gonadotropinsalgitıcı hormon)

4.1. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre Değerlendirilmesi

4.1.1. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre Yaş ve Hormonal Değerlerinin Karşılaştırılması

Çalışmaya katılan hastaların 62 tanesi (%31) sigara kullanmakta olup, 138 tanesi (%69) sigara kullanmamaktadır. Sigara kullanan hastaların yaş ortalaması 31.39 ± 4.84 yıl olarak bulunmuş olup, sigara içmeyenlere göre anlamlı fark izlenemedi. ($p > 0.05$) Menstrual sikluslarının 2. gününde bakılan bazal FSH değerlerine baktığımızda da sigara kullanan hastalarda ortalama değer 7.52 ± 1.97 mIU/mL olup; sigara kullanmayan hastalarda bu değer 8.05 ± 2.15 mIU/mL dir ve anlamlı bir fark izlenememiştir. Sigara kullanan hastalarda bazal LH değeri 5.03 ± 2.67 mIU/mL olup; içmeyenlere göre anlamlı bir fark izlenemedi.

Menstrual siklustan bağımsız olarak; sigara kullanan hastaların PRL değerlerine baktığımızda da ortalama 16.62 ± 8.55 ng/mL olup; içmeyenlere göre anlamlı bir fark izlenemedi. Oosit pick-up gününden birkaç gün önce bakılan kortizol değerlerini karşılaştırdığımızda ise sigara kullanan hastalarda bu değer 10.23 ± 4.64 µg/dl, sigara kullanmayanlarda ise 10.05 ± 4.24 µg/dl olup; anlamlı bir fark bulunamadı. Androstenedion düzeylerine bakıldığında ise sigara kullananlarda değer 2.63 ± 2.03 ng/dl olup sigara kullanmayan hastalarla arada anlamlı bir fark bulunamadı.

Hastaların Tiroid Fonksiyon Testleri (TFT) değerlendirildiğinde; sigara kullanan hastaların TSH değerleri ortalama 2.44 ± 1.30 uIU/mL olup, sigara kullanmayan hastalarınki ise 2.06 ± 1.05 uIU/mL dir. Sigara kullanan hastaların TSH değeri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0.029$). T4 değerlerine baktığımızda sigara kullanan hastaların ortalama değeri 0.87 ± 0.13 pg/ml; sigara kullanmayan hastaların değeri ise 0.84 ± 0.12 pg/ml bulunmuş olup arada anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sigara kullanan hastaların HbA1c değerlerine baktığımızda ortalama değer $\%5.42 \pm 0.38$, kullanmayan hastalarınki $\%5.40 \pm 0.39$ olup anlamlı bir fark izlenemedi.

Sigara kullanan hastaların yine menstrual siklustan bağımsız olarak bakılan AMH değerlerine göre sigara kullanan hastaların ortalama değeri 2.13 ± 0.96 ng/mL, sigara kullanmayan hastalarınki ise 2.23 ± 0.93 ng/ml olup arada anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo 3. Sigara kullanma alışkanlıklarına göre hastaların yaş, bazal hormon ve diğer hormon değerleri

Değişken	Sigara kullanan hastalar n=62 (%31)	Sigara kullanmayan hastalar n=138 (%69)	P değeri
Yaş (yıl)	31.39 ± 4.84	30.40 ± 5.19	0.212
FSH (mIU/mL)	7.52 ± 1.97	8.05 ± 2.15	0.101
LH (mIU/mL)	5.03 ± 2.67	5.45 ± 2.79	0.359
E2 (pg/mL)	50.27 ± 20.26	56.58 ± 20.89	0.048
PRL (ng/mL)	16.62 ± 8.55	Min: 2.29 Max: 244	0.823
Kortizol (µg/dl)	10.23 ± 4.64	10.05 ± 4.24	0.833
Androstenedion (ng/dl)	2.63 ± 2.03	2.38 ± 1.72	0.499
TSH (uIU/mL)	2.44 ± 1.30	2.06 ± 1.05	0.029*
T4 (pg/mL)	0.87 ± 0.13	0.84 ± 0.12	0.411
HbA1c (%)	5.42 ± 0.38	5.40 ± 0.39	0.524
AMH (ng/mL)	2.13 ± 0.96	2.23 ± 0.93	0.698

(FSH: Folikül stimulan hormon, LH: Luteinizan hormon; E2: Estradiol, PRL: Prolaktin, HbA1c: Glikozillenmiş hemoglobin, TSH: Tiroid stimulan hormon, T4: Tiroksin, AMH: Anti-Müllerian Hormon)

4.1.2. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre 12.Gün hCG ve Progesteron Değerleri ile Follükler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerlerinin Karşılaştırılması

IVF/ICSI sikluslarındaki süreçte genel durum, klinik ve laboratuvar sonuçları uyum olup embriyo transferi yapılan hastaların sigara kullanım alışkanlıklarına göre

transferden sonraki 12.günde hastaları kliniğimize çağırdık ve venöz kandan hcg ve progesteron değerlerine baktık. Buna göre sigara kullanan hastalarda minimum değer 0 mIU/mL iken;maksimum değer 248.61 mIU/mL idi.Sigara kullanmayan hastalarda ise minimum değer 0 mIU/mL iken,maksimum değer 413.3 mIU/mL idi.Sigara içmeyen hastalarda 12.gün Hcg değeri anlamlı olarak içenlere göre yüksek bulundu (p=0.003).12.gün Progesteron değerlerine baktığımızda sigara kullanan hastalarda minimum 0.1 ng/mL iken maksimum 42.7 ng/mL idi.Sigara kullanmayan hastalarda ise minimum 0 ng/mL iken maksimum 54 ng/mL idi.Sigara içmeyen hastalarda Progesteron anlamlı olarak yüksek bulundu. (p=0.012).

Oosit Pick-Up (OPU) günlerinde hastalardan toplanan atık folikül sıvısından biyokimya laboratuvarında çalıştığımız; TAS değerlerine baktığımızda sigara kullanan hastalarda ortalama 1.04 ± 0.28 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ iken sigara kullanmayan hastalarda ise bu değer 1.27 ± 0.27 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ idi. Sigara kullanmayan hastalarda TAS değeri anlamlı olarak sigara kullananlardan yüksek bulundu (p<0.01).Yine sigara kullanan hastalarda TOS değeri ortalama 20.87 ± 12.65 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ iken, sigara kullanmayan hastalarda ise bu değer 14.95 ± 9.26 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ idi. Buna göre sigara kullanmayan hastalarda TOS değeri sigara kullananlara göre anlamlı olarak düşüktü (p<0.01).OSI değerlerine baktığımızda sigara kullanan hastalarda ortalama 1.99 ± 1.02 arbitrary unit iken; sigara kullanmayan hastalarda bu değer 1.19 ± 0.66 arbitrary unit ti. Sonuç olarak sigara kullanmayan hastalarda kullananlara göre OSI değeri anlamlı olarak düşüktü (p<0.01).

Tablo 4. Sigara kullanma alışkanlıkların göre hastaların 12.gün Hcg, 12.gün progesteron değerleri ve folliküler sıvılarındaki TAS,TOS,OSI değerleri

Değişken	Sigara kullanan hastalar n=62 (%31)	Sigara kullanmayan hastalar n=138 (%69)	P değeri
12.Gün Hcg (mIU/mL)	Min:0 Max:248.61	Min:0 Max:413.3	0.003*
12.Gün Progesteron (ng/mL)	Min:0.1 Max:42.7	Min:0 Max:54	0.012*
TAS ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$)	1.04 ± 0.28	1.27 ± 0.27	<0.01*
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$)	20.87 ± 12.65	14.95 ± 9.26	<0.01*
OSI (arbitrary unit)	1.99 ± 1.02	1.19 ± 0.66	<0.01*

(Hcg:İnsan Koryonik Gonadotropin, TAS:Total Antioxdan Status, TOS:Total Oxidan Status, OSI:Oksidatif Stres İndeksi, Min:Minimum, Max:Maksimum)

4.1.3. Hastaların Sigara Kullanma Alışkanlıklarına Göre Gebelik Durumları ile Embriyo Kalitelerinin Karşılaştırılması

Çalışmamıza aldığımız hastalarda transfersin 12.gününde bakılan Hcg değeri 5mIU/mL'den büyük olan hastaları biyokimyasal gebe olarak değerlendirdik. Hastalarımızın 84'ünde biyokimyasal gebelik oluştu;116'sında hiç gebelik oluşmadı. hastanın 63'ünde klinik gebelik durumu izlendi. Şimdi de sigara içme durumlarına göre değerlendirecek olursak; biyokimyasal gebelik oluşan 84 hastanın %38.8 i sigara kullanıyordu, %61.2'si sigara kullanmıyordu. Sigara kullanmayanlarda biyokimyasal gebelik durumu istatistiksel olarak büyük bulundu ($p<0.05$).Yine klinik gebelik yaşayan 63 hastanın %19'u sigara kullanıyordu, %81'i sigara kullanmıyordu. Sigara kullanmayanlarda klinik gebelik oranı anlamlı olarak daha yüksek bulundu($p<0.05$).

Sigara kullanım durumlarına göre hastalarının embriyo kalitelerine baktığımız zaman, Grade 1 embriyo transferi yapılan 110 tane hastanın %25'i sigara kullanıyordu, %75'i sigara kullanmıyordu. Karşılaştırma yaptığımızda sigara kullanmayanlarda grade 1 embriyo sayısı daha yüksek oranda görülse de sigara kullanan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmadı. Grade 2 embriyo transferi yapılan 90 hastanın %37.8'i sigara kullanıyordu; %62.2'si sigara kullanmıyordu. Sigara kullanma durumlarına göre Grade 2 embriyo oluşumu açısından arada anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 5. Hastaların Sigara Alışkanlıklarına Göre Biyokimyasal Gebelik ve Klinik Gebelik Oluşması Durumları ile Embriyo Kalitelerinin Karşılaştırılması

Değişken	Sigara kullanan hastalar	Sigara kullanmayan hastalar	P değeri
Biyokimyasal gebelik var n=84	%38.8 (n=32)	%61.2 (n=52)	0.005*
Klinik gebelik Var n=63	%19 (n=12)	%81 (n=51)	0.013*
Grade 1 Embriyo n=110	%25 (n=28)	% 75 (n=82)	0.061
Grade 2 Embriyo n=90	%37.8 (n=34)	%62.2 (n=56)	

4.2. Hastaların Vücut Kitle İndekslerine (VKİ) Göre Değerlendirilmesi

4.2.1. Hastaların Vücut Kitle İndekslerine (VKİ) Göre Yaş, HbA1c, Kortizol Hormonu ve Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerlerinin Karşılaştırılması

Çalışmaya aldığımız hastaların 21 tanesinin VKİ 'i 25 in altında, 159 tanesinin VKİ'i 25-30 arasında, 20 tanesinin VKİ'i 30 dan büyüktü. Yaptığımız çalışmada VKİ'i 25-30 arasında olan hastaların yaşı ortalama 30.64 ± 5.18 yıl olup VKİ<25 ve VKİ>30 olan diğer hastalarla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. HbA1c değerlerine baktığımızda ise VKİ<25 kg/m² olan hastaların ortalama değeri 4.8 ± 0.3 , VKİ'i 25-30 kg/m² arasında olan hastaların değeri 5.4 ± 0.2 , VKİ>30 kg/m² olan hastaların ise 5.9 ± 0.3 tir. Buna göre VKİ<25 kg/m² olan hastaların HbA1c değeri anlamlı olarak daha düşük izlenmiştir ($p < 0.01$). Kortizol değerine bakacak olursak; VKİ<25 kg/m² olan hastaların değeri 10.91 ± 4.43 µg/dl, VKİ'i 25-30 kg/m² arasında olanların 9.60 ± 3.92 µg/dl, VKİ>30 kg/m² olan hastaların ise 12.9 ± 6.09 µg/dl dir. Buna göre VKİ<25 kg/m² olan hastaların HbA1c değerleri anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p = 0.04$).

VKİ'i 25-30 kg/m² arasında olan hastaların TAS değeri ortalama 1.18 ± 0.27 µmol Trolox Eq/L olup; VKİ<25 kg/m² ve VKİ>30 kg/m² olan hastalardan istatistiksel olarak farklı bulunmadı. VKİ'i 25-30 kg/m² arasında olan hastaların TOS değerleri ortalama 16.92 ± 10.59 µmol H₂O₂ Eq/L olup; VKİ<25 kg/m² ve VKİ>30 kg/m² olan hastalardan istatistiksel olarak farklı bulunmadı. Hastaların TAS ve TOS değerleri hesaplanarak bulunan OSI değerleri VKİ leri açısından birbirinden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$).

Tablo 6. VKİ'lerine göre hastaların yaş, HbA1c, kortizol Hormonu ve folliküler sıvılarındaki TAS, TOS, OSI değerleri

Değişken	VKİ<25 n=21 (%10.5)	VKİ 25-30 Arası Olan Hastalar n=159 (%79.5)	VKİ>30 Olan Hastalar n=20 (%10)	P değeri
Yaş (yıl)	30.52 ± 5.20	30.64 ± 5.18	31.20 ± 4.46	0.829
HbA1c (%)	4.8 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.9 ± 0.3	<0.01*
Kortizol (µg/dl)	10.91 ± 4.43	9.60 ± 3.92	12.9 ± 6.09	0.04*
TAS (µmol Trolox Eq/L)	1.21 ± 0.36	1.18 ± 0.27	1.32 ± 0.35	0.187
TOS (µmol H ₂ O ₂ Eq/L)	13.80 ± 5.59	16.92 ± 10.59	18.67 ± 15.57	0.346
OSI (arbitrary unit)	1.23 ± 0.58	1.46 ± 0.90	1.42 ± 1.00	0.395

(VKİ: Vücut Kitle İndeksi, HbA1c: Glikozillenmiş hemoglobin, TAS: Total Antioksidan Status, TOS: Total Oksidan Status, OSI: Oksidatif Stres İndeksi)

4.2.2. Hastaların Vücut Kitle İndekslerine (VKİ) Göre Gebelik Durumları ile Embriyo Kalitelerinin Karşılaştırılması

Çalışmaya aldığımız hastaların VKİ<25 kg/m² olanların %28.5 'inde, VKİ'i 25-30 kg/m² arasında olanların %45.9'unda ve VKİ>30 kg/m² olanların %25.6'sında biyokimyasal gebelik oluştu. İstatistiksel olarak aralarında anlamlı fark izlenmedi. Yine VKİ<25 kg/m² olanların %9.5'inde klinik gebelik oluşurken, VKİ'i 25-30 kg/m² arasında olanların % 36.5'inde ve VKİ>30 kg/m² olanların %15'inde klinik gebelik oluştu. VKİ'i 25-30 kg/m² arasında olanlarda klinik gebelik oranı diğerlerine göre istatistiksel olarak yüksek izlendi (p=0.011).

VKİ'lerine göre embriyo durumlarına baktığımız zaman, VKİ<25 kg/m² olan 21 hastanın %16'sında Grade 1 embriyo, VKİ 25-30 kg/m² olan hastaların %0.9'unda, VKİ>30 kg/m² olan hastaların % 9.1'inde Grade1 embriyo oluşurken aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. Yine Grade 2 embriyo oluşum durumlarına baktığımızda VKİ'leri açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05).

Tablo 7. Hastaların VKİ'lerine göre biyokimyasal gebelik oluşması ve klinik gebelik oluşması durumları ile embriyo kalite durumları

Değişken	VKİ<25 n=21 (%10.5)	VKİ 25-30 Arası Olan Hastalar n=159 (%79.5)	VKİ>30 Olan Hastalar n=20 (%10)	P değeri
Biyokimyasal Gebelik Var	%28.5 n=6	%45.9 n=73	%25.6 n=5	0.085
Klinik gebelik Var	%9.5 n=2	%36.5 n=58	%15 n=3	0.011*
Grade 1 Embriyo	%16 n=11	%80.9 n=89	%9.1 n=10	0.852
Grade 2 Embriyo	%11.1 n=10	%77.8 n=70	%11.1 n=10	

4.3. Hastaların Embriyo Durumlarına Göre Değerlendirilmesi

4.3.1. Hastaların Embriyo Kalitelerine Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerleri, Yaş ve Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması

Tüp Bebek Ünitemizi, Embriyoloji bölümündeki embriyologlar yakından takip edildikten sonra değerlendirilip; kaliteleri belirlenen (Grade olarak derecelendirilen) embriyolarla; folikül sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI değerlerini araştırdık.

Yaptığımız çalışmada Grade 1 embriyo transferi yapılan hastalarda TAS değeri ortalama 1.23 ± 0.28 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$; Grade 2 embriyo transferi yapılanlarda bu değer 1.16 ± 0.29 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ olup arada anlamlı istatistiksel fark izlenemedi. Yine Grade 1 embriyo transferi yapılan hastalarda TOS değeri 16.97 ± 11.97 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ olup; Grade 2 embriyo transferi yapılanlarda ise bu değer 16.56 ± 9.10 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ olup arada anlamlı bir fark izlenemedi. TAS ve TOS değerleri hesaplanarak bulunan OSI değerlerine bakıldığında ise Grade 1 embriyo transferi yapılanlarda değer 1.39 ± 0.85 arbitrary unit; Grade 2 embriyo transferi yapılanlarda ise bu değer 1.50 ± 0.90 arbitrary unit olarak bulundu. Her ne kadar Grade 1 embriyoların OSI değeri Grade 2 lere göre ortalaması yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik bulunmadı.

Yaptığımız çalışmada hastaların 84'ünde (%42) biyokimyasal gebelik oluştu. Buna göre Grade 1 embriyo transferi yapılan hastaların %67.9'unda biyokimyasal gebelik oluşurken; Grade 2 embriyo transferi yapılan hastaların %32.1'inde biyokimyasal gebelik oluştu. Grade 1 embriyo transferi yapılan hastaların biyokimyasal gebelik oranları Grade 2 embriyo transferi yapılan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.02$).

Bu çalışmada 63 (%31.5) hastada ise klinik gebelik oluştu. Bu hastaların %71.4'ünde Grade 1 embriyo transferi sonrası klinik gebelik oluşurken; %28.6'sında Grade 2 embriyo transferi sonrası klinik gebelik oluştu. Buna göre Grade 1 embriyo transferi sonrası klinik gebelik oranı, Grade 2 embriyo sonrası klinik gebelik oranına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. ($p=0.001$)

Hastaların embriyo kalitelerine göre yaş durumlarına baktığımız zaman yaşı ortalama 30.06 ± 5.24 yıl olan hastalar Grade 1 embriyo transferi yapılırken, yaşı ortalama 31.49 ± 4.82 yıl olanlara ise Grade 2 embriyo transferi yapıldı. Grade 1 ve Grade 2 embriyo transferi yapılan hastalar arasında her ne kadar Grade 1 embriyo transferi yapılan hastaların yaş ortalaması daha düşük olsa da; embriyo kalitesi açısından yaş bakımından anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 8. Hastaların embriyo kalitelerine göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS, OSI değerleri, biyokimyasal gebelik, klinik gebelik durumları ile yaş durumları

Değişken	Grade 1 Embriyo n=110	Grade 2 Embriyo n=90	P değeri
TAS ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$)	1.23 $\pm$ 0.28	1.16 $\pm$ 0.29	0.099
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$)	16.97 $\pm$ 11.97	16.56 $\pm$ 9.10	0.368
OSI (arbitrary unit)	1.39 $\pm$ 0.85	1.50 $\pm$ 0.90	0.146
Biyokimyasal gebelik var	%67.9 n= 57	%32.1 n=27	0.02*
Klinik gebelik var	%71.4 n=45	%28.6 n=18	
Yaş (yıl)	30.06 $\pm$ 5.24	31.49 $\pm$ 4.82	0.060

(TAS:Total Antioxdan Status, TOS:Total Oxidan Status, OSI:Oksidatif Stres İndeksi)

4.3.2. Hastaların Embriyo Kalitelerine Göre 12. gün hCG ve Progesteron Değerlerinin Karşılaştırılması

Grade 1 embriyo transferi yapılan hastalarda bakılan 12.gün Hcg değeri maksimum 413.3mIU/mL iken minimum 0.0 mIU/mL idi; Grade 2 embriyo transferi yapılanlarda bu değer maksimum 248.61 mIU/mL iken minimum 0.0 mIU/mL idi.Grade 1 embriyo transferi sonrası Hcg değeri, istatistiksel olarak Grade 2'den yüksek olarak değerlendirildi(p=0.008). Yine Grade 1 embriyo sonrası 12.gün bakılan Progesteron değeri maksimum 44.5ng/ml iken minimum 0.55ng/ml idi.Grade 2 embriyo transferi sonrası ise maksimum 42.2ng/ml iken minimum 0.12ng/ml idi.p=0.002 olan bu karşılaştırmada Grade 1 embriyo transferi sonrası 12.gün bakılan Progesteron değeri anlamlı olarak yükseldi (p=0.002).

Tablo 9. Hastaların embriyo kalitelerine göre transfer sonrası 12.gün bakılan Hcg ve Progesteron değerleri

Değişken	Grade 1 Embriyo n=110 (%55)	Grade 2 Embriyo n=90 (%45)	P değeri
12.Gün Hcg (mIU/mL)	Max:413.3 Min:0.0	Max:248.61 Min:0.0	0.008*
12.Gün Progesteron (ng/mL)	Max:44.5 Min:0.55	Max:42.2 Min:0.12	0.002*

(Hcg: İnsan Koryonik Gonadotropin, Min:Minimum, Max:Maksimum)

4.3.3. Hastaların Transfer Edilen Embriyo Sayılarına Göre Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması

Yaptığımız çalışmada hastaların yaş, primer/sekonder infertilite ve embriyo durumları gözetilerek hastalara 1 veya 2 embriyo transferi yapıldı. 131 (%65) hastaya 1 embriyo transferi yapılırken; 69 (%34.5) hastaya 2 embriyo transferi yapıldı.

1 embriyo transferi yapılan hastaların %41.2'sinde biyokimyasal gebelik oluşurken; 2 embriyo transferi yapılan hastaların 43.7'sinde biyokimyasal gebelik oluştu. İstatiksel olarak arada anlamlı bir fark bulunmadı. 1 embriyo transferi yapılan hastaların %31.2'sinde klinik gebelik durumu oluşurken; 2 embriyo transferi yapılan hastaların %31.8'inde oluştu. Arada anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$)

Tablo 10. Embriyo transfer sayılarına göre biyokimyasal gebelik ve klinik gebelik durumları

Değişken	1 Embriyo Transferi n=131 (%65.5)	2 Embriyo Transferi n=69 (%34.5)	P Değeri
Biyokimyasal gebelik var	%41.2 n=54	%43.7 n=30	0.759
Klinik gebelik var	%31.2 n=41	%31.8 n=22	0.932

4.4. Hastaların Mesleklerine Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI Değerleri ile Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması

Çalışmaya aldığımız 200 hastanın 73 tanesi (%36.5) çalışan kadın olup; 127 (%63.5) tanesi de ev hanımıdır. Buna göre hastaların folliküler sıvılarından çalıştığımız TAS, TOS, OSI değerleri ile hastaların gebeileik durumlarını değerlendirdik.

Çalışmamıza göre çalışan kadın hastalarda TAS değeri ortalama 1.19 ± 0.31 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ olup; ev hanımı olan hastaların ise 1.20 ± 0.28 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ olup, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır. TOS değerlerine bakacak olursak çalışan hasta grubunda ortalama 17.24 ± 12.14 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ olup; ev hanımı olan hasta grubunda ise 16.52 ± 9.91 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ dir. Yine aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. TAS ve TOS değerleriyle hesaplanan OSI değerlerine bakacak olursak çalışan hasta grubunda 1.46 ± 0.86 arbitrary unit ; ev hanımı hasta grubunda 1.42 ± 0.88 arbitrary unittir. Her ne kadar OSI değerleri çalışan hasta

grubunda sayısal olarak daha yüksek görünse de ev hanımı hasta grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Çalışan hastaların %34.5’inde biyokimyasal gebelik oluşurken; ev hanımı olan hastaların %65.5’inde biyokimyasal gebelik oluştu ve arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Klinik gebelik durumu çalışan hastaların %31.7’sinde oluşurken; ev hanımı olan hastaların %68.3’ünde klinik gebelik oluştu. Oran olarak hem biyokimyasal gebelik hem de klinik gebelik durumu ev hanımı olan hastalarda daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 11. Hastaların mesleklerine göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI değerleri ile biyokimyasal gebelik ve klinik gebelik durumları

Değişken	Çalışan Kadın Hasta n=73	Ev Hanımı Olan Hasta n=127	P Değeri
TAS ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$)	1.19 $\pm$ 0.31	1.20 $\pm$ 0.28	0.302
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$)	17.24 $\pm$ 12.14	16.52 $\pm$ 9.91	0.953
OSI (arbitrary unit)	1.46 $\pm$ 0.86	1.42 $\pm$ 0.88	0.954
Biyokimyasal gebelik var	%34.5 n=29	%65.5 n= 55	0.621
Klinik gebelik var	%31.7 n= 20	%68.3 n= 43	0.344

(TAS: Total Antioxidan Status, TOS:Total Oxidan Status, OSI:Oksidatif Stres Indeksi)

4.5. Hastaların Primer/Sekonder İnfertilite Durumlarına Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS, OSI Değerleri ile Gebelik Durumlarının Karşılaştırılması

Primer infertilite, reproduktif çağda olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır; sekonder infertilite ise bir gebelik veya doğumdan bir yıldan fazla süre geçtikten sonra tekrar gebelik olamaması durumudur (WHO). Çalışmaya aldığımız 200 hastanın 158 (%79) tanesi primer infertil olup; 42 (%21) tanesi sekonder infertildi.

Primer infertil hastaların TAS değeri ortalama 1.207 $\pm$ 0.29 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ olup sekonder infertil hastalarınki 1.18 $\pm$ 0.28 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ dir. Her ne kadar ortalama primer infertil hastalarda daha yüksek olarak bulunsa da aralarında anlamlı

bir fark bulunmadı. Primer infertil hastaların TOS değerleri 16.88 ± 10.8 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L; sekonder infertil hastaların ise 16.4 ± 10.3 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L'dir. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. TAS ve TOS değerleri ile hesaplanan OSI değerleri bakıldığında da primer ve sekonder infertil hastalar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.955$).

Primer infertil hastaların %41.7'sinde biyokimyasal gebelik oluşurken; sekonder infertil hastaların %42.8'inde biyokimyasal gebelik oluştu. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Primer infertil hastaların %32.9'unda klinik gebelik oluşurken; sekonder infertil hastaların %26.1'inde klinik gebelik oluştu. Her ne kadar bu oran primer infertil hastalarda daha yüksek olsa da istatistiksel olarak arada anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 12. Hastaların primer/sekonder infertilite durumlarına göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS, OSI değerleri ile gebelik durumları

Değişken	Primer İnfertil Hasta n=158 (%79)	Sekonder İnfertil Hasta n=42 (%21)	P değeri
TAS ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$)	1.207 ± 0.29	1.18 ± 0.28	0.719
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	16.88 ± 10.8	16.4 ± 10.3	0.798
OSI (arbitrary unit)	1.44 ± 0.88	1.43 ± 0.87	0.955
Biyokimyasal gebelik var	%41.7 n=66	%42.8 n=18	0.899
Klinik gebelik var	%32.9 n=52	%26.1 n=11	0.405

(TAS: Total Antioxidan Status, TOS: Total Oxidan Status, OSI: Oksidatif Stres İndeksi)

4.6. Hastaların Gebelik Durumlarına Göre Folliküler Sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI Değerleriyle Birlikte Yaş Durumunun Karşılaştırılması

Çalışmaya aldığımız hastaların %42'sinde gebelik oluşurken; %58'inde gebelik hiç oluşmadı. Buna göre gebelik durumu olan hastaların ortalama TAS değerleri 1.23 ± 0.27 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ iken gebelik durumu olmayan hastaların ortalama TAS değeri 1.17 ± 0.30 $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ idi. Gebelik durumu olan hastaların TAS değerleri, gebelik durumu olmayan hastalardan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.032$). Gebelik durumu olan hastaların TAS değerlerinin daha yüksek olduğu, bununla birlikte bu hastaların yaş ortalamasının 29.98 ± 4.51 yıl şeklinde daha düşük olduğu görüldü.

Gebelik durumu olan hastaların ortalama TOS değeri 10.17 ± 10.74 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L olup; gebelik durumu olmayanlarda ise bu değer 16.49 ± 10.80 idi. TOS değeri gebelik durumu olmayan hastalardan her ne kadar yüksek görünse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Osi değerlerine baktığımızda da gebelik durumu olan hastalarda bu değer 1.42 ± 0.83 arbitrary unit iken, gebelik durumu olmayanlarda bu değer 1.45 ± 0.91 arbitrary unit olup daha yüksek görünse de aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.

Yaş durumuna baktığımızda gebelik durumu olan hastaların yaş ortalaması 29.98 ± 4.51 yıl iken; gebelik durumu olmayan hastaların yaş ortalaması 31.23 ± 5.44 yıl idi. Her ne kadar gebelik durumu olan hastaların yaş ortalaması daha düşük görölse de aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 13. Hastaların gebelik durumlarına göre folliküler sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI değerleri ile yaş durumu

Değişken	Gebelik Durumu Var n=84 (%42)	Gebelik Durumu Yok n=116 (%58)	P değeri
TAS ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$)	1.23 ± 0.27	1.17 ± 0.30	0.032*
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	10.17 ± 10.74	16.49 ± 10.80	0.306
OSI (arbitrary unit)	1.42 ± 0.83	1.45 ± 0.91	0.907
Yaş (yıl)	29.98 ± 4.51	31.23 ± 5.44	0.116

(TAS: Total Antioxidan Status, TOS: Total Oxidan Status, OSI: Oksidatif Stres İndeksi)

4.7. Hastaların Gebelik Durumlarına Göre Eşlerinin Spermiogram Sonuçlarının Karşılaştırılması

Açıklanamayan infertilitesi olan seçilmiş 200 hastanın eşlerinin spermiogramları WHO sınıflamasına göre incelendiğinde ve Üroloji Kliniği'ne konsülte edildiğinde patolojik bulgu izlenmediğinden daha önce bahsetmiştik. Buna göre infertilite nedeni erkek faktörü olmayan bu hastalardan; gebelik durumu olan hastaların eşlerinin sperm konsantrasyonlarının ortalaması 34.76 ± 10.23 milyon/ mL iken; gebelik durumu olmayanlarda ise bu sayı 33.55 ± 10.50 milyon/mL dir. Gebe kalma durumları açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Gebelik durumu olan hastaların eşlerinin spermiogramlarındaki total sperm sayısı ortalama 120.42 ± 48.72 milyon/mL olup gebelik durumu olmayanlara göre daha yüksek olsa da istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. Sperm

hareketliliğine bakıldığında da gebelik durumu olan hastaların ortalaması 44.69 ± 4.94 iken; gebelik durumu olmayanlarda bu değer 44.41 ± 4.65 olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 14. Hastaların gebelik durumlarına göre sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı ve sperm hareketlilik durumu

Değişken	Gebelik Durumu Var n=84 (%42)	Gebelik Durumu Yok n=116 (%58)	P değeri
Sperm Konsantrasyonu (Milyon/ mL)	34.76 ± 10.23	33.55 ± 10.50	0.272
Total Sperm Sayısı (Milyon/ mL)	120.42 ± 48.72	113.21 ± 43.44	0.417
Hareketlilik (%)	44.69 ± 4.94	44.41 ± 4.65	0.665

5. TARTIŞMA

Açıklanamayan infertilite, 1 yıl korunmasız düzenli cinsel ilişki sonrası gebelik elde edemeyen çiftlerde yapılan temel değerlendirmede (sperm analizi, ovulasyon testleri, kavite ve tubalarda patoloji olmadığını gösteren histerosalfingografi) herhangi bir patolojiye rastlanmaması olarak tanımlanmaktadır (12). Açıklanamayan infertilite; endokrinolojik, immünolojik ve genetik faktörleri de içeren, araştırılması gereken heterojenik föktörlü bir infertilite nedenidir (196).

Bizim çalışmaya aldığımız 200 hastanın daha önce belirttiğimiz gibi geniş kapsamlı olarak infertilite oluşturabilecek nedenleri araştırıldı ve sonuçta açıklanamayan infertilitesi olduğu anlaşıldı. Bu hastalara kliniğimizde veya kliniğimize başvurmada önce başka kliniklerde en az 2 kez Intra Uterin İnseminasyon (IUI) tedavisi uygulanmış olup sonuçta sağlıklı klinik gebelik elde edilememiştir. Bunun üzerine uygun olan hastalara bilgi verilip onamları alınarak kontrollü ovaryan stimülasyon başlandı ve IVF/ICSI protokolleri uygulandı. Bu hastalardan Oosit Pick-Up (OPU) günlerinde oosit içermeyen atık folikül sıvılarından örnek toplandı ve tedavi sürecinde hastaların hormon seviyeleri, yaşı, VKİ, mesleği, eşlerinin sperm analizi gibi parametrelere bakıldı. Daha sonra biyokimya laboratuvarında hastaların atık folikül sıvılarında Total Oksidan Status, Total Antioksidan Status ve Oksidatif Stres İndeksi düzeylerine bakıldı. Bu düzeylerin, transfer edilen embriyo grade ve sayılarına da bakılarak biyokimyasal ve klinik gebelikte anlamlı sonuçlar doğurabileceği ve böylece antioksidan tedavinin tüp bebek tedavisinde rol oynayabileceği araştırılmak istendi.

Yaptığımız çalışmaya göre en öncelikli olarak, sigara kullanımı alışkanlıkları gibi oksidatif stres atında olan hastaların atık folliküler sıvılarındaki TAS ,TOS ve OSI düzeyleri incelendiğinde sigara kullanan hastalarda kullanmayanlara göre TOS ve OSI düzeyi anlamlı şekilde yüksek, TAS değeri ise anlamlı şekilde düşüktü. Sonuçlara baktığımızda bu durum, her ne kadar embriyo kalitelerini anlamlı şekilde değıştirmese de embriyo transferi sonrası bakılan biyokimyasal ve klinik gebelik oranlarının her ikisini de sigara kullanımı anlamlı şekilde olumsuz etkiledi. Yine gebelik oluşa ve hiç oluşmayan hastaların TAS, TOS ve OSI değerlerine baktığımızda özellikle TAS seviyesi gebe kalanlarda, kalamayanlara göre anlamlı derecede yüksekti. Bu da bize TAS seviyesiyle gebelik oluşumunun pzitif şekilde korele olduğunu gösterdi. Bu da

demek oluyor ki hastalar, IVF/ICSI siklus tedavilerine başladıklarında bu parametrelere bakılarak, hastaları oksidatif stresten uzak tutup, antioksidan takviyesi başlamanın yararlı olabileceği fikri önerilmekle beraber, antioksidan ajanların kullanımı sonucunda oluşan gebelik oranlarına daha gerçekçi yaklaşmak için daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç var gibi görünmektedir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastalar içine; her ne kadar makroskopik bulguları olan, şiddetli klinik şikayetleri olan, tanı almış endometriyozisli hastaları dahil etmemiş olsak da açıklanamayan infertilitenin nedenlerinden birinin evre 1 minimal endometriyozis ve evre 2 hafif endometriyozis olduğunu hatırlamamız gerekir. Andrade AZ. ve arkadaşları (ark.) yaptıkları bir çalışmada endometriyozisli hastaların folliküler sıvılarındaki hidrojen peroksit düzeylerinin yüksek olduğunu ve buna bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinde yükselme olduğunu, bu yüzden infertilite oluştuğunu belirttiler (197). Ayrıca Murphy ve ark. yaptıkları bir çalışmada makrofaj, demir ve çevresel kimyasal kirlilik yaratan etkenler arasındaki dengesizliğin, ROS ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese ve endometriyozis oluşumuna yol açtığı, böylece infertilitenin ortaya çıktığı belirtildi (198). Ayrıca başka bir çalışmada endometriyozisli hastaların folliküler sıvısında (FS/FF) yüksek ROS seviyesi artışı ile kötü embriyo kalitesi korele görülürken; bu durum idiopatik infertil kadınlarda da aynı şekilde görülmüştür (199).

Bizim çalışmamızda embriyo kalitesi Grade 1 olan hastaların biyokimyasal ve klinik gebelik oranları Grade 2 embriyo transferi yapılan hastalara göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.02$).Yine bizim çalışmamızda embriyo kalitesi arttıkça transfer sonrası bakılan 12.gün hcg ve progesteron düzeyleriyle birlikte biyokimyasal ve klinik gebelik oranları da artmış olarak bulundu.

Oyawoye ve ark. yaptığı bir çalışmada foliküllerin büyümesine yol açan total antioksidan seviyelerindeki düşüşün, yüksek kaliteli oositle oluşan canlı gebeliklerde daha düşük oranda olduğu, bununla birlikte, bugüne kadar antioksidan belirteçlerinin güvenilir ana etkisinin tespit edilmediği belirtildi (11). Bizim çalışmamızda ise Grade 1 ve Grade 2 embriyo transferi yapılan hastaların bakılan folliküler sıvılarındaki TAS, TOS ve OSI değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Yapılan başka bir çalışmada ise; olgun oosit oluşumu ve embriyonun hayatta kalması neredeyse sadece önceden var olan maternal birikimlere bağlıdır. mRNA, proteinler ve diğer faktörler, özellikle mitokondri, oosit büyümesi ve olgunlaşması sırasında birikmiş ve bu bileşenler eksik, işlevsiz veya anormal çalışıyorsa embriyo kalitesini düşürüyor demektir (200). Diğer bir çalışmada 35 yaş üstü infertil hastalarda anormal oosit üretimi, mitokondriyal aktivite bozukluğu ve üretimi azalmış olan ATP, normal embriyo gelişimini sınırlar. Mitokondriyal havuz sisteminin bozulması ile oksidatif stresin artması ve zayıf kalitede embriyo gelişimi sağlayabileceği belirtildi (201). Bizim yaptığımız çalışmada her ne kadar Grade 1 embriyo transferi yapılan hastaların yaş ortalaması daha küçük olsa da yaşla birlikte embriyo kaliteleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

Ayrıca başka bir çalışmada, konvansiyonel IVF uygulanan çiftlerde; düşük sperm kalitesinin düşük blastokist formasyon oranı ve kötü blastokist morfolojisine dolayısıyla düşük kaliteli embriyo oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (202). Yine yapılan bir çalışmada hava kalitesinin tüp bebek tedavisinde başarı oranını etkilediği bildirilmiştir. Tarihten de bir örnek verecek olursak; 1994 yılında inşaat yapılan hastanedeki tüp bebek kliniğinde gebelik oranları %35'ten %16'ya inmiştir. Bu durum bize bir kere daha fertilizasyon oranlarının; hücre evre gelişmesi ile oosit ve embriyoların yüksek kaliteli havayla maruziyetinde arttığını gösterir. Sonuç olarak hava kalitesi arttıkça klinik gebelik oranları da artmaktadır (203). Anlaşılan o ki embriyo kalitesini belirleyen nedenler daha çok; anne yaşı, spermiogramdaki DNA kusurları, çevresel oksidatif strese maruziyet, sigara kullanımı gibi nedenlerin üzerinde durulsa da tam olarak bu konu aydınlatılmış olmayıp, daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bizim yaptığımız çalışmada tüm embriyolar 3.gün embriyosu olarak transfer edildi. Bizim çalışmamıza göre 3.gün embriyo transferi başarı oranına bakacak olursa 200 hastanın 84'ünde (%42'sinde) gebelik durumu oluştu, 116'sında (%58'inde) gebelik oluşmadı. Bu hastaların 63'ünde (%31.5'inde) klinik gebelik oluştu. Genel olarak baktığımızda gebelik oluşma durumu olarak baktığımızda çalışmamızın başarısı %42 dir. Yapılan çalışmalara baktığımızda 5. gün embriyo transferinin gebelik ve implantasyon oranlarını iyileştirmediği, tersine olumsuz etkilediğini ileri süren çalışmalar da mevcuttur. Ayrıca, 3. gün 8 hücreli embriyo yok ise veya hepsininin

morfolojileri bozuk ve kaliteleri düşük ise böyle embriyoların uterusu transfer edilerek kurtarılabileceği belirtildi (204). Ashrafi ve ark. (205) ile Edwards ve ark. (206) 3.gün transferinde gebelik oranlarının daha yüksek bulmalarına rağmen istatistiki olarak 5.güne göre anlamlı bir yükseklik saptamadılar. Carrillo ve ark. 2 ve 3. gün embriyo transferini karşılaştırdılar ve biyokimyasal/klinik gebelik oranlarını 3. gün transferinde anlamlı olarak yüksek buldular (%44'e karşın %26); ancak bu çalışmaya sadece yüksek oosit sayısı elde edilen hastalar dahil edilmiştir (207). Bizim çalışmamız da gebelik oluşma durumu olarak baktığımızda 3.gün ET'nin %42 başarılı olduğunu gösterdi.

Milki ve ark. (208) yaptığı bir çalışmada gelişen kültür ortamları sayesinde embriyoları dış ortamda daha uzun süre geliştirmenin mümkün olduğunu gösterilmiştir. Embriyoların seçimi hem morfolojik kriterlere göre hem de viabl kalma potansiyellerine bağlı olduğu belirlendi. Bu sonuca göre 5. gün transferlerinde, her embriyo başına daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları olduğu bildirildi. Bu sayede blastokist transferi ile multiple embriyo transferi gerekliliği azalır; böylece çoğul gebelik sıklığı oldukça azalır. Laverge ve ark. ise yaptığı bir çalışmada ise embriyoların 3. günde uterusu transfer edilmesi daha avantajlıdır; çünkü 2 günlük embriyoya göre fizyolojik zamanlamaya daha yakındır. Ayrıca ET süresini uzatmak, transfer için en uygun embriyoyu seçme ihtimalini arttırır. Aboulghar MM. Ve ark. yaptığı çalışmaya göre embriyoları in vitro kültürlerde 24 saat daha bekletmek, kötü kalitedeki ve gelişimi duran embriyoların eliminasyonunu sağlayabilir (209). Bizim çalışmamız da 3.gün embriyo transferini destekliyor gibi görünse de embriyonun hangi gün transfer edilmesi konusunda otörler tarafından net bir görüş birliği sağlanamamış olup; daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç var gibi görünüyor.

Bizim çalışmamızda transfer edilen embriyo sayılarına göre gebelik başarı durumlarına baktığımızda; 1 embriyo transferi yapılan hastaların %41.2'sinde gebelik durumu oluşurken; %31.2'sinde klinik gebelik oluştu. 2 embriyo transferi yapılan hastaların ise %43.7'sinde gebelik durumu oluşurken, %31.8'inde klinik gebelik oluşmuş olup her ne kadar 2 embriyo transferi yapılan hastalarda gebelik durumu daha yüksek oranda bulunsa da tek embriyo ve 2 embriyo transferi sonrası gebelik başarısı arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Bizim çalışmamızda 2 embriyo transferi sonrası oluşabilecek maternal ve fetal komplikasyonlar gözetilerek hastaların klinik durumu,

yaşı ve özel durumu göz önüne alınarak kliniğimizde tek embriyo transferine öncelik verildi. Bizim çalışmamızı da destekler nitelikte bir çalışmaya bakacak olursak; tek embriyo transferi sonrası zigotik bölünme ihtimali nedeniyle çoğul gebelik riski her zaman vardır (210). Özellikle IVF-ICSI blastocyst transferlerinde monozigotik ikiz insidansı artmıştır (214). Başka bir çalışmada ise, iki veya daha fazla embriyo transferi yapılan hastalarda artan oranda, erken doğumlar ve bu çocuklar arasında ciddi kronik hastalıkların, zihinsel ve fiziksel anormalliklerin ve düşük doğum ağırlığının daha fazla olduğu izlendi (211,212). Fakat bununla birlikte, tek embriyo transferi sonrası zigotik bölünme ihtimali nedeniyle çoğul gebelik riski her zaman vardır (213). Özellikle IVF-ICSI blastokist transferlerinde monozigotik ikiz insidansı artmıştır (214).

İngiltere’de yapılan bir çalışmada, IVF uygulamalarını düzenleyen Human Embryology and Fertilization Authority, ikiz canlı doğum oranlarının % 10’nun altında olması gerektiğini ortak ulusal bir hedef olarak tavsiye ediyor (HFEA, 2012). Canlı doğum ve çoğul doğum oranlarında yaşın etkisi hakkında yapılan geniş prospektif bir çalışma, çoğul doğumlar ile ilişkili olarak ileri yaş; özellikle 40 yaşından büyük kadınlarda erken doğum ve düşük doğum ağırlığı riskinin düşük olduğunu gösterdi ve bu durum iki embriyo transferi seçeneğinin ileri yaş kadınlar açısından daha uygun olabileceğini gösterdi (215). Fakat başka bir çalışmada, assisted reproductive technology ikizlerinde erken doğum olma ihtimali, düşük doğum ağırlığı ve perinatal ölüm gibi risklerin; farklı cinsiyette ikizlere spontan gebe kalanlardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir (216). Ayrıca başka bir çalışmaya göre de 40 yaş üstü hastalarda preeklampsi, eklampsi, maternal hipertansiyon hastalık riski, gestasyonel diyabet çoğul gebeliklerde anlamlı olarak yüksektir (217).

Çoğul gebelik ile ilgili tüm endişelere rağmen, Amerikan üreme Tıbbı Derneği önerisi, iyi prognoz hastaları için iki embriyoya kadar aktarılmasını önermektedir (Amerikan üreme Tıbbı Derneği uygulama Komitesi, Yardımlı üreme teknolojisi Derneği uygulama Komitesi, 2013). Yapılan yeni bir çalışmada başarısız tek bir taze embriyo transferi sonrasında dondurulmuş tek ve çift embriyo transferi sonrası klinik gebelik başarısı açısından anlamlı bir fark bulunamadı (218). Bizim çalışmamız da bu çalışmayı destekler nitelikte olup yine de transfer edilecek embriyo sayısı konusunda görüş birliği sağlanamamıştır.

Bizim çalışmamızda sigara kullanan hastalarda ortalama AMH değeri 2.13 ± 0.96 ng/ml olup sigara kullananlarda bu değer 2.23 ± 0.93 ng/ml olup arada anlamlı bir fark bulunamadı. Çalışmamızın aksine Freour ve ark. yaptıkları çalışmada sigara içen ve içmeyen hastaların adet döngüsünün 3.gününde FSH, östradiol ve Anti-Müllerian Hormon (AMH) seviyelerini karşılaştırdılar ve AMH'nin sigara içenlerde önemli ölçüde daha düşük olduğunu buldular (219). Nikotine maruz kalan bir fare modelinde Mailhes ve ark. metafaz II aşamasındaki oositlerde kromozomal anormalliklerin oranını inceledi. Sigara dumanına maruz bırakılmamış farelerde, prematüre kromatid ayırma ve prematüre anafaz oranları sırasıyla 4.6 ve %0.3 iken, yüksek nikotin seviyelerine maruz kalan grupta oranlar sırasıyla 9.2 ve %5.4 idi (220). Nikotine maruz kaldıktan sonra daha yüksek morfolojik oosit anormallikleri ve yüksek anöploid oranları gözlemlendi. Duman metabolitlerinin kumulus-oosit kompleksi (coc) ve nükleer olgunlaşma üzerindeki zararlı etkileri olduğunu düşündürdü.

Bugüne kadar yapılan bir çok çalışmada sigara dumanı bileşiği foliküler sıvı örneklerinde tespit edilmiştir. Zenzes ve ark. (221) yaptıkları bir çalışmada foliküler nikotin seviyeleri ile sigara tüketimi oranı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirtti. Yine Zenzes ve ark. (222) başka bir çalışmada sigara içenlerde yumurtalık dokusunda ve foliküler sıvıda sigara içmeyenlere göre daha yüksek seviyelerde TOS ve OSI tespit edildi. Bütün bu çalışmalar, foliküler sıvı ve yumurtalık hücrelerinin toksik bileşikler koruduğu ve folikül büyümesi ile oosit olgunlaşması için içilen sigara miktarına bağlı olarak farklı derecelerde toksik bir ortam yarattığına karar vermemizi sağlayabilir. Bu çalışmayı destekler nitelikte bizim çalışmamızda da sigara kullanan hastaların OPU günlerinde toplanan atık folliküler sıvılarından çalışılan TAS değeri anlamlı olarak sigara kullanamayanlara göre çok anlamlı olarak düşük olup; TOS ve OSI değerleri ise sigara kullananlarda, kullanmayanlara göre çok anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.01$).

Yaptığımız çalışmada sigara kullanma durumlarına göre hastaların bazal hormonları, AMH, Androstenedion düzeyleri arasında anlamlı fark yokken sadece TSH düzeyleri sigara kullanan hastalarda kullanmayanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. T4 değeri ise anlamlı değildi. TSH düzeyi ve infertilite konusunda kesin bir çizgi olmadığı bilinse de Karmon ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre sigara kullanan hastalarda artmış TSH düzeylerinin gebe spontan gebe kalmanın zorlaştığı ve

spontan abortus ile ters ilişkili olduğunu tespit etti (223). Aksine Reh ve ark. ise TSH düzeyi 0.4–2.4 mIU/L olan hastalarla 2.5 mIU/L< olan hastalar arasında klinik gebelik oluşması bakımından anlamlı bir fark oluşmadı (224). IUI ve IVF durumunda gebelik sonuçları üzerindeki TSH’ın rolü halen daha yaygın olarak tartışılmaktadır.

Bizim çalışmamızda hastaların folliküler sıvılarındaki TAS/TOS/OSI düzeylerine göre gebelik oranlarına baktığımızda gebelik durumu olan hastalarda TAS seviyesi, gebelik durumu hiç olmayan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Fakat TOS ve OSI düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmadı. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada çinkonun (Zn) antioksidan olarak foliküler sıvıdaki önemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) arabuluculuğu yoluyla oksidatif stresin hafifletilmesinde biyolojik rol oynamasıdır. Bu çalışmada domuz blastokistlerinin in vitro olgunlaşması (IVM) sırasında Zn destekli kültürlerin, olgun oositlerde ROS seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü izlendi; bu durumun muhtemelen artmış süperoksit dismutaz (SOD) faaliyetleri ve daha yüksek hücre içi glutatyon seviyelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (225). Benzer şekilde, başka bir çalışmada, Zn ortam takviyesinin (3.6–19 µmol) daha kaliteli fare embriyolarıyla ilişkili olduğu düşünüldü, ancak daha yüksek konsantrasyonlardaki çinkonun (25 µmol) embriyotoksik olduğu izlendi (226).

Bizi çalışmamızı yine destekler nitelikte El-Far M ve ark. ise hastalarda oksidan madde ve antioksidan ajanlardan glutatyon, glutatyon redüktaz, katalaz, superoksit dismutaz, nitrik oksid (NO) ve malondialdehid (MDA) seviyelerini değerlendirmişler, gebelik oluşmayan veya gebelik kaybı olan hastalarda azalmış antioksidan seviyesi olarak; artmış NO, MDA saptamışlardır (227). Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da fragmente embriyolar ile nonfragmente embriyolar kıyaslanmış, sonuçta fragmente embriyolarda hidrojen peroksit ve oksidan düzeyinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (191).

Yapılan çalışmaların çoğunda oosit ve embriyo kalitelerini incelenerek sonuçta düşük döllenme oranı ile ilişkili olarak FF’da Total Antioksidan Kapasitenin (TAC) önemli ölçüde azaldığı gösterildi. Bunlardan bazılarına bakacak olursak; Nishihara T. ve ark. yaptıkları bir çalışmaya göre antioksidan takviyesi, hastalarda GSH seviyelerini etkili bir şekilde artırabilir ve 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) seviyelerini düşürebilir; böylece başarılı IVF-ET sonuçlarına neden olabilir. Oksidatif

stres oluşturan ve bunu dengeleyen anti oksidanların miktarlarının ve faaliyetlerinin ölçülmesinin önemini değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır (228). Seino ve ark. ise granuloza hücrelerindeki 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) düzeyinin (oksidatif DNA hasarı yapan ajan) fertilizasyon oranları, oosit kalitesi ve embriyo kalitesi ile negatif korelasyon gösterdiğini belirttiler (229). Bizim çalışmamızda ise her ne kadar gebelik oluşmayan hastalarda oluşanlara göre folliküler oksidan ajanlar yüksek bulunmasa da; sigara kullanan hastalarda ise bu çalışmayı destekler şekilde sigara kullanmayanlara göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca yine çalışmamızda bu çalışmayı destekler nitelikte oksidatif strese maruz kalma açısından sigara kullanan hastalarda fertilizasyon oranı anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Sigara kullanımı açısından yapılan çalışmaların çoğu bizim klinik çalışmamızı desteklese de bu konuda daha çok randomize kontrollü çalışma yapılması gerekli gibi görünüyor.

Yaptığımız çalışmaya her ne kadar Diabetes Mellitus gibi endokrin sistemle ilgili hastalığı olan hastaları dahil etmesek de hastaların HbA1c ve kortizol düzeylerine de araştırmak için baktık. Buna göre VKİ>30 kg/m² olan hastalarda HbA1c ve kortizol düzeyleri VKİ<25 kg/m² ve VKİ 25-30 kg/m² olan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ve bu hastalarda klinik gebelik olma durumu özellikle VKİ normal olan hastalara göre anlamlı olarak düşük bulundu (p=0.011). Kortizol düzeyi ve IVF başarısı konusunda kısıtlı çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmaya göre; hastaların üç IVF tedavi döngüsü aralıklarında gece idrarı ve ilk sabah idrarları toplandı; sonuçlara göre gebe ve gebe olmayan kadınlar arasında kortizol için önemli bir fark saptanmadı, ancak adrenalin için ters bir ilişki tanımlandı. Ve bu sonuçlar, sempatik sinir sisteminden ve adrenal medulla'dan (tükrük α -amilaz ve adrenalin ile ölçüldüğü gibi) ve doğurganlık için adrenal korteksten (kortizol ile ölçüldüğü gibi) salgılanan hormonların farklı roller aldığını düşündürdü (230). Fakat yine de kortizol düzeyinin gebelik sonuçlarına etkisi konusunda kısıtlı çalışma olduğundan, daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç vardır.

Machtinger R. ve ark. yaptıkları bir çalışmada gazlı içecek ve şekerli besinle beslenen VKİ yüksek olarak bulunan hastalarda yüksek hiperglisemi altında kalan metobizma sonucu yüksek HbA1c düzeyi olan hastaları, normal HbA1c ve normal VKİ olan hastalara karşı kıyasladıklarında; insülin direnci yüksek olan bu hastalarda

IVF tedavisi sonucu gebelik oranının ve eve canlı bebek götürme oranının daha düşük olarak izlendiğini buldular ve IVF öncesi hazırlık sürecinde şekerli ve asitli yiyecek ve içeceklerden ayrıca kafein tüketiminden uzak durulması gerektiğini vurguladılar (231). Bizim çalışmamız da HbA1c yüksekliği olan hastalarda gebelik durumunun daha düşük oranda olması da bu sonucun doğru olabileceğini destekledi.

Wang ve arkadaşları, transfer edilen embriyo kaliteleriyle ilgili olarak; VKİ yüksek olan hastalarda embriyo kalitesinin daha düşük olduğunu söylemişlerdir (232). Aksine bizim yaptığımız çalışmada ise VKİ durumlarına göre hastaların embriyo kaliteleri açısından arada anlamlı bir fark bulunmadı.

Hany Lashen ve ark. yaptığı bir çalışmada VKİ>27 kg/m² olan hastalarla VKİ<27 kg/m² olan hastaların fertilizasyon ve klinik gebelik durumlarını kıyaslamış ve anlamlı bir fark bulmamıştır (233). Aksine bizim çalışmamızda ise VKİ normal olan hastalarda özellikle VKİ>30 kg/m² olan hastalara göre klinik gebelik oranları anlamlı yüksek bulundu. Sonuç olarak VKİ'nin infertilitedeki ve IVF başarısındaki öneminin ne kadar olduğunu anlamak için daha geniş kapsamlı prospektif çalışmalara gerek var gibi görünüyor.

Çalışmamızda hastaların sosyo ekonomik statülerine baktığımızda gebelik oranları açısından ev hanımı ve çalışmayan kadınlar açısından biyokimyasal ve klinik gebelik oranları ev hanımı olan kadınlarda oran olarak yüksek olsa da aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. Destekler tarzda yine yapılan bir çalışmaya göre ise embriyo transferi sonrası iş hayatına devam eden ve sürekli istirahat halinde bulunmayan hastalarda IVF tedavisi sonrası gebelik başarısı açısından ev hanımı olan hastalara göre aralarında anlamlı bir fark bulunmadı (234). Aksine başka bir çalışmada ise, hareket halinde olup düzenli egzersiz yapan ve çalışan hastalarda IVF sikluslarının sonunda gebelik oranlarının; çalışmayan ve daha hareketsiz olan hastalara oranla daha yüksek bulundu (235).

Yine bizim çalışmamıza göre çalışan hastaların folliküler sıvılarındaki TAS, TOS, OSI değerleriyle ev hanımı olan hastaların değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışan kadınların oksidatif strese dış çevreyle daha çok temas ettiğinden maruz kalması mümkün gibi görünse de henüz sosyokültürel düzeyin ve meslek

durumunun, folliküler sıvıdaki değişimleri nasıl etkilediğine dair az çalışma olup daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Güncel yaklaşımlara bakarsak; oksidatif stresin kadın fertilitesi üzerine olan olumsuz etkilerinin oldukça fazla olduğu anlaşılmıştır. İnfertilite problemi olan çiftlere gerekiyorsa antioksidan ajanlar verilerek oksidatif parametrelerin düzeyinin azaltılabileceği ve sonuçta fertilitenin arttırılabileceğiöne sürölmektedir. Tedavide antioksidan elementlerden selenyum ve melatonin gibi maddelerin canlılara verilmesi ile GSH ve GSH-Px aktivitesi düzeylerinin almayanlara göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (236). Dışardan E vitamini takviyesi alan bireylerde yapılan çalışmalarda idrardaki peroksidasyon ürünlerinin oldukça azaldığı bildirilmiştir (237). Antioksidan elementlerce zengin meyve diyetiyle beslenen kadınların folliküler sıvılarındaki oksidatif stres indekslerinin; antioksidan desteği almayan kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (238).

Yapılan çalışmalara göre düşük kaliteli oosite sahip bireylerin beslenmelerini antioksidan maddeler açısından zenginleştirdikleri takdirde hem fertilizasyon hem de IVF başarılarında artış olabileceği gösterilmiştir. Düzenli melatonin kullanan hastaların dejenere oosit sayısında anlamlı azalma ve fertilize embriyo sayısında ise anlamlı artma tespit edilmiştir. Paraonase-1 ise oksidatif stresin indüklediği inflamasyona karşıt olan bir antioksidan ajandır. Marsillach ve ark. (239) kadın infertilitesinde paraonase-1'in OS'in indüklediği inflamasyona karşı koruyucu olduğunu bulmuşlardır. Başka bir çalışmada ise oral vitamin ve mineral desteğinin vitamin C, vitamin E ve serum GSH konsantrasyonlarında artışa neden olduğu ve bu antioksidanların IVF başarısını anlamlı olarak arttırdığı göstermiştir (240). Güncel başka bir çalışmaya bakarsak; randomize çift kör bir çalışma olup, buna göre ICSI tedavisi gören hasta grubu ve kontrol grubu oluşturuldu. ICSI tedavisine devam eden çiftlere 6mg likopen, 400IU E vitamini, 100mg C vitamini, 25mg çinko, 26ug selenyum, 0.5mg folik asit ve 1g sarımsak içeren kombine bir antioksidan rejimi verildi. Tedavi grubunda klinik gebelik oranı %38.5 iken ; plasebo verilen grupta % 16 klinik gebelik oranı izlendi. Klinik gebelik oranı antioksidan verilen grupta anlamlı olarak yüksekti. (P = 0.03) (241).

Klinik pratikte oksidatif stresi ölçecek testler henüz hızlı ve yaygın değildir. Antioksidan ajanların infertilite kliniklerinde kullanımını gerektirecek metodlarının gelişimine ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızla birlikte yapılan tüm araştırmaların genelinde; antioksidan ajanların, fertilite ve gebeliğin devamı için olumlu etkileri olduğu düşünülüyor ancak kesin olarak klinik kullanım gerekliliği belirlenemediğinden , daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülüyor.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hastanemize 2018 Ocak tarihinden itibaren infertilite nedeniyle başvurusu; yapılan tetkikler sonucunda açıklanamayan infertilitesi olduğu görülen, uygun 200 hastaya en az 2 kez IUI tedavisi uygulandığı halde gebelik durumu oluşmayıp; oluşsa da klinik gebeliğe ilerleyemediği görülünce; açıklanamayan infertilite sebebiyle bu hastalara tüp bebek tedavi prokolleri uygulandı. IVF/ICSI sikluslarına alınan hastaların yumurta toplama günlerinde alınan atık folikül sıvısı örneklerinde TAS, TOS, OSI düzeylerine bakılarak hastaların yaş, bazal hormon seviyeleri, Tiroid hormonları, AMH, Kortizol, Androstenedion, HbA1c düzeyleri, meslek ve özel durumlarıyla birlikte ne kadar oksidatif strese maruz kaldığını görmek için tedavi sonrasında oluşan embriyo durumlarını ve gebelik durumlarını araştırdık ve sonuçlarını karşılaştırdık. Çalışmamıza katılan 200 hastaya baktığımızda;

1. Tedavi sonunda hastaların %42'sinin gebelik durumu olup yaş ortalamaları 29.98 ± 4.51 yıl; gebelik durumu olmayan hastaların ise (%58) yaş ortalaması 31.23 ± 5.44 yıl olup arada anlamlı bir fark bulunmadı; ayrıca yaş durumlarına göre embriyo kaliteleri açısından da arada anlamlı bir fark bulunmadı.
2. Sigara kullanımı açısından değerlendirildiğinde bazal hormon, kortizol, HbA1c, AMH düzeyleri açısından anlamlı bir fark görünmezken TSH düzeyleri anlamlı olarak sigara kullanan hastalarda daha yüksekti.
3. Yine sigara kullanan hastalarda oksidatif stres yükü fazla olduğundan bakılan folliküler sıvı TAS değeri anlamlı olarak düşükken; TOS ve OSI değerleri anlamlı olarak sigara kullanmayanlara göre yüksekti.
4. Sigara kullanan hastalarda biyokimyasal ve klinik gebelik durumu ile transfer sonrası 12.gün venöz kandan bakılan hcg ve progesteron düzeyleri anlamlı olarak sigara kullanmayan hastalara göre düşükken; embriyo kaliteleri açısından aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.
5. VKİ açısından bakıldığında $VKİ > 30 \text{ kg/m}^2$ olan hastalarda VKİ normal veya düşük olanlara göre kortizol hormonu ve HbA1c düzeyleri anlamlı olarak yüksek olup; klinik gebelik oranları da diğer hastalara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

7. Yine VKİ açısından bakıldığında gruplar arasında folliküler sıvı TAS, TOS, OSI düzeyleri ile embriyo kaliteleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı.
8. Embriyo kalitelerine göre baktığımızda folliküler sıvıdaki TAS, TOS, OSI düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmazken; Grade 1 embriyo transferi sonrası biyokimyasal ve klinik gebelik oranları Grade 2 embriyo transferi sonrasına göre anlamlı yüksek bulundu.
9. Transfer edilen Grade 1 embriyo transferi sonrası bakılan 12.gün hcg ve progesteron değerleri Grade 2 embriyo transferi sonrasına göre anlamlı derecede yüksek bulundu.
10. Transfer edilen embriyo sayısına göre gebelik durumlarına baktığımızda biyokimyasal ve klinik gebelik oranları açısından aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.
11. Primer infertilite ve sekonder infertilite durumlarına göre hastaların folliküler sıvı TAS, TOS, OSI değerleri ile gebelik durumları arasında anlamlı fark bulunmadı.
12. Çalışan kadın hasta ve ev hanımı olan hastaların folliküler sıvı TAS, TOS, OSI değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Gebelik durumları her ne kadar ev hanımlarında oran olarak yüksek olsa da aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.
13. Hastalarımızın infertilite nedeni olarak her ne kadar erkek faktörü olmasa da hastaların gebelik durumlarına bakıldığında biyokimyasal gebelik ve klinik gebelik olarak aralarında sperm sayı, konsantrasyon ve hareketlilik bakımından anlamlı bir fark bulunmadı.
14. Hastaların biyokimyasal ve klinik gebelik durumlarına baktığımızda yaş, folliküler sıvılarındaki TOS ve OSI değerleri ile arasında anlamlı bir fark bulunmazken TAS seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmuş olup; gebelik durumu olan hastalarda olmayanlara göre TAS seviyesi anlamlı olarak yüksek bulundu.

Tüm bu sonuçlara bakılarak; reaktif oksijen türlerinin (ROS) kadınların infertilitesinde büyük rol oynadığı; fakat bunun tek başına yeterli olmayıp yaş, kronik maruziyet, bilinmeyen hafif endometriyozis gibi faktörlerle birlikte IVF sikluslarını ve embriyo kaliteleriyle birlikte gebelik durumu sonuçlarını olumsuz etkilediği görüldü.

Buna göre folliküler sıvı TAS, TOS ve OSI düzeyleri bir belirteç olarak görülüp düşük olan TAS'ı arttırmak için oral vitamin, mineral, melatonin gibi antioksidan ajanların kullanılabileceğini çalışmamız desteklese de; bu durumun klinikte kullanım gerekliliğini açıklamak için ve ayrıca açıklanamayan infertilite nedenlerini ortaya koyan daha çok belirtecin bulunması için, daha geniş kapsamlı prospektif çalışmaların yapılması uygun olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Duanif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, editors. Boston (MA): Blackwell Scientific Publications, 1992.
2. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Fertil Steril 2004.
3. Speroff L, Fritz MA, editors Female Infertility Clinical gynecologic endocrinology and infertility Lippincott Williams & Wilkins 2011. p.1185-1189.
4. Maheshwari A, Hamilton M & Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. Hum Reprod.2008; 23: 538–42.
5. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Optimal evaluation of the infertile female. Fertil Steril.2006; 86: 264-7.
6. Reindollar RH, Regan MM, Neumann PJ, Levine BS, Thornton KL, Alper MM, Goldman MB. A randomized clinical trial to evaluate optimal treatment for unexplained infertility: the fast track and standard treatment (FASTT) trial. Fertil Steril.2010; 94: 888–99. 15.
7. Aruoma OI. (1998): Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of the American Oil Chemists' Society JAOCS, 75:199-212.
8. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. Mol Reprod Dev. 2002; 61: 414-424. 33.
9. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. Reprod Biol Endocrinol. 2009; 7: 40. 34.
10. Jana SK, K NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. Reprod Toxicol. 2010; 29: 447-451. 35.
11. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. Hum Reprod. 2003; 18: 2270-2274.

12. Collins JA, Rowe TC. Age of the female partner is a prognostic factor in prolonged unexplained infertility: a multicentre study. *Fertil Steril*. 1989; 52: 15–20.
13. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985; 291: 1693–7.
14. Abid S, Maitra A, Meherji P, Patel Z, Kadam S, Shah J, et al. Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in India. *J Clin Lab Anal* 2008;22:29–38.
15. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998; 70: 207–13.
16. Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, et al. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med* 1999; 340: 177–83.
17. Tollner TL, Venners SA, Hollox EJ, Yudin AI, Liu X, Tang G, et al. A common mutation in the Defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci Transl Med* 2011; 3: 92ra65.
18. Krester DM, Baker HWG. Human Infertility: The male factor in reproductive endocrinology, surgery and technology. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. Lippincott-Raven: New York. 1996; 2031-66.
19. American Society for Reproductive Medicine Practice Committee Opinion. Optimal evolution of the infertile female. *Fertil Steril* 2006; 86 (Suppl.4): S 264-7.
20. Vermesh M, Kletzky OA, Dajavan V, Israel R. Monitoring techniques to predict and detect ovulation. *Fertil Steril* 1987; 47: 259-64.
21. Killick A, Barbato M. Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors. *Fertil Steril* 1987; 47:773-7
22. Marik J, Hulka J. Luteinized unruptured follicle syndrome: a subtle cause of infertility. *Fertil Steril* 1978; 29:270-4.

23. Katz E. The luteinized unruptured follicle and other ovulatory dysfunctions, *Fertil Steril* 1988; 50:839-50.
24. Luciano AA, Peluso J, Koch EI, Maier D, Kuslis S, Davison E. Temporal relationship and reliability of the clinical, hormonal, and ultrasonographic indices of ovulation in infertile women. *Obstet Gynecol.* 1990 Mar; 75: 412-6.
25. Guermandi E, Vegetti W, Bianchi MM, Uglietti A, Ragni G, Crosignani P. Reliability of ovulation tests in infertile women. *Obstet Gynecol.* 2001 Jan; 97 (1): 92-6.
26. Andersen AG, Als-Nielsen B, Hornnes PJ, Franch Andersen L. Time interval from human chorionic gonadotrophin (HCG) injection to follicular rupture. *Hum Reprod.* 1995 Dec; 10(12): 3202-5.
27. Wathen NC, Perry L, Lilfor RJ, Chard T. Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1984 Jan 7; 288(6410): 7-9.
28. Hull MG, Savage PE, Bromham DR, Ismail AA, Morris AF. The value of a single serum progesterone measurement in the midluteal phase as a criterion of a potentially fertile cycle ("ovulation") derived from treated and untreated conception cycles. *Fertil Steril.* 1982 Mar; 37(3): 355-60.
29. Hoff JD, Quigley ME, Yen SS. Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983 Oct; 57(4): 792-6.
30. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1975 May; 122(2): 262-3.
31. Chang MY¹, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril.* 1998 Mar; 69(3): 505-10.
32. Frattarelli JL, Lauria-Costab DF, Miller BT, Bergh PA, Scott RT. Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2000 Sep; 74(3): 512-7.

33. Seifer DB, Maclaughlin DT. Mullerian Inhibiting Substance is an ovarian growth factor of emerging clinical significance. *Fertil Steril*. 2007 Sep; 88(3): 539-46. Epub 2007 Jun 7.
34. Oei SG, Helmerhorst FM, Bloemenkamp KW, Hollants FA, Meerpoel DE, Keirse MJ. Effectiveness of the postcoital test: randomised controlled trial. *BMJ*. 1998 Aug 22; 317(7157): 502-5.
35. Paavonen J, Lehtinen M. Chlamydial pelvic inflammatory disease. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 519-29.
36. Dubuisson JB, Bouquet de Joliniere J, Aubriot FX, Darai E, Foulot H, Mandelbrot L. Terminal tuboplasties by laparoscopy: 65 consecutive cases. *Fertil Steril* 1990; 54: 401-3.
37. The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, müllerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertil Steril* 1988; 49: 944-55.
38. Badaway S. Hysterosalpingography. In Rizk (ed) *Ultrasonography in reproductive medicine and infertility*. Cambridge; United Kingdom. Cambridge University Press 2008, (in press).
39. Garcia Velasco JA. Ultrasonography of endometriosis. In Rizk B (ed) *Ultrasonography in reproductive medicine and infertility*. Cambridge; United Kingdom. Cambridge University Press, (in press)
40. *Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems*. Editors National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Source London (UK): RCOG Press; 2004 Feb.
41. Harris, I.D., Missmer, S.A., Hornstein, M.D., 2010. Poor success of gonadotropin-induced controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for older women. *Fertil. Steril*. 94, 144–148.
42. Cantineau AE, Cohlen BJ, Heineman MJ. Ovarian stimulation protocols (anti-oestrogens, gonadotrophins with and without GnRH agonists/antagonists) for intrauterine insemination (IUI) in women with subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;CD005356.

43. Veltman-Verhulst SM, Cohlen BJ, Hughes E, Heineman MJ. Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;9:CD001838.
44. Crosignani PG, Walters DE, Soliani A. The ESHRE multicentre trial on the treatment of un- explained infertility: a preliminary report. *European Society of Human Reproduction and Em- bryology. Hum Reprod*. 1991;6:953-8.
45. Hughes E, Brown J, Collins JJ, Vanderkerchove P. Clomiphene citrate for unexplained sub- fertility in women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 20: CD000057.
46. Wordsworth S, Buchanan J, Mollison J, Harrild K, Robertson L, Tay C, et al. Clomifene citrate and intrauterine insemination as first-line treatments for unexplained infertility: are they cost-effective? *Hum Reprod* 2011; 26: 369–75.
47. Huang KE. The primary treatment of luteal phase inadequacy: progesterone versus clomiphene citrate, *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 824.
48. Verhulst SM, Cohlen BJ, Hughes E, Te Velde E, Heineman MJ. Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. *Cohrane Database Syst Rev* 2006; 4: CD001838.
49. Bendsdorp AJ, Cohlen BJ, Heineman MJ et al. Intrauterine Insemination for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2007.
50. Zimmerman ER, Robertson KR, Kim H, Drobnis EZ, Nakajima ST. Semen preparation wiht the sperm select system versus a washing technique. *Fertil Steril*. 1994; 61 (2): 269-75.
51. Stone BA, Vargyas JM, Ringler GE, Stein AL, Marrs RP. Determinants of the outcome of intrauterine insemination; analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. *Am J Obstet Gynecol* .1999; 180 (6 Pt.1): 1522-34.
52. Nuojua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R, Tuomivaara l, Martikainen H. Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod*. 1999; 14(3): 698-703.
53. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Intrauterine insemination with donor semen. An evaluation of prognostic factors based on a review of 1131 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001 Apr; 80(4): 342-8.

54. Rizk B. Clinical guidelines for treatment of selected cases of endometriosis by ART or surgery. American Society For Reproductive Medicine, 60th Annual Meeting, Postgraduate Course, Endometriosis Treatment: Medical, Surgical and Assisted Reproductive Technology. ASRM Postgraduate course syllabus. October 16, 2004.
55. Werbrouck E, Spiessens C, Meuleman C, D'Hooghe T. No difference in cycle pregnancy rate and in cumulative live-birth rate between women with surgically treated minimal to mild endometriosis and women with unexplained infertility after controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2006; 86(3): 566-71.
56. Ibérico G, Vioque J, Ariza N, Lozano JM, Roca M, Llacer J, Bernabeu R. Fertil Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. *Steril*. 2004 May; 81(5): 1308-13.
57. Sikandar R, Virk S, Lakhani S, Sahab H, Rizvi J. Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation in the treatment of subfertility. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2005 Dec; 15(12): 782-5.
58. Yalti S1, Gürbüz B, Sezer H, Celik S. Effects of semen characteristics on IUI combined with mild ovarian stimulation. *Arch Androl*. 2004 Jul-Aug; 50 (4): 239-46.
59. Shulman A, Hauser R, Lipitz S, Frenkel Y, Dor J, Bider D, Mashiach S, Yogev L, Yavetz H. *J Assist Reprod Genet*. Sperm motility is a major determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. 1998 Jul; 15(6): 381-5.
60. Burr RW, Sieberg R, Flaherty SP, Wang XJ, Matthews CD. The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 1996 Jan; 65(1): 127-32.
61. Kosmas IP. et al. Human chorionic gonadotropin administration vs. luteinizing monitoring for intrauterine insemination timing, after administration of clomiphene citrate: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2007 Mar; 87(3): 607-12. Epub 2006 Dec 14.
62. Ombelet W. Evidence-based recommendations for IUI in daily practice. *Middle East Fertility Society Journal* 2013; 18: 74-7.

63. Noci I, Dabizzi S, Evangelisti P, Cozzi C, Cameron Smith M, Criscuoli L, Fuzzi B, Branconi F Evaluation of clinical efficacy of three different insemination techniques in couple infertility. A randomized study. *Minerva Ginecol.* 2007 Feb; 59 (1): 11-8.
64. National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines (CG156) Fertility: Assessment and treatment for people with fertility problems. Published date: February 2013. Retrieved from <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156>.
65. Deaton JL, Gibson M, Blackmer KM, Nakajima ST, Badger GJ, Brumsted JR. A randomized, controlled trial of clomiphene citrate and intrauterine insemination in couples with unexplained infertility or surgically corrected endometriosis. *Fertil Steril.* 1990;54:1083-8.
66. Rizk B. Epidemiology of ovarian hyperstimulation syndrome: iatrogenic and spontaneous. In Rizk (Ed.), *Ovarian Hyperstimulation Syndrome*. Chapter 2. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 2006; pp.10-42.
67. Mitwally MF¹, Biljan MM, Casper RF. Pregnancy outcome after the use of an aromatase inhibitor for ovarian stimulation. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Feb; 192(2): 381-6.
68. Casper RF, Mitwally MF. Review: aromatase inhibitors for ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar; 91(3): 760-71. Epub 2005 Dec 29.
69. ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 265-77.
70. Gunn DD, Bates GW. Evidence-based approach to unexplained infertility: a systematic review. *Fertil Steril* 2016; 105: 1566-74.
71. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod.* 2011 Jul; 26(7): 1768-74. doi: 10.1093/humrep/der106. Epub 2011 May 10.
72. Roudebush WE, Toledo AA, Kort HI, et al: Platelet activating factor significantly enhances intrauterine insemination pregnancy rates in non-male factor infertility. *Fertil Steril.* 82: 52-56, 2004.

73. Park NC, Park HJ, Lee KM, Shin DG: Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation. *Asian J Androl*. 5: 195-201, 2003.
74. Huang FJ, Chang SY, Chang JC, et al: Timed intercourse after intrauterine insemination for treatment of infertility. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol*. 80: 257-261, 1998.
75. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems. Published date: February 2013.
76. Kim D, Child T, Farquhar C. Intrauterine insemination: a UK survey on the adherence to NICE clinical guidelines by fertility clinics. *BMJ Open*. 2015 May 15; 5(5): e007588. doi: 10.1136/bmjopen-2015-007588.
77. Nandi A, Gudi A, Shah A, Homburg R. An online survey of specialists' opinion on first line management options for unexplained subfertility. 2015 Mar; 18(1): 48-53. doi: 10.3109/14647273.2014.948081. Epub 2014 Aug 27.
78. Jones H. IVF: Past and future. *Reprod Biomed Online*. 2003; 6: 375-81.
79. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2 1978; 366.
80. Jungheim ES, Meyer MF, Broughton DE. Best practices for controlled ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Semin Reprod Med* 2015; 33(2): 77-82.
81. Berkkanoglu M, Ozgur K. What is the optimum maximal gonadotropin dosage used in microdose flare-up cycles in poor responders? *Fertil Steril* 2010; 94(2): 662-5.
82. Beck-Fruchter R, Weiss A, Lavee M, Geslevich Y, Shalev E. Empty follicle syndrome: successful treatment in a recurrent case and review of the literature. *Hum Reprod* 2012; 27(5): 1357-67.
83. Haas J, Zilberberg E, Dar S, Kedem A, Machtinger R, Orvieto R. Co-administration of GnRH-agonist and hCG for final oocyte maturation (double trigger) in patients with low number of oocytes retrieved per number of preovulatory follicles--a preliminary report. *J Ovarian Res* 2014; 2; 7: 77.
84. Kovacs P, Matyas S, Boda K. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2003; 18: 2337-41.

85. Anasti JN, Kalantaridou SN, Kimzey LM, George M, Nelson LM. Human follicle fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Hum Reprod* 1998; 13: 1144-7.
86. Jones G. Luteal phase defect: a review of pathophysiology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1991; 3: 641-68.
87. Hoff JD, Quigley ME, Yen SSC. Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 792-6.
88. Bjuresten K. et al. Luteal phase progesterone increases live birth rate after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 2011 Feb;95(2):534-7.
89. Tavaniotou A, Albano C, Smits J, Devroey P. Impact of ovarian stimulation on corpus luteum function and embryonic implantation. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 123-30.
90. Fauser BC, Devroey P. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14: 236-42.
91. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87: 737-56.
92. Soliman S, Daya S, Collins J, Hughes EG. The role of luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of randomized trials. *Fertil Steril* 1994; 61: 1068-76.
93. Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. *Hum Reprod* 2002; 17: 2287-99
94. Daya S, Gunby J. Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 3: CD004830.
95. Gorkemli H, Ak D, Akyürek C, Aktan M, Duman S. Comparison of pregnancy outcomes of progesterone or progesterone+estradiol for luteal phase support in ICSI-ET cycles. *Gynecol Obstet Invest* 2004; 58: 140-4.
96. Jamieson ME, Fleming R, Kader S, Ross KS, Yates RW, Coutts JR. In vivo and in vitro maturation of human oocytes: effects on embryo development and polyspermic fertilization. *Fertil Steril*. 1991; 56: 93-7.

97. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI. Study of the optimum time for human chorionic gonadotropin- ovum pickup interval in in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 1994; 11: 478-81.
98. Wang W, Zhang XH, Wang WH, Liu YL, Zhao LH, Xue SL, Yang KH. The time interval between hCG priming and oocyte retrieval in ART program: a meta analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28: 901-10.
99. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313-8.
100. Dor J, Itzkowic DH, Mashiach S, Lunenfeld B, Serr DM. Cumulative conception rates following gonadotropin therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 136(1): 102-5.
101. Kistner RW. Sequential use of clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril.* 1976; 27(1): 72-82.
102. Croxatto HB, Ortiz ME, Díaz S, Hess R et al. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol.* 1978; 132: 629-34.
103. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril.* 1992; 58: 537-42.
104. Check JH, Nowroozi K, Chase J, Nazari A et al. Comparison of pregnancy rates following in vitro fertilization-embryo transfer between the donors and the recipients in a donor oocyte program. *J Assist Reprod Genet.* 1992; 9: 248-50.
105. Urman B, Yakin K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *Reprod Biomed Online.* 2005; 11: 382-91.
106. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet.* 1980; 44: 151-78.
107. Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 22; 183: 55-8.
108. Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L et al. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod.* 1999; 14: 515-20.

109. Mastrominas M., Pistofidis G.A., and Dimitropoulos K., Fertility Outcome after Outpatient Hysteroscopic Removal of Endometrial Polyps and Submucous Fibroids. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 1996. 3(4, Supplement): p. S29.
110. Perez-Medina T., Bajo-Arenas J., Salazar F., et al., Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. *Hum Reprod*, 2005. 20(6): p. 1632-5.
111. Oliveira F.G., Abdelmassih V.G., Diamond M.P., et al., Uterine cavity findings and hysteroscopic interventions in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer who repeatedly cannot conceive. *Fertil Steril*, 2003. 80(6): p. 1371-5.
112. Ng E.H., Chan C.C., Tang O.S., et al., Endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound in patients with small intramural uterine fibroids during IVF treatment. *Hum Reprod*, 2005. 20(2): p. 501-6.
113. Surrey E.S., Impact of intramural leiomyomata on in-vitro fertilization-embryo transfer cycle outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2003. 15(3): p. 239-42.
114. Gonen Y., Casper R.F., Jacobson W., et al., Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1989. 52(3): p. 446-50.
115. Bohrer M.K., Hock D.L., Rhoads G.G., et al., Sonographic assessment of endometrial pattern and thickness in patients treated with human menopausal gonadotropins. *Fertil Steril*, 1996. 66(2): p. 244-7.
116. Zhang X., Chen C., Confino E., et al., Increased endometrial thickness is associated with improved treatment outcome for selected patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 2005. 83(2): p. 336 - 340.
117. De Geyter C., Schmitter M., De Geyter M., et al., Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1, 186 infertile women. *Fertil Steril*, 2000. 73(1): p. 106-13.
118. Lockwood C.J., Reece E.A., Romero R., et al., Anti-phospholipid antibody and pregnancy wastage. *Lancet*, 1986. 2(8509): p. 742-3.

119. Cowchock F.S., Reece E.A., Balaban D., et al., Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. 166(5): p. 1318-23.
120. Fiedler K. and Wurfel W., Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res*, 2004. 9(4): p. 207-14.
121. Kwak-Kim J.Y., Chung-Bang H.S., Ng S.C., et al., Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod*, 2003. 18(4): p. 767-73.
122. Ng S.C., Gilman-Sachs A., Thaker P., et al., Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 2002. 48(2): p. 77-86.
123. Zeyneloglu H.B., Arici A., and Olive D.L., Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 1998. 70(3): p. 492-9.
124. Strandell A., Lindhard A., Waldenstrom U., et al., Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 2001. 16(11): p. 2403-10.
125. Strandell A., Sjogren A., Bentin-Ley U., et al., Hydrosalpinx fluid does not adversely affect the normal development of human embryos and implantation in vitro. *Hum Reprod*, 1998. 13(10): p. 2921-5.
126. Tarlatzis B.C., Toncheva D.I., and Vatev I.T., Significance of chromosomal aberrations for the unsuccessful procedures of assisted reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000. 88(2): p. 181-7.
127. Raziel A., Friedler S., Schachter M., et al., Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2002. 78(3): p. 515-9.
128. Rubio C., Gil-Salom M., Simon C., et al., Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*, 2001. 16(10): p. 2084-92.

129. Gianaroli L., Magli M.C., Munne S., et al., Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod*, 1997. 12(8): p. 1762-7.
130. Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., et al., Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril*, 1999. 72(5): p. 837-44.
131. Pehlivan T., Rubio C., Rodrigo L., et al., Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online*, 2003. 6(2): p. 232-7.
132. Cohen J., Inge K.L., Suzman M., et al., Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril*, 1989. 51(5): p. 820-7.
133. De Vos A. and Van Steirteghem A., Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs*, 2000. 166(2): p. 220-7.
134. Fehilly C.B., Cohen J., Simons R.F., et al., Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study. *Fertil Steril*, 1985. 44(5): p. 638-44.
135. Barnhart K., Dunsmoor-Su R., and Coutifaris C., Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2002. 77(6): p. 1148-55.
136. Giudice L.C., Telles T.L., Lobo S., et al., The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to discovery. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 955: p. 252-64; discussion 293-5, 396-406.
137. Kao L.C., Germeyer A., Tulac S., et al., Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology*, 2003. 144(7): p. 2870-81.
138. Simon C., Gutierrez A., Vidal A., et al., Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod*, 1994. 9(4): p. 725-9.

139. Diaz I., Navarro J., Blasco L., et al., Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril*, 2000.74(1): p. 31-4.
140. Forman R., Fries N., Testart J., et al., Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation. *Fertil Steril*, 1988. 49 (1): p. 118-22.
141. Yang J.H., Chen H.F., Lien Y.R., et al., Elevated E2: oocyte ratio in women undergoing IVF and tubal ET. Correlation with a decrease in the implantation rate. *J Reprod Med*, 2001. 46(5): p. 434-8.
142. Al-Inany H., Aboulghar M., Mansour R., et al., Meta-analysis of recombinant versus urinary-derived FSH: an update. *Hum Reprod*, 2003. 18(2): p. 305-13.
143. Al-Inany H., Aboulghar M.A., Mansour R.T., et al., Recombinant versus urinary gonadotrophins for triggering ovulation in assisted conception. *Hum Reprod*, 2005. 20(8): p. 2061-73.
144. Sadek S., Sallam H., and Agemeya A., Does difficult embryo transfer affect the results of IVF and ICSI - a meta analysis of controlled studies. *Fertil Steril*, 2004. 81(Supplement 3): p. S22.
145. Urso, M.L. and Clarkson, P.M., Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology*, 189 (2003) 41-54.
146. Clarkson P.M, Thompson H.S. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 637-46).
147. Rikans, L.E. and Hornbrook, K.R., Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging, *Biochim. Biophys. Acta*, 1362 (1997) 116-127.
148. Yeum K-J, Russell M.R, Krinsky I.N, Adlini G. Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004; 430: 97-103.
149. Yu, B.P., Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties, *Mech. Ageing Dev.*, 111 (1999) 73-87.
150. Carden D. L., Granger D. N.: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J. Pathol.*, 190: 255-66, 2000 .
151. Kisaoglu A, Borekci B, Yapca OE, Bilen H, Suleyman H. Tissue Damage and Oxidant/Antioxidant Balance. *EAJM* 2013; 45: 47-9 .

152. Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 1991; 42(4): 569 - 605.
153. Kour H, Perkins MJ. The free radical chemistry of food additives, In Ed: Arvoma O.I, Halliwell B. *Free radicals and food additives*, 1991; New York.
154. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*.2000; 65(5): 227-51.
155. Syrop CH, Dawson JD, Husman KJ, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod.* 1999; 14(7): 1752-6.
156. Wallace WH, Kelsey TW. Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography. *Hum Reprod.* 2004; 19 (7): 1612-7.
157. Cohen J, Debache C, Pez JP, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Transvaginal sonographically controlled ovarian puncture for oocyte retrieval for in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986; 3(5): 309-13.
158. Gembruch U, Diedrich K, Welker B, Wahode J, van der Ven H, Al-Hasani S, Krebs D. Transvaginal sonographically guided oocyte retrieval for in-vitro fertilization. *Hum Reprod.*1988; 3(Suppl 2): 59-63.
159. Ceballos L, Triver JM, Nicole A. Age correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *J Clin Chem.* 1992; 36: 66–70.
160. Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29: 238-245.
161. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev.* 2004; 104: 6255-6285.
162. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 625-635.
163. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012; 10: 49.

164. de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53: 761-771.
165. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001; 7: 175-189.
166. Al-Ghamdi A, Coskun S, Al-Hassan S, Al-Rejjal R, Awartani K. The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008; 6: 37.
167. Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J Nutr*. 1989; 119: 109-11.
168. Niu ZY, Liu FZ, Yan L, Li WC: Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Science*. 2009; 88: 2101- 2107
169. Chew BP: Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animal Feed Science and Technology*. 1996; 59: 103-114
170. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978; 2(8085): 366.
171. Swain EJ, Smith; Mechanism of oocyte maturation. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM editors. *In-Vitro Maturation of Human Oocytes, Basic Science to Clinical Application*, 1st ed. Montreal, Informa Health Care press. 2007; p: 83–101.
172. Vural H, Demir CV, Yılmaz N, Eren İ. Alzheimer hastalığında total antioksidan kapasitenin araştırılması. *TAD* 2007; 5(2): 63-66.
173. Gürsoy Ş. Düzenli Spor Yapan Öğrenci Gruplarında Egzersizin Total antioksidan Kapasite ve Serum Lipit Profilleri Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Malatya: İnönü Üniversitesi, 2008.
174. Morera-Fumero AL, Díaz-Mesa E, Abreu-Gonzalez P, Fernandez-Lopez L, Guillen-Pino F. A three-month longitudinal study of changes in day/night serum total antioxidant capacity in paranoid schizophrenia. *PLoS One*. 2017 Dec 8; 12(12): e0189348.

175. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277–85.
176. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry* 38.12 (2005): 1103-1111.
177. Aslan, M., Cosar, N., Celik, H., Aksoy, N., Dulger, A. C., ve ark., Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism. *Endocrine*, 2011, 40(2), 285-289.).
178. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006; 18: 325-32.
179. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*. 2001; 8: 40-42.
180. Takami M, Preston SL, Behrman HR. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 278: 646-650.
181. Takami M, Preston SL, Toyloy VA, Behrman HR. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol*. 1999; 276: 684-688.
182. Ortega-Camarillo C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. Oxidation of gonadotrophin (PMSG) by oxygen free radicals alters its structure and hormonal activity. *Mol Reprod Dev*. 1999; 52: 264-268.
183. Briggs DA, Sharp DJ, Miller D, Gosden RG. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 1999; 5: 1107-1114.
184. Fortune JE: Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994, 50: 225-232.
185. Sekkai D, Gruel G, Herry M, Moucadet V, Cnatantinescu SN, Albagli O, Tronikleroux D, Vainchenker W, Bennaceur-Griscelli A, et al. Microarray Analysis of LIF/Stat 3 Transcriptional Targets in Embryonic Stem Cells. 2005; 23 (10): 1634-1642.

186. Jana SK, K NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol*. 2010; 29: 447-451.
187. Zuelke KA. et al. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev*. 2003 Jan;64(1):106-12.
188. Curnow EC, Ryan JP, Saunders DM, Hayes ES. In vitro developmental potential of macaque oocytes, derived from unstimulated ovaries, following maturation in the presence of glutathione ethyl ester. *Hum Reprod*. 2010; 25: 2465-2474.
189. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 1462-1467.
190. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med*. 2000; 45: 314-320.
191. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*. 1998; 13: 998-1002.
192. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28.
193. Banerjee S, Smallwood A, Moorhead J, et al. Placental expression of IFN- γ and its receptor IFN- γ R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 944-952.
194. Gutteridge JMC and Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends. Biochem. Sci*. 1990; 15: 129-35.
195. Rubio C. et al. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod*, 2010 Sep;25(9):2290-7. doi: 10.1093/humrep/deq174. Epub 2010 Jul 13.

196. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril*. 1998; 70: 425–31.
197. Andrade AZ, Rodrigues JK, Dib LA et al. Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*. 2010; 32: 279-285.
198. Murphy AA, Santanam N, Parthasarathy S. Endometriosis: a disease of oxidative stress? *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16: 263-273.
199. Ebisch, I.M.W., Pierik, F.H., De Jong, F.H., Thomas, C.M.G., Steegers-Theunissen, R.P.M., 2006. Does folic acid and zinc sulfate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men?. *International journal of Andrology* 29, 339–345.
200. Ivanova I. et al. The RNA m⁶A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence. *Mol Cell*. 2017 Sep 21;67(6):1059-1067.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.003. Epub 2017 Aug 31.
201. Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects Oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril* 2006; 85: 584–91.
202. Dumoulin JCM, Evers JLH, Bras M, Pieters MHEC, Geraedts JPM. Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1992;94:373-80.
203. Boone, W.R, Johnson, J.E, Price, T.M, Bowers, B.K, Morris, M.D, Crane, M.M et al. In vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) comes to the upstate. *J S C Med Assoc*. 1994; 90: 360–366
204. Coskun, S., Roca, G.L., Elnour, A. et al. (1998) Effects of reducing insemination time in human *in vitro* fertilization and embryo development by using sibling oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* , 15, 605–608.
205. Ashrafi M, Kiani K, Mirzaagha E, Shabani F. The Pregnancy Outcomes of Day 2 versus Day 3 Embryo Transfer: A Cross-Sectional Study. *Iranian Journal of Fertility and Sterility* 2007; 1(2): 47-54.

206. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil. Embryo Transfer* 1984; 1: 3-23.
207. Alberto Carillo JR et al. *Fertil Steril* 1998; 69: 329-34.
208. Milki AA. et al. *Fertil Steril* 2000; volume 73, Issue 1, Pages 126–129
209. Aboulghar MM .et al. *Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;107:176-9
210. Wen SW, Smith G, Yang Q, Walker M. Epidemiology of preterm birth and neonatal outcome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004; 9: 429–35.
211. Moster D, Lie RT, Markestad T. Long-term medical and social consequences of preterm birth. *N Engl J Med.* 2008; 359: 262–73.
212. Blickstein I, Jones C, Keith LG. Zygotic-splitting rates after single-embryo transfers in in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2366–7.
213. Jeon Y, Yoon JD, Cai L, Hwang SU, Kim E, Zheng Z, et al. Supplementation of zinc on oocyte in vitro maturation improves preimplantation embryonic development in pigs. *Theriogenology.* 2014; 82: 866–74. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.06.021.
214. A. Ahlström^{1,2,*}, C. Westin^{1,2}, M. Wiklund^{1,2}, and T. Hardarson^{1,2}.
¹Sahlgrenska Academy and Gothenburg University, Gothenburg, Sweden
²Fertility Centre Scandinavia, Carlanderska Hospital, PO Box 5418, S-402 29 Gothenburg, Sweden, Advanced Access publication on March 10, 2013
doi:10.1093/humrep/det054.
215. Lawlor DA. and Nelson SM , Effect of age on decisions about the numbers of embryos to transfer in assisted conception: a prospective study.*Lancet*, 2012 Feb 11;379(9815):521-7. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61267-1. Epub 2012 Jan 12.
216. Hansen M. Et al. Twins born following assisted reproductive technology: perinatal outcome and admission to hospital.*Hum Reprod*, 2009 Sep;24(9):2321-31. doi: 10.1093/humrep/dep173. Epub 2009 May 20.
217. Dodd JM. And Crowther CA. Evidence-based care of women with a multiple pregnancy,*Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005 Feb;19(1):131-53. Epub 2004 Dec 29.

218. Pedro Augusto Araújo Monteleone et al. Outcomes of elective cryopreserved single or double embryo transfers following failure to conceive after fresh single embryo transfer. *Reprod Biomed Online*, 2016 Aug;33(2):161-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.04.011. Epub 2016 May 5.
219. Freour T. et al. Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen. *Arch.Gynecol Obstet.* 2012 Apr;285(4):1177-82. doi: 10.1007/s00404-011-2172-7. Epub 2011 Dec 20.
220. Mailhes JB et al. Sensitivity of mouse oocytes to nicotine-induced perturbations during oocyte meiotic maturation and aneuploidy in vivo and in vitro. *Mol Hum Reprod*, 2000 Mar;6(3):232-7.
221. Zenses MT. et al. Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluids of passive smokers in in vitro fertilization therapy. *Fertil Steril.* 1996 Oct;66(4):614-9.
222. Zenses MT. et al. Immunodetection of cotinine protein in granulosa-lutein cells of women exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril.* 1997 Jul;68(1):76-82.
223. Karmon AE. et al. Preconceptional thyroid-stimulating hormone levels and outcomes of intrauterine insemination among euthyroid infertile women. *Fertil Steril*, 2015 Jan;103(1):258-63.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.035. Epub 2014 Oct 25.
224. Reh A. et al. What is a normal thyroid-stimulating hormone (TSH) level? Effects of stricter TSH thresholds on pregnancy outcomes after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010 Dec;94(7):2920-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.06.041. Epub 2010 Jul 23.
225. Sun X. et al. Effect of In Ovo Zinc Injection on the Embryonic Development and Epigenetics-Related Indices of Zinc-Deprived Broiler Breeder Eggs. *Biol Trace Elem Res.* 2018 Oct;185(2):456-464. doi: 10.1007/s12011-018-1260-y. Epub 2018 Feb 9.
226. William RB. et al. The effects of pregnancy and lactation on copper and zinc retention in the rat. *Br. J Nutr.* 1977 Nov;38(3):407-16.

227. El-Far M. et al. Tumor necrosis factor- α and oxidant status are essential participating factors in unexplained recurrent spontaneous abortions. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 879-83.
228. Nishihara T. et al. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome. *Reprod Med. Biol.* 2018 Aug 24;17(4):481-486. doi: 10.1002/rmb2.12229. Collection 2018 Oct.
229. Seino t. et al. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril.* 2002; 77: 1184-1190.
230. Massey AJ. et al. The association of physiological cortisol and IVF treatment outcomes: a systematic review. *Reprod Med Biol.* 2014 Apr 11;13(4):161-176. doi: 10.1007/s12522-014-0179-z. eCollection 2014 Oct.
231. Machtinger R. et al. Association between preconception maternal beverage intake and in vitro fertilization outcomes. *Fertil Steril.* 2017 Dec;108(6):1026-1033. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.09.007. Epub 2017 Oct 3.
232. Wang JX, Davies M, Norman RJ. Body mass index and probability of pregnancy during assisted reproduction treatment: retrospective study. *BMJ* 2000; 321: 1320-1.
233. Hanny Lashen, William Ledger, Andre's López Bernal and David Barlow. Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Human Reproduction* vol.14 no.3 pp.712–715, 1999
234. Lambers Shah DK, Missmer SA, Berry KF, Racowsky C, Ginsburg ES. Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet Gynecol.* 2011;118:63–70. doi: 10.1097/AOG.0b013e31821fd360.
235. Shah DK, Missmer SA, Berry KF, Racowsky C, Ginsburg ES. Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet Gynecol.* 2011;118:63–70. doi: 10.1097/AOG.0b013e31821fd360.
236. Whanger PD. Selenium and the brain: a review. *Nutr Neurosci.* 2001; 4: 81-97.
237. Acevedo CG, Carrasco G, Burotto M, Rojas S, Bravo I. Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta. *Life Sci.* 2001; 68: 2893-903

238. Alberg A. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*. 2002; 180: 121-137.
239. Marsillach J. et al. Paraoxonase-1 in female infertility: a possible role against oxidative stress-induced inflammation. *Fertil Steril*. 2010 Aug;94(3):1132-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.11.043. Epub 2010 Jan 25.
240. Ozkaya MO, Naziroglu M. Multivitamin and mineral supplementation modulates oxidative stress and antioxidant vitamin levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010; 94: 2465-2466.
241. Tremellen K., Miari G., Froiland D., Thompson J. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2007; 47: 216–221.