

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PKOS VE PKOS OLMAYAN İVF VAKALARINDA FOLİKÜLER  
SIVIDA DOPAMİN VE NOREPİNEFRİN DÜZEYLERİNİN  
İNCELENMESİ:  
OVULASYON İNDÜKSİYONU VE İVF SONUÇLARINA  
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Natı MUSALI**

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Batuhan ÖZMEN**

**ANKARA  
2014**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PKOS VE PKOS OLMAYAN İVF VAKALARINDA FOLİKÜLER  
SIVIDA DOPAMİN VE NOREPİNEFRİN DÜZEYLERİNİN  
İNCELENMESİ:  
OVULASYON İNDÜKSİYONU VE İVF SONUÇLARINA  
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Natı MUSALI**

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Batuhan ÖZMEN**

**BU TEZ ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR PROJE OFİSİ  
TARAFINDAN  
13B3330003 NO'LU PROJE İLE DESTEKLENMİŞTİR.**

**ANKARA  
2014**

# KABUL VE ONAY

## ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : Dr.Natı MUSALI	Tarih: 13 / 10 / 2014
Anabilim/Bilim Dalı : Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı : Doç.Dr.Batuhan ÖZMEN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: PCOS ve PCOS olmayan IVF vakalarında folliküler sıvıda dopamin ve norepinefrin düzeylerinin incelenmesi; ovulasyon indüksiyonu ve IVF sonuçlarına etkisinin değerlendirilmesi.	
Tezin Niteliği:	<input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	<input checked="" type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
<input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne	
<input type="checkbox"/> Reddine	
<input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

**Jüri Başkanı**

Unvanı, Adı, Soyadı

Doç.Dr.Batuhan ÖZMEN  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Unvanı, Adı, Soyadı

Prof.Dr.Feride SÖYLEMEZ  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Unvanı, Adı, Soyadı

Doç.Dr.Gürkan BOZDAĞ  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ilgisini eksik etmeyen, derin tecrübeleriyle yol gösteren ve bu tezin hazırlanmasının tüm aşamalarında dikkat, sabır ve desteğini esirgemeyen danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Batuhan Özmen'e, Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD'da çalıştığım 5 yılda akademik ve cerrahi gelişimimde bana sabırla destek olan hocalarım Prof. Dr. Feride Söylemez'e, Prof. Dr. Fırat Ortaç'a, Prof. Dr. Acar Koç'a, Prof. Dr. Fulya Dökmeci'ye, Prof. Dr. Ruşen Aytaç'a, Prof. Dr. Cem Atabekoğlu'na, Prof. Dr. Bülent Berker'e, Prof. Dr. Murat Sönmezer'e, Doç. Dr. Esra Çetinkaya'ya, Doç. Dr. Salih Taşkın'a, tecrübelerinden her zaman faydalandığım değerli uzmanlarıma, beraber yol aldığımız asistan arkadaşlarıma, Ankara Üniversitesi Kısırlık Teşhis ve Tedavi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin tüm çalışanlarına, toplanan örneklerin çalışılmasındaki yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Biyokimya ABD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Berrin İmge Ergüder'e, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, sevgileri, destekleri ve fedakarlıkları ile her zaman yanımda olan anneme, babama ve ağabeyime sonsuz ve içten teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No:**

KABUL VE ONAY .....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. POLİKİSTİK OVER SENDROMU.....	4
2.1.1. Tarihçe.....	4
2.1.2. Polikistik Over Sendromunun Tanı Kriterleri .....	4
2.1.3. Polikistik Over Sendromunda ultrasonografik tanı kriterleri .....	6
2.1.4. Polikistik Over Sendromu Prevelansı .....	7
2.1.5. Polikistik Over Sendromunun Patofizyolojisi.....	9
2.2. NORMAL FOLİKÜLOGENEZ VE OOGENEZ .....	12
2.2.1. Ovulasyon.....	13
2.2.2. Foliküler sıvının endokrin ve biyokimyasal profili .....	14
2.2.3. Polikistik overli hastalarda folikülogenez .....	16
2.3. EMBRİYO GRADE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	16
2.3.1. Çalışmada Kullanılan Embriyoların Kalite Skorlaması .....	16
2.4. KATEKOLAMİNLER.....	17
2.4.1. Norepinefrin.....	18
2.4.2. Dopamin.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	22
3.1. HASTA SEÇİMİ .....	22
3.2. YÖNTEM.....	22
3.3. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE NOREPINEFRİN İLE DOPAMİN DÜZEYLERİNİN ÇALIŞILMASI .....	23
3.4. ETİK KURUL ONAYI .....	24
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ .....	24

4.BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA .....	31
6. SONUÇLAR.....	36
ÖZET.....	37
SUMMARY .....	38
7. KAYNAKLAR .....	39
EKLER.....	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>17-OHP</b>	: 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron
<b>A</b>	: Androstenedion
<b>D2GA</b>	: 2. Gün grade 1 embriyo
<b>D3GA</b>	: 3. Gün grade 1 embriyo
<b>D3GA</b>	: 5. Gün grade 1 embriyo
<b>DA</b>	: Dopamin
<b>DAT</b>	: Dopamin Taşıyıcı Enzim
<b>DHEA</b>	: Dehidro Epiandrostenedion
<b>DHEA-S</b>	: Dehidro Epiandrostenedion Sülfat
<b>E2</b>	: Östradiol
<b>FSH</b>	: Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin Salgılayıcı Hormon
<b>hCG</b>	: İnsan Koryonik Gonadotropin
<b>hMG</b>	: İnsan Menopozal Gonadotropin
<b>İCSİ</b>	: İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu
<b>İVF</b>	: İn Vitro Fertilizasyon
<b>KOH</b>	: Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon
<b>LH</b>	: Lüteinleştirici Hormon
<b>MII Oosit</b>	: II. Mayozun metafazında duraklamış durumdaki oosit
<b>NE</b>	: Norepinefrin
<b>NET</b>	: Norepinefrin Taşıyıcı Enzim
<b>OHSS</b>	: Overyan Hiperstimülasyon Sendromu
<b>OPU</b>	: Oosit Toplama İşlemi

<b>PKO</b>	: Polikistik Over
<b>PKOS</b>	: Polikistik Over Sendromu
<b>rFSH</b>	: Rekombinant İnsan Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türevleri
<b>SBF</b>	: Sinir Büyüme Faktörü
<b>SHBG</b>	: Serbest Hormon Bağlayıcı Globulin
<b>SOS</b>	: Superior Ovaryen Sinir
<b>YÜT</b>	: Yardımcı Üreme Teknikleri

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Sayfa No:**

Şekil 2.1. Ultrasonografik Polikistik Over görünümü.....	7
Şekil 4.1. PKOS ve Kontrol Grubunda toplanan oosit ve MII oosit sayısı .....	26
Şekil 4.2. PKOS (Grup 1) ve Kontrol (Grup 0) grubunda NE ve DA düzeyleleri .....	27
Şekil 4.3. PKOS ve Non-PKOS gruplarında gebelik oranları .....	28
Şekil 4.4. PKOS ve Non- PKOS gruplarında hafif-şiddetli OHSS oranları.....	28
Şekil 4.5. DA ve MII oosit sayısı arasında ilişki .....	29
Şekil 4.6. NE ve toplanan oosit sayısı arasında ilişki.....	30

## TABLolar DİZİNİ

**Sayfa No:**

<b>Tablo 2.1.</b> PKOS Tanı Kriterleri .....	5
<b>Tablo 2.2.</b> Farklı tanı kriterleri kullanıldığında PKOS prevalansı .....	8
<b>Tablo 4.1.</b> PKOS ve Non-PKOS grubunda veriler .....	25

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda infertilite nedeniyle kliniklere başvuran hasta sayısı artmıştır. İleri yaşta evlenme, çiftlerin kendi istekleri ile çocuk sahibi olmayı ertelemeleri, ortalama çocuk sahibi olma yaşının yükselmesine ve fertilitate oranlarında düşümlere neden olabilmektedir (1).

İnfertilite korunmasız, regüler ilişkiye rağmen 35 yaş altı kadınlarda 1 yıl, 35 yaş üstü kadınlarda ise 6 ay içinde gebelik olmaması şeklinde tanımlanmaktadır(2). 15-44 yaş arası 12.279 kadınla yapılan ankette infertilite oranları %6.0 olarak bildirilmiştir(3). Gebelik planlayan çiftlerde 6, 12 ve 24 ay korunmasız ilişki sonrası gebelik oranları %54, %76 ve %89`dur(4).

Dünya Sağlık Örgütü'nün, İnfertilite Tanı ve Tedavi Grubu`nun 8500 infertil çiftle yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, gelişmiş ülkelerde infertil çiftlerin %37`sinde kadın, %8`inde erkek ve %35`inde hem kadın hem erkek infertilitesi bulunmaktadır. Çiftlerin %5`inde izah edilemeyen infertilite saptanmış, %15`inde ise çalışma sırasında gebelik elde edilmiştir(5).

İnfertilite tedavisi ilaç tedavisi, cerrahi veya Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) şeklinde yapılmaktadır.Tedavi yöntemleri arasında kullanılan yardımcı üreme teknolojilerindeki teknikler yıllar geçtikçe gelişmektedir. İn vitro fertilizasyon-İntrasitoplazmatik Sperm İnjesiyonu (İVF-İCSİ), infertilite tedavisinde kullanılan genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir; çeşitli ajanlarla kontrollü ovaryen hiperstimulasyonu (KOH), oositlerin toplanmasını, laboratuarda fertilizasyonunu ve embriyoların uterusu transferini içermektedir Günümüzde 3 milyona yakın bebek YÜT yardımı ile doğurtulmuştur. İnfertilite tedavisinde İVF-İCSİ kullanımının çok popüler olmasına rağmen, başarı oranları %30-40 ile sınırlıdır(6).

Polikistik over sendromu(PKOS) ovaryen infertilitenin en sık sebebidir. İnfertilite kliniklerine başvuran anovulatör kadınların %90-95`inde PKOS bulguları vardır. PKOS`lu kadınların %40`ı infertildir. Bu hastalarda reproduktif disfonksiyon anovulasyona sekonder subfertilite ve erken gebelik kayıpları ile ilişkilidir.

Anovulasyon infertilite tedavisi alan hastaların 1/3 'ünde infertilite sebebi olarak saptanmaktadır (7). Anovulasyonun patogenezi tam açıklanamasa da, birçok mekanizma öne sürülmüştür. Ovaryen fonksiyon anormal folikülogenezis ve steroidogenezis sonucu dominant folikül gelişiminin olmaması nedeni ile bozulmaktadır.

PKOS olgularında yapılan bir çalışma ile oligo-amenore ve/veya hirsutizmi olan hastalarla semptomatik olmayan hastaların fekundabilitesi karşılaştırılmıştır. Oligo-amenoresi ve/veya hirsutizm ve obezitesi olan hastalarda fekundabilitenin semptomatik olmayan gruba göre daha az olduğu saptanmıştır. Sadece hirsutizm ise azalmış fekundabilite ile ilişkili değildir (8). Bu kohortun sonuçlarına göre, PKOS semptomları olan kadınlarda yüksek infertilite oranları izlenmektedir. Ayrıca bu hastalarda PKOS grubunda kadın infertilitesi oranları %52.5, semptomatik olmayan grupta ise %26.3 idi (8).

PKOS`lu kadınların subfertil olmasında obezite, endokrin bozukluklarla yanısıra gelişen folikülün değişmiş mikroçevresi de önemli rol oynamaktadır(7).Folikül sıvısı, ovulasyon öncesi olgunlaşan oositin mikroçevresinde gerçekleşen metabolik ve hormonal olayları yansıtan ve İVF-İCSI'de fertilizasyon, embriyo bölünmesi ve gebelik oranları gibi parametrelerin tahmin edilebilmesini sağlayan biyolojik çevre olarak kabul edilebilir (9). Folikül sıvısındaki hormon ve enzim seviyelerinin ölçümlerinin yüksek sensitivite, spesitivite ve prediktif değerleri yansıtması nedeniyle oosit matürasyonu tahmininde prediktif belirteçler olarak kullanılabilceği belirtilmektedir (10). Foliküler sıvıdaki otokrin ve parakrin etkide molekülleri inceleyen ve bunların oosit maturasyonu ve İVF sonuçları ile ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. PKOS`lu hastalarda yüksek infertilite ve düşük fekundabilite oranlarını açıklamak için foliküler sıvının çeşitli komponentleri incelenmiştir.

PKOS olgularında yaygın olarak görülen santral obezite, hiperinsulinemi ve obstrüktif uyku apnesi gibi kronik sempatik sinir sistemi aşırı aktivitelerine bağlı semptomlar birlikte görülmektedir. Bu PKOS patogenezinde artmış sempatik sinir sistemi aktivitesinin de rolü olabileceğini düşündürmektedir. PKO modeli oluşturulan sıçanlarda tekal hücre ve interstisiyel dokularda  $\beta$ - adrenerjik reseptör

*down*-regülasyonuna eşlik eden ovaryen sempatik akımda artışın overde follikül kistlerinin gelişimine, anovulasyona ve Luteinleştirici hormon (LH) düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (11). Aşırı sempatik aktivitenin fonksiyonel sonuçları HCG (Human chorionic Gonadotrophin) ve beta adrenoreseptör agonistlere artmış progesteron ve androjen üretimi şeklindedir. Superior Ovaryen Sinirin (SOS) transeksiyonu ile bu bulgular kaybolmakta ve östroz döngü ile ovulatör kapasite bozulmaktadır (11).

Yapılan çalışmalarda, PKO hayvan modellerinde ve PKOS'lu olgularda Sinir Büyüme Faktörünün (SBF) intraovaryen salınımının arttığı da gösterilmiştir. PKOS'lu kadınlarda kontrol grubuna göre katekolaminerjik liflerin dansitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (12). Bir başka çalışmada infertilite tedavisi alan PKOS ve PKOS olmayan hasta gruplarında kanda norepinefrin (NE), dopamin (DA) ve metabolitlerinin düzeylerini karşılaştırmıştır ve anlamlı olarak fark saptanmamıştır. Preovulatör foliküllerdeki NE düzeylerinin plazma düzeylerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (13). PKOS'lu kadınlarda SBF foliküler sıvıda 2 kat, granüloza hücrelerinde ise 6 kat artmış olarak saptanmıştır (14).

Biz bu çalışmada ilk kez, İVF-İCSİ tedavisi alan PKOS ve Non – PKOS hasta gruplarında, foliküler sıvıda NE ve DA düzeylerini ölçüp, PKOS patogenezinin yeni bakış açısı getirmeyi, anovulasyon, kötü oosit ve embriyo kalitesi ve İVF-İCSİ sonuçları ile ilişkisini ortaya koymayı hedefledik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.POLİKİSTİK OVER SENDROMU

#### 2.1.1. Tarihçe

PKOS en yaygın, heterojen,kalıtsal endokrin/metabolik hastalıktır. Fransız doktorlar Achard ve Thiers 1921 yılında sakallı bir kadında diyabet olduğunu göstermiş ve hiperandrojenemi ve karbonhidrat metabolizması arasında bağlantı olabileceğini söylemişlerdir. 1935 yılında Irving Stein ve Michael Leventhal sendromu amenoresi, obezitesi, hirsutizmi ve polikistik overleri olan 7 kadında tanımlamışlardır (15).

#### 2.1.2. Polikistik Over Sendromunun Tanı Kriterleri

PKOS`un tanı kriterleri 3 grup tarafından tanımlanmıştır:

1. The National Institutes of Health/National Institute of Child Health and Human Disease (NIH/NICHHD) 1992 – Aşağıdaki bulguların hepsinin var olması:

- a. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- b. Menstruel disfonksiyon

Androjen fazlalığına veya benzer bulgulara neden olabilecek hastalıkların dışlanması(16).Ultrasonografi de PKOS görüntüsü tanıyı desteleyen bir kriter olmakla birlikte gerekliliği mutlak değildir (17).

- 2.The European Society for Human Reproduction and Embriology/ American Society for Reproductive Medicine (ESHRE/ASRM) 2004 (Rotterdam kriterleri) – Aşağıdaki bulgulardan ikisinin olması:

- a.Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- b.Oligo-ovulasyon veya anovulasyon
- c.Polikistik overler

Androjen fazlalığına veya benzer bulgulara neden olabilecek hastalıkların dışlanması(18).

3.The Androgen Excess and PCOS Society 2006 - Aşağıdaki bulguların hepsinin var olması:

- a.Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- b.Ovaryen disfonksiyon ve/veya polikistik overler

Androjen fazlalığına veya benzer bulgulara neden olabilecek hastalıkların dışlanması(19).

**Tablo 2.1.** PKOS Tanı Kriterleri

1990 (NIH/NICHHD) Tanı Kriterleri (iki kriter beraber)
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Kronik anovulasyon</li><li>2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm<ul style="list-style-type: none"><li>• Diğer nedenlerin ekarte edilmesi</li></ul></li></ol>
2003 Rotterdam ESHRE/ASRM Kriterleri (3 kriterden ikisi olmalı)
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Oligo veya anovulasyon</li><li>2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm</li><li>3. Polikistik overler<ul style="list-style-type: none"><li>• Diğer nedenlerin ekarte edilmesi</li></ul></li></ol>
2006 AES Kriterleri (3 kriter beraber)
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Hirsutizm ve/veya hiperandrojenemi</li><li>2. Oligoanovulasyon ve/veya polikistik overler</li><li>3. *Diğer nedenlerin ekarte edilmesi</li></ol>
Diğer nedenler
<ul style="list-style-type: none"><li>- Cushing sendromu</li><li>- Konjenital adrenal hiperplazi</li><li>- Hiperprolaktinemi</li><li>- Androjen salgılayan tümörler</li><li>- Tiroid fonksiyon bozukluğu</li><li>- Androjenik/anabolik ilaç kullanımı</li></ul>

### 2.1.3. Polikistik Over Sendromunda ultrasonografik tanı kriterleri

Polikistik Over (PKO) görünümü overde periferik yerleşimli küçük kistlerin - immatür veya atrofik foliküllerin inci kolyesi benzeri dizilimidir. Foliküllerle çevreli olan stroma ise kalın ve ekojen görünümündedir. Ultrasonografik olarak izlenen bu görünüm, PKO tanısı için objektif tanı kriterleri olarak kabul edilmektedirler. Bu kriterler overde periferik yerleşimli 2 ile 9 mm boyutlarında 12 veya daha fazla folikül bulunması ve/veya artmış over volüm (>10 ml.) olarak tanımlanmıştır (18). Overlerden birinde bu kriterlerin izlenmesi PKO tanısı için yeterli olmaktadır. Ultrasonografik değerlendirme esnasında dominant folikül (>10 mm.) veya korpus luteum saptanırsa inceleme bir sonraki sıklusa bırakılmalıdır.

Rotterdam PKOS çalışma grubu tarafından öne sürülen öneriler bunlardır: ultrasonografinin deneyimli kişiler tarafından yapılması, obez olgularda transvaginal ultrasonun seçilmesi, düzenli menstrüel siklusu olan kadınlarda siklusun 3.-5. günlerinde, oligo- ameneroik kadınlarda rastgele veya progestinle uyarılmış çekilme kanamasının 3.-5. gününde ultrasonun yapılması, over volümünün (0.5 x uzunluk x genişlik x kalınlık) formülüyle hesaplanması, folikül sayısının overin hem uzunlamasına hem de ön-arka kesitlerinde hesaplanması, her iki kesitten alınan ölçümün ortalamasının 10 mm.den küçük olması halinde 10mm küçük folikül denmesi gerekmektedir (18).

Ancak normoandrojenik, regüler sıkluları olan, seçilmemiş kadınların %25 kadarında ultrasonografide polikistik overler mevcuttur (18).



**Şekil 2.1.** Ultrasonografik Polikistik Over görünümü

#### **2.1.4. Polikistik Over Sendromu Prevelansı**

PKOS prevelansı çeşitli tanı kriterlerine göre %6-%19.9 arasında değişmektedir (20).Çalışmalarda PKOS prevelansının NIH/NICHD kriterleri ile kıyaslandığında Rotterdam kriterleri ile değerlendirildiğinde yaklaşık 2-3 kat arttığı gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Farklı tanı kriterleri kullanıldığında PKOS prevalansı (20-23)

Kaynak	Populasyon	NIH/NICHD kriterleri	ESHRE/ASRM (Rotterdam kriterleri)	AES kriterleri
March ve ark.	728 Avusturyalı kadın	%8.7	%17.8	%12.0
Mehrabian ve ark.	820 İranlı kadın	%7	%15.2	7.92
Tehrani ve ark.	929 İranlı kadın	%7.1	%14.6	%11.7
Yıldız ve ark.	392 Türk kadın	%6.1	%19.9	%15.3

Bazı durumlar artmış PKOS prevalansı ile ilişkilidir:

- Oligoovulatör infertil kadınlar (24).
- Obezite ve/veya insülin rezistansı - Kilosu normalden az olan, normal olan, normalden fazla olan, hafif obez, orta derecede obez ve şiddetli obez kadınlarda PKOS prevalansı sırasıyla %8.2, %9.8, %9.9, %5.2, %12.4 ve %12.5'tir. Otörler obezitenin PKOS riskini artırabileceği, ancak bu etkinin az olduğu sonucuna varmışlardır (25).
- Prematür adrenarş hikayesi (26)
- Tip1, tip 2 veya gestasyonel diyabet– 42 tip 1 diyabetli kadın ve 38 kontrol grubu ESHRE/ASRM kriterlerine göre incelenmiştir. PKOS prevalansı tip 1 diyabetli grupta %40.5, kontrol grubunda ise %2.6 idi (27).PKOS prevalansı tip 2 diyabeti olan hastalarda NIH/NICHD kriterlerine göre %26.7 idi (28). PKOS tanısı gestasyonel diyabeti olan 94 kadından 15'ine (%16), gestasyonel diyabeti olmayan 94 kadından 6'na koyulmuştur (29).
- 1.derece akrabalarda PKOS - PKOS'nun kalıtsal olabileceği fikrine 1. derece akrabalarda ve ikizlerde daha sık görülmesi nedeni ile gelinmiştir. PKOS'lu kadınların anne ve kız kardeşlerinde PKOS prevalansı %20-%40' tır, bu da genel popülasyondaki prevalansından yüksektir (30).

İkizlerle yapılmış en geniş çalışmada monozigotik ikizlerle korelasyon %71, dizigotik ikizlerle ise %38 olarak saptanmıştır (31).

PKOS ile ilişkili olabileceği düşünülen 100'den fazla aday gen incelenmiştir. PKOS'la anlamlı derecede ilişkili olabilecek 2 gen: 2. Kromozomda 2 loküs (2p 16.3, 2p21) ve 9. Kromozomda 3. loküs(9q33.3) bulunmuştur (32).

- Kafkas veya Afrika-Amerikan kadınları ile kıyaslandığında Meksika-Amerikan kadınları
- Anti-epileptik ilaçlar kullanan kadınlar- Bazı çalışmalar bu ilişkinin anti-epileptik ajandan bağımsız olduğunu gösterse de, çoğu çalışmada PKOS oranının özellikle valproik asit kullanan kadınlarda yüksek olduğunu göstermiştir. Bu konuda 11 çalışma ile yapılan geniş bir meta-analizde valproik asitle tedavi edilen 556 kadında PKOS gelişme oranının, diğer anti-epileptik ajanlarla tedavi edilen 593 kadına göre 2 kat fazla olduğu gösterilmiştir (33). Valproik asitin teka hücrelerde androjen biyosentezini arttırdığı düşünülmektedir (34).

### **2.1.5. Polikistik Over Sendromunun Patofizyolojisi**

PKOS'un etyolojisi bilinmese de, patogenezini açıklayabilecek 3 önemli hipotez ileri sürülmüştür (35).

- 1) Hipotalamo-pituiter aksın anormal Gonadotropin Salgılayıcı Hormon(GnRH) ve LH `un sekresyonu sonucu ovaryen androjen sentezinde artış
- 2) Metabolik ve reproduktif anomalilere neden olan insulin rezistansı
- 3) Ovaryen steroidogenezisin enzimatik defektinin aşırı androjen sentezine katkısı

Değişilmiş LH aktivasyonu PKOS patogenezine aşağıdaki yollarla katkı sağlamaktadır:

-PKOS`lu hastalarda serum LH konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu (36, 37) ve LH pulsatil salınım hızı ve amplitudunun kontrol grubuna göre artmış olduğu gösterilmiştir (38). İlginç olarak obez PKOS`lu kadınların serum LH değerlerinin zayıf kadınlara göre daha düşük olduğu da bilinmektedir (39).

-PKOS`lu hastalarda ovaryen düzeyde LH aktivitesi artmış olabilir ki, bu da polikistik overlerde tekal ve granüloza hücrelerinde LH reseptörlerinin fazla olması ile ilişkilidir(40)

-PKOS`lu hastalarda LH beta- subünitinin genetik varyantları raporlanmıştır (41).

GnRH analogları ya da kombine oral kontraseptifler kullanılarak LH serum düzeylerinin düşürülmesi androjen salınımında azalmaya yol açar. Ancak, izole Folikül Stimuleedici hormon (FSH) eksikliğine bağlı östrojeni az olan kadınlarda baskılanamayan LH ise PKOS bulgularına ya da androjen fazlalığına yol açmaz (42).

Ancak, artmış ovaryen androjen sekresyonu veya polikistik morfoloji için yükselmiş LH seviyeleri gerekli değildir. Örnek olarak, regüler siklusları olan kadınlarla yapılan bir çalışmada, ultrasonografik olarak polikistik overleri olan kadınlarda normal ovaryen morfolojisi olan kadınlara göre serum androjen seviyelerinin daha yüksek olduğu, fakat her iki grupta LH seviyelerinin benzer olduğu gösterilmiştir (43).

İnsulin rezistansı ve kompensantuar hiperinsulinemi PKOS`un sık rastlanan bulgularındandır. PKOS`lu kadınların %50 - %70` inde klinik olarak ölçülen insulin rezistansı saptanmaktadır. İnsulin teka hücrelerinden androjen sentezini stimüle eder ve hepatik Seks Hormon Bağlayıcı Globulin (SHBG) sekresyonunu ise inhibe eder ve bu da serbest androjenlerin artmasına neden olur (44, 45). SHBG`deki değişiklikler PKOS fenotipinin ortaya çıkmasına yardım edebilir. Bu yüzden SHBG geni ile ilgili çalışmalarda SHBG globulin geni içindeki varyasyonların PKOS`a predispozisyon veya PKOS fenotiplerini modifiye edebileceğini işaret eden bazı kanıtlar bulunmakla birlikte, bu bulguları doğrulayacak geniş çalışmalar

gerekmektedir. Ek olarak, PKOS`lu kadınlarda teka hücrelerinin insulinin androjen sekresyonuna stimule edici etkisine aşırı yanıt verdiği de bilinmektedir (44).

Obezite insulin rezistansını, hiperinsulineminin derecesini, ovulatör ve menstrual disfonksiyonun şiddetini, kötü gebelik sonuçlarını arttırır ve artmış metabolik sendrom, glükoz intoleransı, kardiyovasküler risk faktörleri ve uyku apnesi prevelansı ile ilişkilidir (46, 47).

İnsulin direnci ya da eşlik eden obezite tek başınaanovulasyonu açıklamak için yeterli değildir. Bir çalışmada obez ancakregüler menstrüel siklusları olan kadınlarda, obez ve PKOS tanısı olan kadınlara göre insülin direncinindaha düşük olduğu bildirilmiştir (48). PKOS tedavisinde serum insulin düzeylerini düşürmek için kullanılan diazoksit, androjen düzeylerini de düşürür, ancak GnRH analogları androjen seviyelerini düşürse de, insulin seviyelerine etki etmez (49).

Hiperandrojenizm PKOS`un en önemli özelliğidir. Androjenlerin primer kaynağı overler, sekonder kaynağı ise adrenallerdir (50). Hiperinsulinizm hiperandrojenizm ile ilişkili olmasına rağmen, tekbaşına insulin rezistansı PKOS gelişimi için yeterli değildir, bu da PKOS patogenezinde hiperandrojenizme predispozisyonun (genetik) olması gerektiği fikrini ortaya çıkarmaktadır (51). PKOS`lu kadınlarda androjen biyosentezini regüle eden gen varyasyonları tespit edilmiştir.

PKOS`da görülen anovulasyona yetersiz FSH düzeyleri sebep olabilir. PKOS`da tam foliküler matürasyon gerçekleşmediği için foliküllerin aromataz aktivitesi ve dolayısı ile östrojen düzeyleri düşüktür. Düşük östrojen düzeyleri nedeni ile östrojen pozitif "*feed-back*"i olmaz ve LH tetiklenmesi ve ovulasyon gerçekleşmez.

Normal menstrüel siklusta PKOS`u olmayan kadınların hormon düzeyleri siklusta karakteristik dalgalanmalar gösterirken; PKOS`lu kadınlarda anovülasyona bağlı olarak gonadotropinler ve seks hormonları düzeyleri siklus boyunca sabittir. Anovülasyon nedeni ile artmış LH salgısına bağlı olarak östrojen ve androjen sentezi artmaktadır (52, 53). Dolayısıyla testosteron, dehidroepiandostenedion (DHEA),

dehidroepiandostenedion sülfat (DHEA-S), androstenedion (A), 17 hidroksiprogesteron (17-OHP) ve östron düzeyleri yükselmektedir.

## 2.2. NORMAL FOLİKÜLOGENEZ VE OOGENEZ

Fetal ovaryumda ovum gelişimi oogenez olarak bilinmektedir. İntrauterin olarak primordiyal üreme hücreleri dişi gonada ulaşınca oogoniumlara farklılaşırlar. Oogoniumların bir kısmı primer oositlere farklılaşırken, çoğunluğu mitozla bölünmeyi sürdürür. Oluşan primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Birkaç ay içerisinde oogoniumların sayısı hızla artar ve gelişimin 16-20. haftalarında over içerisindeki üreme hücrelerinin sayısı maksimuma, tahminen 6-8 milyona ulaşır. Bu sırada hücre ölümü başlar ve çok sayıda primer oosit ve oogonium atrezik hale gelir. Primer oosit çevresindeki kan damarları bulunmayan yassı granüloza hücre katı ile primordiyal folikül ismini alır. Doğuma yakın tüm primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasındadır (54)

Doğumda overde primer oosit sayısı yaklaşık 700.000 ile 2 milyon arasındadır, puberte başlangıcında sayı 400.000'e düşer ve ancak 500'den azı kadının reproduktif yaşamı boyunca ovulasyona kadar ulaşır (54).

Folikülogenezisin 2 aşaması vardır: preantral veya gonadotropin bağımsız ve antral veya gonadotropin bağımlı. FSH `a cevap verecek foliküller (2-5 mm) devamlı olarak overde bulunmaktadır (55). Foliküler gelişimin ilk belirtisi olarak, primer oosit büyümeye başlar; ince glikoprotein tabakası olan ve oositi çevreleyerek oosit ve granüloza hücreleri arasında bariyer görevi yapan zona pellucida oluşur. Takiben oositi çevreleyen yassı granüloza hücreleri önce küboidal şekil alır, sonra çoğalarak çokkatlı bir epitel tabakası oluşturur, yani primer foliküle dönüşür. Gelişimin bu aşaması 150 gün sürebilir.

Gelişimin ileri aşamaları maksimal oosit büyümesi (diametri 120µm), granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve teka hücrelerinin oluşmasını kapsar. Teka hücreleri çevredeki ovaryen mezankimden (stromal fibroblastlar) oluşmaktadır. Bu aşamadaki folikül sekonder foliküldür. Teka hücre katı oluşması ile folikülde kanlanma başlar, granüloza katı ise damarsız olarak kalır. Sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde FSH, östrojen ve androjen reseptörleri oluşur. Foliküler

gelişimin bu aşaması, granüloza hücrelerinin ikiye bölünme süresinin uzun olmasından dolayı (> 250 st) 120 gün sürebilir (55).

Gelişimin sonraki aşaması erken antral dönem veya tersiyer folikül oluşmasıdır. Bu folikülün özelliği granuloza hücreleri arasında içi sıvıyla dolu boşluklar veya antrum oluşmasıdır. Teka hücreleri differansiasiyonunu devam ettirerek LH reseptörleri bulunduran teka interna ve teka eksterna hücrelerine ayrılır. Granüloza hücreleri ise FSH ile stimüle mitoz sonucunda bazal membrandan başlayarak, membran, periantral, kumulus ooforus ve corona radiata katlarına ayrılır (55).

Erken antral fazdaki gelişim yavaş ve sabit hızla olmaktadır. Tersiyer folikül 400µm çapına ulaşmaktadır. FSH'ın olması foliküler gelişimin bu aşamasında büyüme için kritiktir, folikülerin FSH tarafından " kurtarılması "nın gerçekleşmemesi durumunda atreziye uğramaktadırlar (55).

Foliküler gelişimin antral fazı hızlı foliküler büyüme ile (1-2mm/gün) ile karakterizedir ve gonadotropin bağımlıdır. FSH'a yanıt olarak antral folikül antral sıvı toplanması sebebi ile hızlı büyür ve 20 mm diyametre ulaşır. Teka interna hücreleri östronun aromatisasyonu sonucunda artan miktarlarda androstenedion sentezleyen interstisyel hücrelere differansiye olmaya devam eder, granüloza hücrelerin membran katı FSH etkisi ile LH reseptörleri edinir. Nihai olarak seçim sürecinde dominant foliküle dönüşecek matür Graaf folikülü oluşur (55).

### **2.2.1. Ovulasyon**

Ovulatuvar aşamaya gelecek folikül siklusun ilk 3-5 gününde belirlenir. Mayozun diploten evresinde duraklamış olan primer oosit Graaf folikülü gelişiminin son evresine ulaştığında birinci mayoz bölünmesini tamamlar. Ovulasyon esnasında oosit kumulus ooforus hücreleri ile birlikte atılır, birinci mayoz bölünme tamamlanır ve sekonder oosit ikinci mayoz bölünmesine başlar ve 2. mayoz bölünme sperm penetrasyonu ile gerçekleşmektedir. Ovulasyon sonrası yırtılmış Graaf folikülünün duvarındaki granüloza hücreleri çevredeki damarlarla vaskularize edilerek lüteal hücrelere dönüşürler ve korpus luteumu oluştururlar.

Ovulasyon LH pikinden yaklaşık 10-12 saat sonra ve östradiol pik düzeyine ulaştıktan yaklaşık 24-36 saat sonrasında gerçekleşir. Ovulasyonun yaklaştığının en güvenilir belirteci, LH ani artışının başlangıcı, folikül rüptüründen yaklaşık 34- 36 saat önce ortaya çıkmaktadır ve oositin olgunlaşması için belli bir eşik LH konsantrasyonu 14-27 saat süre ile sağlanması gerekmektedir. LH ani artışı genellikle 48- 50 saat sürmektedir (56).

### **2.2.2.Foliküler sıvının endokrin ve biyokimyasal profili**

Foliküler sıvı ovaryen folikülün hayati ve dinamik elementi olup, gelişen oosit için mikroçevreyi oluşturmaktadır ve oosit kalitesi, sperm –oosit ilişkisi, sperm aracılı oosit aktivasyonu, implantasyon ve embriyo gelişiminin erken dönemleri ile direkt bağlantılıdır. Foliküler sıvının birikimi preantral evreden itibaren tekal kapillerlerdeki kandaki proteinin, granüloza hücreler, teka hücreler ve oositlerdeki sekresyonların diffüzyon yolu ile geçmesi ile başlar.

Granüloza hücreleri oositi çevreleyen ve normal ovaryen folikülogenezisten sorumlu olan steroidogenik hücrelerdir. Bu hücreler foliküler gelişim, oosit matürasyonu ve atrezisi ile ilişkilidirler. Son zamanlarda oosit gelişimi için uygun şartların oluşumu, ovulasyon, fertilizasyon ve müteakiben implantasyona yol açarak foliküler gelişimde önemli role sahip olduğu ortaya çıkmıştır (57).

Foliküler sıvının majör komponentleri steroid hormonlar, metabolitler, polisakkaridler, proteinler, reaktif oksijen türevleri (ROT), aynı zamanda oosit ve foliküler hücrelerin primer olarak büyümesinde rol alarak, onları fiziksel hasardan ve oksidatif strese koruyan antioksidan enzimlerdir. Foliküler sıvı hem de oosit ve foliküler hücreler arasında iletişim vasatıdır, bu oositin gelişme ve fertilizasyon kabiliyeti edinmesi için gerekmektedir. Dolayısıyla, foliküler sıvı proteinleri hakkındaki bilgiler foliküler mikroçevre ile ilgili fikir verebilir ve folikülogenezisi anlamamıza yardımcı olabilir. Ek olarak, foliküler sıvının içeriği anormal foliküler büyüme zamanı granüloza ve teka hücrelerin sekresyon sürecindeki değişikliklerini ve metabolik statüsünü yansıtır.

Foliküler sıvı ayrıca, oosit kalitesini, gebelik sonuçlarını, biyomarkerleri ve ovaryen bozukları değerlendirmek için kıymetli vücut sıvısıdır (58). İn- vitro matürasyon vasatına foliküler sıvı ilavesinin oosit gelişimini ve fertilizasyonu olumlu şekilde etkilediği gösterilmiştir (59).

Androjen fazlalığı ve intrinsik moleküler defektlerin sonucu olarak gelişen anormal folikülogenezisin sebep olduğu suboptimal oosit yetersizliğinin PKOS`lu kadınların düşük fertilizasyon ve implantasyon oranları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (60).

İnfertilite tedavisi için İVF`in kullanılmasının ilk günlerinden itibaren, oosit toplanması esnasında elde edilen folikül sıvısındaki,östrojen, progesteron ve gonadotropinlerin folikül-özgü düzeyleri kantitatif olarak ölçülmektedir (61). Folikül gelişim aşamasında 8 mm çapın altındaki foliküllerin düşük intrafoliküler östrojen/ androjen oranına sahip oldukları, midfoliküler fazdan sonra ise bu oranın tersine döndüğü görülmektedir. Geç foliküler fazda intra foliküler östradiol konsantrasyonu folikül çapı ile direkt korelasyon göstermekte ve LH pikinden sonra seviyeleri androstenodion konsantrasyonundaki düşüşle paralel bir şekilde düşmektedir (62).

Gonadotropinlerin granüloza hücreleri tarafından bazı maddelerin salgılanmasında (hyalünorik asit) önemli rol alabileceği ve oosit maturasyonu ve gelişimini etkileyebileceği belirtilmiştir.

İVF sonuçları başarılı olan oositlerde foliküler sıvıda daha yüksek LH ve HCG değerleri olduğu gözlenmiştir (63). Düşük östrojen / androjen oranı erken foliküler atrezi ile ilişkili olabilmekte, fertilizasyon ve gebelik şansını azaltabilmektedir. Androjenlerin eşik miktarının optimal foliküler gelişim için gerektiği, ancak yüksek düzeylerinin foliküler atreziye neden olduğu fikri çoğunlukla kabul edilmiştir (64). Foliküler sıvıda tek başına oosit fertilizasyonu, embriyo gelişimi ve gebelik için marker olabilecek herhangi bir madde tanımlanamamıştır, ancak işlem sırasında kolaylıkla elde edilebilen foliküler sıvının değerlendirilmesi ve elde edilen tüm veriler İVF sikluslarında önem taşımaktadır.

### **2.2.3. Polikistik overli hastalarda folikülogenez**

Polikistik overlerde primer, sekonder ve tersiyer folikül sayısında artış, matür folikül sayısında ise azalma mevcuttur. Polikistik overlerde folikülogeneziste iki temel defekt üzerinde durulmaktadır:

1. Erken tersiyer folikül gelişimi de dahil olmak üzere, erken folikülogeneziste folikül kurtarılmasında artış veya doğal atrezide azalma mevcuttur.
2. Tersiyer foliküllerin atrezisinde normal kadınlara göre akselerasyon ve takip eden folikül maturasyonunda engelleme vardır. Sekonder ve tersiyer foliküllerin atrezisi, fonksiyonel aktif tekal interstisyel hücrelerin korunması ile sonuçlanır. Bu hücreler hipertrofik, aktif steroidojenik kapasiteli ve LH stimülasyonuna cevap veren hücrelerdir. Bu hücreler, polikistik over stromasındaki artışa katkıda bulunmakta ve androjen sekrete etmektedirler (65).

### **2.3. EMBRİYO GRADE DEĞERLENDİRİLMESİ**

İVF-İCSİ'in son aşaması olan embriyo transferi için en iyi embriyonun seçilmesi İVF'de önemli bir konudur. Pronükleer morfoloji (Z skoru), 3. gün embriyo grade ve 3. gün hücre sayısının implantasyon oranını predikte etme değerini karşılaştıran bir çalışmada 3.gün parametrelerinin erken evre parametrelerine göre daha prognostik değeri olduğu belirtilmiştir (66).

#### **2.3.1. Çalışmada Kullanılan Embriyoların Kalite Skorlaması**

##### **-D2 Embryo skarlama (2. gün)**

**Grade A (1):** 4 blastomerli, fragmantasyon %0-10, blastomerler eşit boyutlarda, multinukleasyon yok.

**Grade B (2):** 4 hücreli %11-25 fragmantasyon ya da blastomerler eşit boyutta değil, multinukleasyon yok ya da 2 veya 5 hücreli, <%26 fragmantasyon, blastomerler eşit, multinukleasyon yok.

**Grade C (3):** 2-6 hücreli, %26-35 fragmantasyon, hücre boyutları eşit değil, multinukleasyon yok ya da 3 veya 6 hücreli<%35 fragmantasyon, hücre boyutları eşit değil, multinukleasyon yok

**Grade D (4):** 1 hücreli ya da 6 dan fazla blastomerli, ya da >%35 fragmantasyon, ya da multinukleasyon pozitif.

- **D3 Embryo skortlama (3. gün)**

**Grade A (1):** 7-9 hücreli, fragmantasyon %0-10, blastomerler eşit boyutlarda, multinukleasyon yok.

**Grade B (2):** 7-8 blastomerli, fragmantasyon %11-25, blastomerler eşit boyutlarda, multinukleasyon yok ya da 9 dan fazla blastomerli, %26 dan az fragmantasyon, blastomerler eşit, multinukleasyon yok.

**Grade C (3):**Fragmantasyon %26-35, blastomerler eşit boyutlarda değil, multinukleasyon yok

**Grade D (4):**Fragmantasyon oranı %35'in üzerinde, blastomerler eşit değil, ya da multinukleasyon mevcut (67).

## 2.4. KATEKOLAMİNLER

Memelilerde overlerin sempatik innervasyonu steroidogenezis ve erken foliküler gelişim de dahil olmak üzere bir çok ovaryen fonksiyonu regüle etmektedir (68). Overi besleyen postganglionik sempatik lifler ovaryen arterin kökünde bulunan ovaryen gangliondan, çöliak ve renal pleksuslardan köken almaktadır (69). Sinir lifleri damarlarla beslenir, interstisiyel dokular ve gelişmekte olan foliküllerin çevresi boyunca, folikülün granüloza hücrelerine ve korpus luteuma penetre olmadan

seyreder. Organ transplantasyonundan 28 gün sonra sempatik sinir lifleri overe dahil olur ve dokunun reinnervasyonu sağlar (70).

Yapılan son çalışmalarda normalde sinir hücreleri ile ilişkili olan genler granüloza hücrelerde tespit edilmiştir. Ayrıca granüloza hücrelerinin nöronal markerler ekspresyonu yapan tümörlere differansiyasyonu da ovaryen ve sinir hücreleri arasında benzerlikler olabileceğini göstermektedir (71).

Önceki çalışmalarda insan ovaryen homojenatlarında, sempatik sinir sistemi ile innervasyon nedeni ile fazla miktarda katekolaminler, NE ve DA bulunduğu gösterilmiştir (72).

#### **2.4.1. Norepinefrin**

NE memeli overinde sinir uçlarından, intrinsik nöronlardan (73), veya oositlerden (74) salınrsa da, NE`in overlerdeki rolü net bilinmemektedir. Sempatik innervasyon overdeki NE düzeylerinin %90`dan sorumludur, cerrahi denervasyondan sonra overde NE düzeyleri %10-15 olarak kalmaktadır (75), bu da NE homeostazında intraovaryen hücre iştirakının olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca maymun oositlerinde DA`in dopamin taşıyıcı enzim (DAT) ile hücre içine alınıp DA  $\beta$ -hidroksilaz ile NE sentezleyebileceği de gösterilmiştir (75).

Bu mekanizmalar kadınlarda fertil dönemde en sık rastlanan patoloji olan PKOS ile ilişkili olabilir. Sıçan modelleri kullanılarak PKOS tablosunun gelişim ve devamında artmış sempatik aktivitenin iştirakı gösterilmiştir (76). Sıçanlarda sempatik denervasyon veya ovaryen sinirlerin sempatik yollarının elektrohasarının kist oluşumunu engellediği de göz önünde bulundurulmalıdır (77, 78).

Ovaryen NE küçük antral foliküllere nazaran büyük antral foliküllerde daha düşük düzeydedir, ancak preovulatör foliküllerde anlamlı olarak artar. Bu değişiklik preovulatör sinir uçlarından NE salınımindaki artışa bağlı olabilir (79). Çalışmacılar sempatik sinir uçlarının intrasellüler damarlarındaki NE ve NE sentezinin son aşamasında rol alan DA –  $\beta$  – hidroksilaz enziminin düzeylerinde postovulatör dönemde parsiyel azalma tespit etmişlerdir. Bu değişikliklerin sempatik deşarj

sonrası görülmesi preovulatör gonadotropin *surge* zamanı ovaryen noradrenerjik innervasyonda artış olduğunu göstermektedir (80).

NE ovaryen foliküllerin vasküler ve endokrin hücrelerinde bulunan katekolaminerjik reseptörler aracılığıyla da etki edebilir (81). Tekal ve granüloza hücreler NE hedefi olduğu düşünülen  $\alpha$  ve  $\beta$ - adrenerjik reseptörlerle donatılmıştır (72, 82) ve onların aktivasyonu sAMP ve steroid sentezini regüle eder (74). Bu yollar *in vivo* foliküler hücredeki NE miktarına bağlıdır ve küçük foliküllerin gelişimini stimüle edebilir. Büyük foliküllerin tekal katı innerve olmaktadır, fakat tüm foliküllerin granüloza katı sinir uçlarından mahrumdur. NE granüloza hücrelere diffüzyon yolu ile geçer ve NE`in foliküler sıvıdaki miktarı bu süreç ile ilgili tahmin üretmemizi sağlar.

Kısa süre önce sıçanların granüloza hücrelerinde NE`i sitoplazma içine taşıdığı düşünülen NE membran transporteri (NET) bulunmuştur (83). Bu mekanizma sıçanlarda gösterilmiştir, fakat insanlarda uygulanamamıştır. Aynı şekilde NE`in insan granüloza hücrelerindeki akibeti de belli değildir.

Nöronlarda ve kardiyomyositlerde NE`in hücresel alımı ve metabolizması NE`in toksik etkilerini; ROT oluşumunu da kapsamaktadır (39,40). ROT`nin antioksidanlar tarafından karşı konulamayan yüksek düzeyleri oksidatif stresse ve hücre hasarına veya ölümüne neden olabilir. ROT steroidogenik Leydig hücreleri de dahil olmak üzere birçok fizyolojik sinyalizasyon kaskadlarının ayrılmaz parçasıdır ve en son bilgilere göre ovulasyon için gereklidir (84).

Foliküler sıvıda ROT`i reproduktif olayların başlangıcı için belirli bir eşik değerde bulunmaktadır ve İVF-İCSİ sikluslarında daha iyi reproduktif sonuçlar için gerekmektedir(85). Bazı çalışmalarda İVF-İCSİ başarısının prediksyonu için foliküler sıvıda ROT`inin optimum düzeyi önerilse de (86), başka çalışmalarda yüksek ROT değerlerinin oositlere toksik etkisi ve düşük gebelik oranları gösterilmiştir (87).

Oksidatif stressle ilgili olarak ROT kadın üreme sağlığı ve PKOS patogenezinde güncel ve gelişmekte olan konulardandır. PKOS`lu kadınların foliküler sıvısında ROT yüksek oranda bulunmuştur ki bu da, hücre hasarıyla

sonuçlanmaktadır. Bu PKOS`lu kadınlarda bozulmuş mitokondrial fonksiyonlarla ilişkili olabilir. Foliküldeki oksidatif stress bozulmuş oosit matürasyonu ve fertilizasyonu, düşük oosit kalitesi ve azalmış gebelik oranları ile ilişkilidir (88). İnsan granüloza hücrelerinde oksidatif stres ile ilişkili olan non-apoptotik ölüm bildirilmiştir (89). Ancak, NE`den ROT oluşumu fizyolojik olay olup, hücre ölümüne yol açmamaktadır. Aksine, NE ve ROT foliküler sıvı mikroçevresinde önemli yere sahip olup, bir çok dokuda sinyalizasyon sistemleri oluşturarak hücrel fonksiyonları sağlar (90).

Sempatik sinir sisteminin aktivasyonun PKOS`nun gelişimi ve devamından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. PKOS`lu kadınların overlerinde hiperinnervasyon, artmış sempatik innervasyon ve katekolamin metabolizmasının bozulmuş olduğu gösterilmiştir (91-93).

Kemiricilerde deneysel PKO modellerinde benzer olarak artmış sempatik tonus, katekolamin reseptörlerinin değişilmiş ekspresyon paterni, artmış intraovaryen SBF değerlerinin bununla bağlantıları gösterilmiştir (94). Overlerin sempatik innervasyonu kritik öneme sahiptir, sıçan overinde sempatik sinir lifleri toplusunu taşıyan superior ovaryen sinirin seksiyonu normale göre artmış  $\beta$ 2-adrenoreseptör ekspresyonu, düzenlen östroz siklus ve ovulayona neden olur (95). PKOS`lu kadınlarda akupunktur ve stress azaltıcı egzersizlerin terapötik etkilerinin, muhtemelen sempatik tonus üzerine etkiden kaynaklandığı düşünülmüştür (96). Veriler sempatik sinir sisteminin postganglionik nörotransmitteri olan NE`in intraovaryen rolünün önemini göstermektedir.

Ovaryen nöronal aktiviteyi regüle eden mekanizma olan NE salınımının regülasyonunun sadece overi besleyen sinirlerle değil, aynı zamanda lokal olarak sinir uçlarında FSH ve LH ile de sağlandığı düşünülmektedir. Tek doz östradiol valeriati yapılarak PKO modeli elde edilen sıçanlarda katekolamin homeostazında kist oluşumundan önce başlayan ve kistlerden sonra da persiste eden değişiklikler, overde NE içeriğinin artması, ovaryen sinir uçlarından NE salınımının artması, sempatik sinirlerle direkt innerve edilen teka-interstisial hücrelerde  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin *down* regülasyonu, saptanmıştır (97). İlginç olarak, deney hayvanlarında NE pulsatil salınımı LH ve FSH pulsatil salınımına benzerdir.

### 2.4.2. Dopamin

DA önemli beyin nörotransmitteridir, Parkinson hastalığı ve bir sıra psikiyatrik hastalıklarla ilişkilidir. Diğer monoaminler gibi DA de hücre içinde parçalanarak aldehidler ve hidrojen peroksida dönüşür. Hidrojen peroksida ROT ailesinin önemli bir üyesi olup, yüksek ROT seviyeleri ve antioksidan düzeyleri arasındaki imbalans, hücre ölümü ve apoptozise neden olur (90).

Yüksek NE seviyelerine ek olarak, ovaryen homojenatlarda DA de bulunmuştur. Santral sinir sisteminde bulunan 5 DA reseptöründen dördü insan granüloza hücresinde bulunmuştur (98). D1- ve D2- benzer reseptörler folikül ve korpus luteumda da bulunmuştur ve bu reseptörlerin işlevselliği izole edilmiş granüloza hücre kültürlerinde test edilmiştir. DA reseptörlerinden başka insan ve sıçan granüloza hücre kültürlerinde ve maymunların oositlerinde hücre membranı ile assosiyel DAT bulunmuştur.

Ovaryen hücre tiplerinden sadece oositler DA hidroksilaz eksprese ederek deney koşullarında DA alıp NE'ne dönüştürebilir (74).

İnsanda DA metabolizmasını araştıran bir çalışmada PKOS sendromu olan kadınlarda granüloza hücrelerde DA metabolizmasının artmış olduğu saptanmıştır(99).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. HASTA SEÇİMİ

Bu çalışma, Kasım 2012- Ekim 2013 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üreme Sağlığı Merkezine başvuran 108 infertil hasta ile gerçekleştirildi.

Çalışmaya dahil edilen hastalar 2 gruba: PKOS grubu (n=47) ve Non-PKOS grubu (n=61) ayrıldı. Non-PKOS grubuna erkek infertilitesi veya izah edilemeyen infertilite nedeni ile İVF-İCSİ'e alınan hastalar, PKOS grubuna ise Androgen Excess Society AES kriterlerine (19) göre PKOS tanısı alan ve İVF-İCSİ'e yönlendirilen hastalar dahil edildi. Uterin anomalisi ve/veya fibroidleri olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmada her iki gruba GnRH agonist veya antagonist rejimi ile KOH yapıldıktan sonra foliküler sıvıda primer olarak NE ve DA düzeyleri tespit edilerek, sekonder olarak toplanan oosit sayısı, 2. mayozun metafazında duraklamış durumdaki oosit (MII oosit) sayısı, en iyi kalitede embriyo sayısı, gebelik oranları ile korele edildi.

#### 3.2. YÖNTEM

GnRH antagonist stimülasyon rejiminde, siklusun 2.-3. gününden başlayarak gonadotropinlerle (rekombinant insan folikül stimüle edici hormonu (rFSH; Gonal-F, Serono ya da Puregon, Organon) ± insan menopozal gonadotropini (hMG; Menogon veya hphMG; Menopur, Ferring) over stimülasyonu yapılarak, dominant folikül boyutu 13-14 mm`ye ulaştığında GnRH antagonisti cetrotrelis (Cetrotide flakon 0.25 mg, Serono) veya ganirelix (Orgalutran enjektör 0.25 mg, Organon) de tedaviye eklendi.

Uzun protokol veya GnRH agonist protokol uygulanan hasta grubuna tedavinin başlandığı siklustan önceki siklusun 23. gününden başlayarak ovaryen

stimülasyondan 10 gün öncesine kadar Leuprolid asetat (Lucrin Depot, Abbott) uygulandı. Pituitar baskılanma sağlandıktan sonra (LH <5mIU/mL, E2 <50 pg/mL) ve endometrium çift duvar kalınlığı <5mm`den az ise rekombinant FSH yardımı ile ovaryen stimülasyona başlandı. FSH dozları transvajinal yolla yapılan folikülometriye dayanarak ayarlandı.

En az üç folikülün çapı 17-18 mm`ye ulaştığında, oosit maturasyonunun ve ovulasyonun tetiklenmesi amacıyla 250 mikrogram / 0.5 ml rHCG, (Ovitrelle, Serono) subkutan (s.c) olarak uygulandı. Bu uygulamadan 35-36 saat sonra transvajinal ultrasonografi eşliğinde oosit toplama işlemi (oosit pick up) gerçekleştirildi. Embriyo transferi, oosit toplanmasını takip eden 3-5. günlerde, Swemed (Vitrolife, İsveç) katater kullanılarak ultrasonografi eşliğinde yapıldı. Transferden sonraki 12. günde  $\beta$ hCG testi yapılarak, pozitif saptanan hastalar takip altına alındı. 5-6. haftalarda fetal kalp atımı değerlendirilmesi için transvajinal ultrasonografi yapıldı.

### **3.3. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE NOREPİNEFRİN İLE DOPAMİN DÜZEYLERİNİN ÇALIŞILMASI**

Çalışma için toplanan folikül sıvısı örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üreme Sağlığı Merkezine infertilite nedeni ile başvuran ve İVF`e alınan hastalardan OPU (oosit toplama işlemi) sırasında alındı. Elde edilen örnekler 10 dakika 1000\* d santrifüje edildikten sonra çalışma zamanına kadar -80 °C de saklandı. Toplanan tüm örneklerde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD`da ELİSA kit (KAPL10-0200 Norepinefrin and KAPL10-0300 Dopamine, Diasource İmmunoassays, S.A, Belçika) yardımı ile NE ve DA düzeyleri üretici talimatlarına uygun bir şekilde ölçüldü.

Elisa yöntemi ile çalışırken NE ve DA sis- diol spesifik afinite jeli ile ekstrakte edildikten sonra asile edilir ve enzimatik yolla dönüştürülür. Karşılaştırmalı olarak çalışan Elisa kitleri mikrotiter plak formatındadır. Antijen mikrotiter plağın solid fazına bağlanır. Türevlendirilmiş standartlar, kontroller, örnekler ve solid faza bağlı olan analitler sabit sayıda olan antiserum bağlanma yerlerine bağlanırlar. Sistemde denge sağlandıktan sonra serbest antijenler ve antijen-

antiserum kompleksleri yıkama ile temizlendi. Solid faza bağlanmış antikorlar anti-tavşan İgG peroksidaz konyugat yardımı ile tespit edildi. Bu reaksiyon 450 nm`de monitorize edildi. Örneklerde NE ve DA düzeylerinin tayini bilinen standart konsantrasyonlara göre hazırlanmış referans eğrisinde emilmeleri karşılaştırılarak hesaplandı.

### **3.4. ETİK KURUL ONAYI**

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 20-639-12 No`lu karar ile onaylanmıştır.

### **3.5. İSTATİKSEL ANALİZ**

İstatistik analiz için IBM SPSS programının 12. versiyonu kullanılmıştır. İki grup arasındaki verilerin dağılımı normal ise Student- T testi, normal dağılım göstermiyor ise Mann- Whitney U testi uygulanmıştır. Gruplar arası nitel verilerin oranlarının karşılaştırılması ki-kare test ile yapılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda  $p < 0.05$  olması istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Saller ve ark. yaptığı çalışmada foliküler sıvıda NE düzeyleri Non- PKOS grubunda PKOS grubuna göre daha yüksektir ( $p < 0.01$ ). Bizim çalışmamızda power: %80 ve  $\alpha: 0.05$  için alınması gereken en küçük örneklem büyüklüğü 19 olarak hesaplanmıştır. (103)

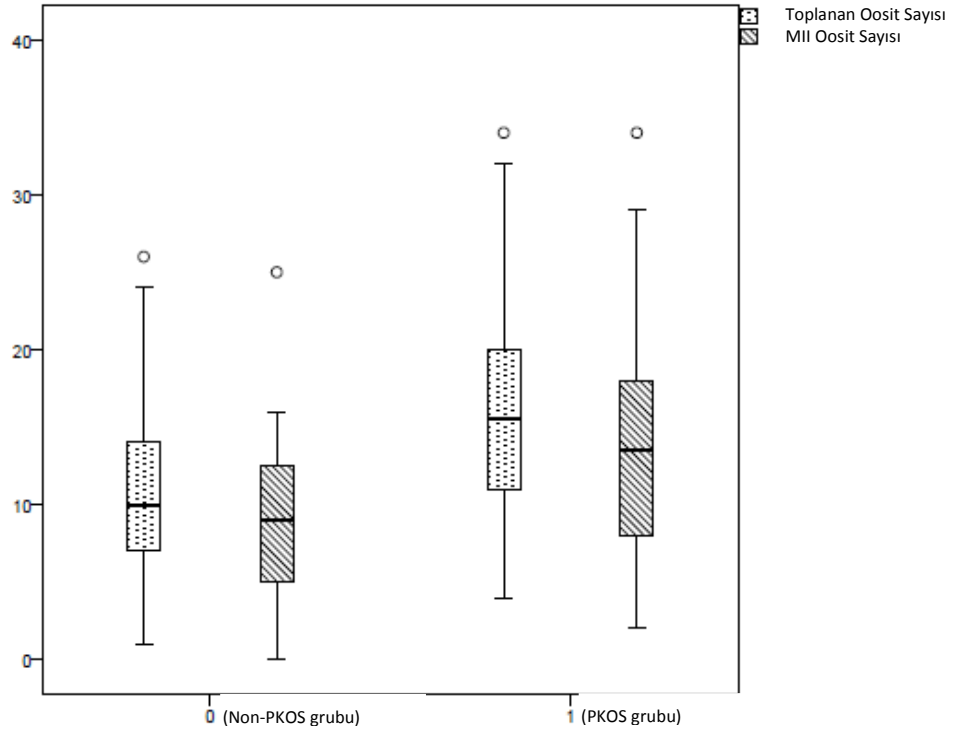
## 4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen olguların yaş ortalamaları benzer olarak saptandı. İnfertilite süreleri açısından değerlendirildiğinde PKOS grubunun infertilite süresi ortalama 6.4 yıl olup, 2 ile 17 yıl, kontrol grubunun ise ortalama infertilite süresi 6.9 yıl olup, 1 ile 20 yılı arasında değişmektedir.

Hastalardan toplanan oosit sayısı ve II. mayozun metafazında duraklamış durumdaki MII oosit sayısı PKOS grubunda (ortalama 16.27 ve 13,1 olup, dağılımı 4 ile 34 ve 2 ile 34 arasında) kontrol grubuna göre (ortalama 10.7 ve 8,7 olup, dağılımı 1 ile 26 ve 1 ile 25 arasında) istatistiksel olarak daha fazla idi ( $p < 0.05$ ). İkinci gün grade A aşamasında (D2GA) olan embriyo sayısı kontrol grubunda daha fazla idi ( $p < 0.05$ ), üçüncü gün grade A aşamasında (D3GA) ve beşinci gün grade A aşamasında olan (D5GA) aşamasında olan embriyo bakımından her iki grubun sonuçları benzer idi.

**Tablo 4.1.** PKOS ve Non-PKOS grubunda veriler

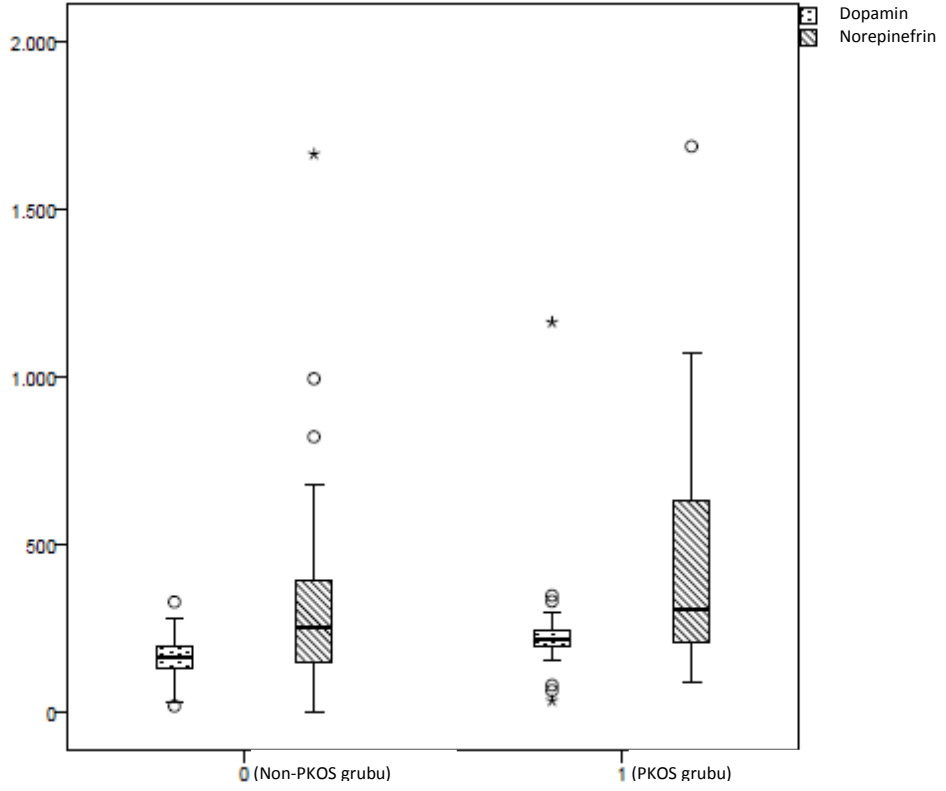
	PKOS		Non-PKOS		P
	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Sig 2
<b>Toplanan oosit sayısı</b>	16.28	6.68	10.78	4.9	,0001
<b>MII</b>	13.70	7.008	8.71	4.838	,0001
<b>D2GR A</b>	5.37	3.050	3.88	2.267	,005
<b>D3GR A</b>	4.98	3.004	3.94	2.287	NS
<b>D5 GR A</b>	3.00	1.65	3.89	2.69	NS



**Şekil 4.1.** PKOS ve Kontrol Grubunda toplanan oosit ve MII oosit sayısı

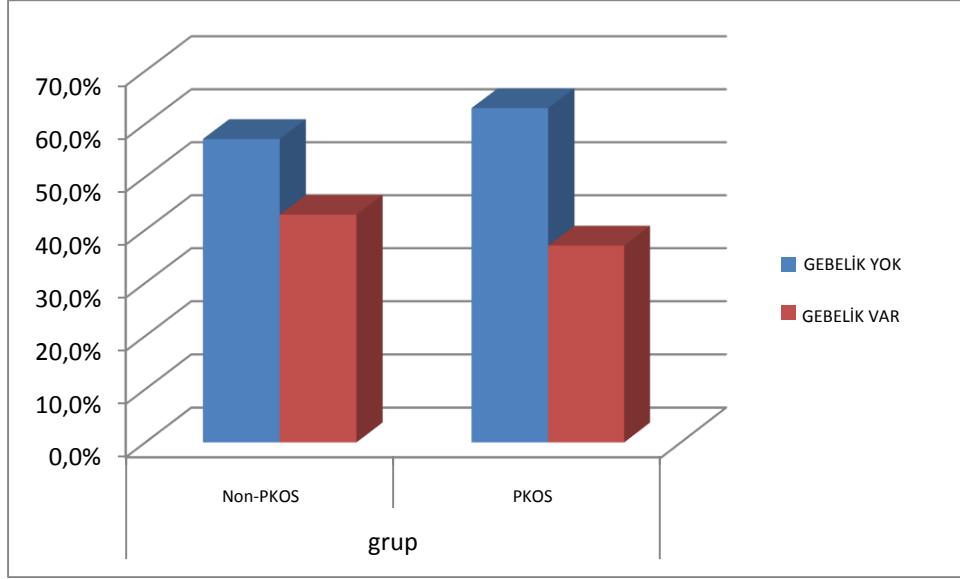
Foliküler sıvıda DA düzeylerine bakıldığında; PKOS`lu hastalarda ortalama 217,83 pg/mL (35,5 pg/mL -1162,83 pg/mL), kontrol grubunda ise 168,16 pg/mL (20 pg/mL - 330,30 pg/mL) olduğu, PKOS grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu ( $p<0.001$ ) tespit edildi.

Folikül sıvılarında NE düzeyleri incelendiğinde PKOS`lu hastalarda 310,0 pg/mL (91 pg/mL - 1686,67 pg/mL), kontrol grubunda ise 253 pg/mL (2 pg/mL - 1664,00 pg/mL) olduğu ve PKOS grubunda istatistiksel anlamlı olarak yüksek olduğu ( $p<0.05$ ) gösterildi.

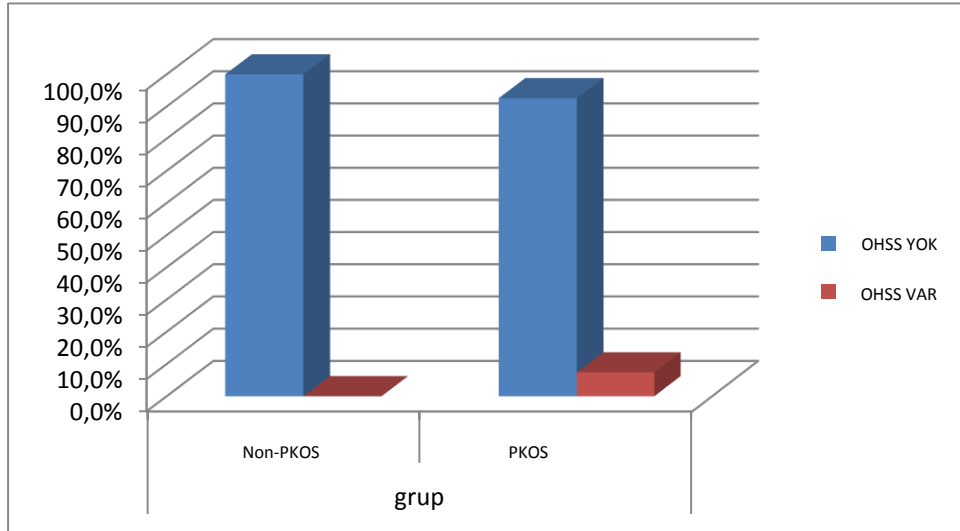


**Şekil 4.2.** PKOS (Grup 1) ve Kontrol (Grup 0) grubunda NE ve DA düzeyleri

Gebelik oranları PKOS grubunda %37.0, kontrol grubunda ise %42.9 olarak saptandı ve istatistiksel anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ). Hafif/orta şiddetli Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) kontrol grubunda hiç görülmezken, PKOS grubunda %7.4 olarak saptandı ( $p < 0.05$ ).



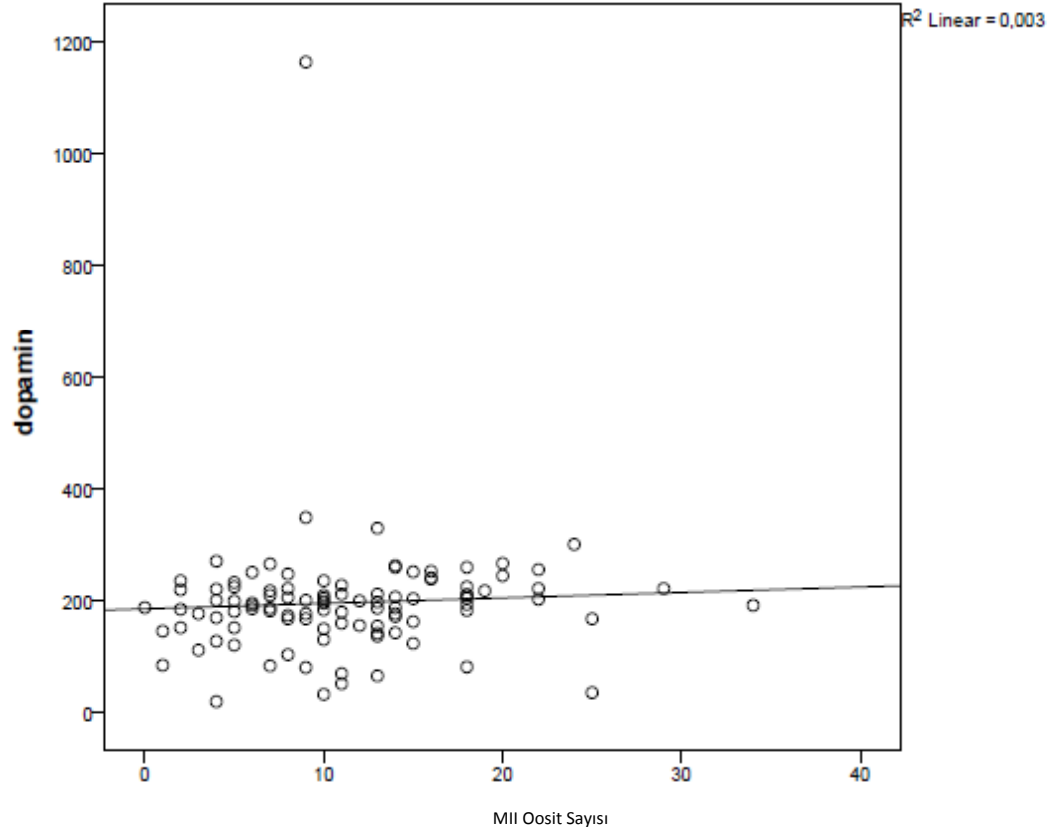
**Şekil 4.3.** PKOS ve Non-PKOS gruplarında gebelik oranları



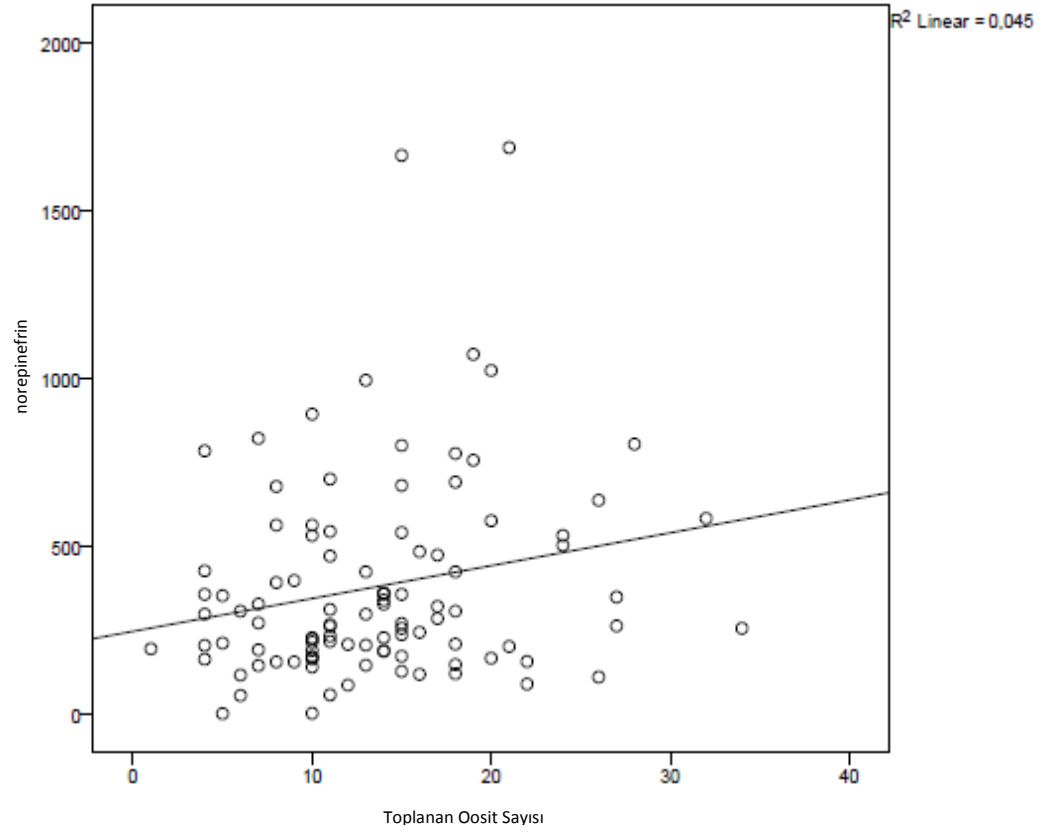
**Şekil 4.4.** PKOS ve Non- PKOS gruplarında hafif-şiddetli OHSS oranları

Değişkenler arasında katsayılar Spearman Korelasyon katsayısı kullanılarak incelendi. Foliküler sıvıda DA düzeyi ile MII oosit sayısı ile zayıf pozitif ilişki ( $r=0.198$ ), NE düzeyi ile toplanan oosit sayısı arasında zayıf pozitif ilişki saptandı ( $r= 0.205$ ). Foliküler sıvıdaki DA ve NE düzeyleri ile ikinci gün grade A aşamasında (D2GA), üçüncü gün grade A aşamasında (D3GA) ve beşinci gün

grade A aşamasında olan (D5GA) aşamasında olan embriyo sayısı, gebelik ve OHSS oranları arasında ilişki saptanmadı.



Şekil 4.5.DA ve MII oosit sayısı arasında ilişki



Şekil 4.6. NE ve toplanan oosit sayısı arasında ilişki

## 5. TARTIŞMA

Randomize prospektif olarak tasarlanan çalışmamız İVF-İCSİ tedavisi alan PKOS ve PKOS olmayan olgularda foliküler sıvıda NE ve DA düzeylerini ve IVF sonuçları ile ilişkisini karşılaştıran ilk çalışmadır. Bu çalışmada biz, PKOS hasta grubunda foliküler sıvıda NE ve DA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptadık. Kontrol grubunda D2GA embriyo sayısı daha fazla iken, PKOS grubunda gebelik oranları daha düşük ve hafif/orta OHSS oranları ise daha yüksekti.

Daha önce yapılan çalışmalarda katekolaminler, NE ve DA plazma ve ovaryen homojenatlarda ve foliküler sıvıda tespit edilmiştir (100, 101). NE`in folikül duvarındaki sempatik innervasyondan salındığı ve NE taşıyıcı enzim (NET) yardımı ile granüloza hücrelerin içine taşındığı bilinmektedir (102). Aynı çalışmada granüloza hücrelerde ve belirli oranda tekal hücrelerde NE metabolize eden enzimler bulunduğu gösterilmiştir. Geç proöströz fazda LH etkisi ile ve öströz fazda FSH etkisi ile ovaryen NE salınımında artışın olması, NE salınımının sadece nörotransmitterlerin kontrolünde olmadığını, gonadotropin kaynaklı hormonal sinyallerle de olduğu gösterilmiştir. Folikül sıvısındaki NE`in bir diğer kaynağı da DA`dir. Daha önce yapılan hayvan çalışmalarında oositler tarafından DA`in alınıp DATaşıyıcı enzim (DAT) ve DA Bağlayıcı Hormon (DBH) aracılığı ile NE`e dönüştürüldüğü gösterilmiştir (103).

Foliküller kan damarlarından yoksun oldukları için DA sinir uçlarından veya nörona benzer hücrelerden salınarak ekstrasellüler alandan folikül içine diffüzyon yolu ile geçer. Folikül içerisinde DA`in indirekt ve direkt rolü vardır, daha sık olarak görülen indirekt rol, DA taşıyıcı enzim içeren oositler tarafından tutularak NE sentezlenmesidir (104). Diğer direkt (fizyolojik) rol ise, DA D1-R ve DARPP-32 bulduran hücrelere bağlanmasıdır ve bu mekanizmanın foliküler gelişim, ovulasyon ve/veya korpus luteum regülasyonunda önemli olabileceği düşünülmektedir (105).

Daha önce yapılan pilot çalışmada 19 PKOS ve 21 PKOS olmayan hastada foliküler sıvıda NE ve metabolitlerinin düzeyleri karşılaştırılmıştır. PKOS grubunda

foliküler sıvıda DA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunsa da (102), NE düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşüktü (103). Çalışmacılar sonuçları `şaşırtıcı` olarak yorumlasalar da, PKOS hastalarda artmış sempatik innervasyon ile birlikte tekal kompartimentin de büyümüş olduğunun gözönünde bulundurulması gerektiği vurgulanmaktadır (94) ve PKOS grubunda NE`in daha düşük bulunması hipertekozis ile ilişkilendirmişlerdir. Oositte sadece tekal kat innerve olup, granüloza katında sinir uçları yoktur. Sinir uçlarından salınan NE diffüzyon ile granüloza katına geçebilmek için kalın bir tekal kat geçmelidir. Ayrıca tekal hücrelerde NET ve Katekolamin –o-metil transferaz enzimleri de bulunmuştur ve hipertekozis nedeni ile tekal katta bu enzimler aracı ile metabolize edilmesi NE düzeylerinin azalmasına sebep olabilir. Ancak bu mekanizma deneysel olarak kanıtlanmamıştır (103).

Çalışmamızda NE ve DA düzeylerinin yüksek saptanması PKOS için karakteristik olan sempatik hiperinnervasyon ile açıklanabilir (106). Bu çalışmada her iki grupta folikül sıvısındaki NE ve DA düzeylerinin oldukça geniş aralıkta değiştiğini gözlemledik, bu folikül duvarının innervasyonundaki farklılıklar ve/veya nörotransmitterlerin taşınması veya salınmasında rol alan sempatik uçlarla ilişkili olabilir (72, 94, 95).

NEgranüloza hücrelerdeki  $\beta$ -adrenerjik reseptörlere bağlanır,sAMP değerlerini yükseltir ve steroidogeneze rol oynar, bu ROT oluşması ile sonuçlanır (107). Bu çalışmada foliküler sıvıda ve granüloza hücrelerde NE`in majör metaboliti olan 4-hidroksi-3-metoksifenilglükol (MHPG) ve normetanefrinin foliküler sıvıda bulunduğu da gösterilmiştir. Bu metabolitlerin ROT`inin oluşmasına sebep olabileceği nöronlarda ve kardiyomiyositlerde gösterilmiştir. Bu hücrelerde ROT oksidatif stressle birlikte hücre membranı hasarına, DNA fragmentasyonuna neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır(108, 109).

Finkel ve ark, ROT`nin hücrenin önemli fizyolojik sinyal molekülleri olduğunu ve ovaryen fizyolojide önemli yere sahip olduğunu göstermiştir (90). Foliküler sıvı sitokinler, nötrofil ve makrofajlar içerir, bunlar da serbest oksijen radikalleri üretebilir. Kemiricilerle yapılan son çalışmalarda ROT`in ovulasyon için – kumulusun genişlemesinde ve preovülator folikülde LH ile indüklenmiş progesteron sentezinde gerekli olduğu gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada LH

maruziyetinin folikülde ROT düzeylerini arttırdığı ve tavşanlarla yapılan çalışmada ROT`inin superoksit dismutaz ile supresyonunun ovulasyonu engellediği bildirilmiştir(110, 111). Ayrıca, ROT`inin eşik değerlerinin reproduktif olaylarda ve İVF-İCSİsikluslarında daha iyi sonuçlar için gerekli olabilir (85). Bir çalışmada İVF-İCSİ ile gebe kalan kadınlarda gebe kalmayan kadınlara oranla daha yüksek ROT değerlerinin olduğu gösterilmiştir (112).

Mayerhofer ve ark, yaptığı çalışmada NE düzeylerinin 1-100 nM arasında olması granüloza hücrelerde sellüler viabiliteyi azaltmadığı, daha yüksek düzeylerinin(250-500 µM) ise ATP düzeyini ve hücre viabilitesini azalttığı gösterilmiştir (103). Bir başka çalışmada foliküler sıvıdaki yüksek ROT düzeylerinin oositlerin fertilizasyon potansiyelini azalttığı, daha yüksek oranda iyi kaliteli embriyoların düşük ROT düzeyleri (<100 cps - *counted photons per second*) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (113). Aynı çalışma grubunun yaptığı bir diğer çalışmada ise ROT`inin viable embriyo formasyonu için gerekli üst kontrol sınırı <107 cps/400µL olarak belirlenmiştir. ROT foliküldeki artmış düzeylerinin bozulmuş oosit matürasyonu ve fertilizasyon, düşük embriyo kalitesi ve azalmış gebelik oranları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (114).

ROT düzeyleri foliküler sıvıdaki DA, NE düzeyleri ve metabolik enzim düzeyleri ile ilişkilidir. Ayrıca, steroidogenezis için gerekli olan, sitokrom P-450 aracılı monooksijenaz reaksiyonları sonucunda, yan ürünler şeklinde ROT üretilebilir (115).

ROT ve kadın infertilitesi arasındaki ilişki son zamanlarda daha çok dikkat çekmektedir (86). Das ve ark. gelişen oositte, foliküler sıvıdaki ROT düzeylerini ve lipid peroksidasyonu`nu İVF-İCSİ`te embriyo kalitesini belirlemek için marker olarak önermişlerdir (113). ROT `inin yüksek düzeylerinin oksidatif stresse neden olarak oosit ve luteinize granüloza hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir(116). Preovulatr foliküller erken aşamada olan foliküllere göre oksidatif stresse daha duyarlıdır (117).Total antioksidan kapasitesi yüksek oosit fertilizasyon potansiyeli ve embriyo viabilitesi ile ilişkili bulunmuştur(84).

Foliküler atrezi apoptozis ve programlanmış hücre ölümünden kaynaklanan granülöza hücrelerinden başlayan siklik hadisedir. Granülöza hücrelerindeki yüksek apoptozis insidansının boş foliküller, toplanan oosit sayısında azlık, zayıf oosit ve embriyo kalitesi, düşük konsepsiyon ve gebelik oranları ile ilişkili olduğunu dair güçlü kanıtlar vardır (118).

PKOS olan ve olmayan hasta grubunda foliküler ROT değerlerini ve İVF-İCSİ sonuçlarına etkisini değerlendiren bir çalışmada ROT düzeylerinin ve lipid peroksidasyonu PKOS grubunda anlamlı olarak yüksek, total antioksidan kapasitesinin ise anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. Ayrıca, her iki grup içinde mayotik iğ oluşan ve oluşmayan oositler karşılaştırılırken, mayotik iğ oluşan gruplarda ROT ve LPO düzeyleri arasında anlamlı fark gözlenmezken, PKOS grubunun mayotik iğ oluşmayan subgrubunda ROT ve LPO düzeyleri anlamlı olarak yüksek saptandı (119).

Rajani ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada endometriozis, PKOS ve tubal faktör nedeni ile İVF-İCSİ yapılan hastalar mayotik iğ oluşan embriyo sayısı ve ROT düzeyleri karşılaştırılmıştır. PKOS grubu hastalarda mayotik iğ vizualize edilen oosit sayısı daha az, ROT düzeyleri ise daha yüksek bulunmuştur. Bu PKOS`lu hastalarda foliküler sıvıda bozulmuş antioksidan defans mekanizması ile ilişkili olup, ROT ve LPO ürünlerinin artmasına ve zayıf oosit ve embriyo kalitesinin sebebi olarak düşünülmektedir (120).

Yapılan bir başka çalışmada İVF-İCSİ yapılan PKOS`lu hastalarda granülöza hücrelerinde ROT oranları kontrol grubuna göre 20 kat fazla bulundu ve DNA fragmentasyonu oranları ile korele idi (114).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda kronik stress uygulanan hayvanlarda overin sempatik innervasyonunda, kortikosteronların plazma düzeylerinde ve adrenallerden salınan katekolamin düzeylerinde artış izlenmiştir. Stressin overde lokal etkisi olarak NE seviyelerinde artış ve prekistik folikül sayısında artış izlenmiştir (121). Bu veriler kronik stressin sempatik sinir aktivitesini arttırdığını ve artmış sempatik aktivitenin foliküler gelişimdeki değişiklikler ve prekistik yapılarla ilişkili olduğunu kuvvetli bir şekilde desteklemektedir.

Bir başka çalışmada  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin stimülasyonu için in vivo  $\beta$ -adrenerjik agonist izoproterenol kullanılmıştır. Foliküler gelişimin tamamlanması için sonuçlar çalışma bitiminde, 20 gün ve 30 gün sonra incelenmiştir. Tedavi bitiminden 30 gün sonra daha fazla artış olmakla, tedavi bitiminden itibaren artmış foliküler kistler gözlenmiştir. Çalışmacılar bu sonuçlardan yol alarak kломifen sitrat rezistan olan PKOS olgularında  $\beta$ -adrenerjik antagonistlerin kullanılabileceği ve ovulasyonun sağlanabileceği fikrini öne sürmüşlerdir (112).

Bu bilgiler dayanarak, İVF-İCSİ yapılan hastalarda foliküler sıvıda NE, DA ve ROT seviyelerini karşılaştıran daha geniş çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca PKOS patogeneğinde katekolaminlerin önemli yere sahip olduğu anlaşılmıştır, özellikle PKOS`lu hastalarda OHSS`nu öngörülmesinde foliküler sıvıda katekolamin düzeylerinin öneminin belirlenmesi, PKOS olgularında ovulasyonun sağlanması için  $\beta$ -antagonistlerin kullanımı, PKOS ve OHSS tedavisi, İVF sonuçlarının iyileştirilmesinde katekolamin agonistlerinin kullanımının yerinin belirlenmesi için ileride daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda infertilite tedavisinde özel yere sahip PKOS`lu hastalar ve diğer nedenlerden dolayı İVF-İCSİ yapılan hastaların folikül sıvılarında NE ve DA düzeyleri, embriyo kalitesi ve gebelik sonuçları ile ilişkileri incelendi.

Biz bu çalışmada PKOS`lu hastalarda foliküler sıvıda NE ve DA`in kontrol grubuna göre daha yüksek oranlarda olduğunu tespit ettik. Kontrol grubunda D2GA embriyolar anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu PKOS hasta grubunda yüksek NE ve DA düzeyleri ile açıklanabilir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre PKOS grubunda gebelik oranları istatistiksel anlamlı olmasa da, kontrol grubuna göre daha düşük, hafif/orta şiddetli OHSS oranları ise daha yüksektir.

Yapılan meta-analizlerde İVF-İCSİ tedavisi alan PKOS hastalarda çok sayıda oosit toplanmasına rağmen, yüksek siklus iptal oranları ve düşük fertilizasyon oranları saptanmıştır (117). Toplanan oositlerin çoğu zaman immatür ve zayıf kaliteli olduğu bilinmektedir. Toplanan oosit sayısı, embriyo kalitesi ve gebelik ve OHSS oranlar bakımından elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

Ayrıca bu çalışmada ilk kez, foliküler sıvıdaki DA ile toplanan oosit sayısı ve NE ile MII oosit sayısı arasında pozitif ilişki saptadık.

## ÖZET

**PKOS ve PKOS olmayan İVF-İCSİ vakalarında foliküler sıvıda dopamin ve norepinefrin düzeylerinin incelenmesi: ovulasyon indüksiyonu ve İVF-İCSİ sonuçlarına etkisinin değerlendirilmesi**

**Amaç:** Bu çalışmada İVF-İCSİ'e alınan Polikistik over Sendromu (PKOS) olan ve olmayan hastalarda foliküler sıvıda NE ve DA düzeylerinin ölçülmesini, ovulasyon indüksiyonu ve İVF-İCSİ sonuçlarına etkisinin gösterilmesini hedefledik.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya dahil edilen 108 infertil hasta 2 gruba: PKOS grubu (n=47) ve Non- PKOS grubu (n=61) değerlendirildi. Non-PKOS grubuna erkek infertilitesi veya izah edilemeyen infertilite nedeni ile İVF-İCSİ'e alınan hastalar, PKOS grubuna ise Androgen Excess Society (AES)kriterlerine göre (16) PKOS tanısı alan ve İVF-İCSİ'e yönlendirilen hastalar dahil edildi.

Çalışmada her iki gruba GnRH agonist veya antagonist rejimi ile KOH (kontrollü overyan hiperstimülasyon) yapıldıktan sonra foliküler sıvıda NE ve DA düzeyleri tespit edilerek, toplanan oosit sayısı, MII oosit sayısı, , en iyi kalitede embriyo sayısı, gebelik ve OHSS oranları ile korele edildi.

**Sonuçlar:** PKOS olan hastalarda foliküler sıvıda NE ve DA düzeylerinin PKOS olmayan hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı. Ayrıca toplanan oosit sayısı ve MIIoosit sayısı PKOS grubunda daha yüksek bulunurken, 2. gün grade A aşamasında olan embriyo sayısı kontrol grubunda daha yüksek olarak saptandı. Gebelik oranları bakımından iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmasa da, PKOS grubunda gebelik oranları daha düşük, hafif/orta OHSS oranları ise daha yüksek olarak saptandı.

**Yorum:**PKOS`lu hastalarda folikül sıvısında yüksek NE ve DA düzeyleri anovulasyon, kötü oosit ve embriyo kalitesi, düşük fertilizasyon ve gebelik oranları ve yüksek OHSS oranları ile ilişkili olabilir.

**Anahtar sözcükler:** İn Vitro Fertilizasyon, Polikistik Over Sendromu, Norepinefrin,Dopamin, Foliküler Sıvı

## SUMMARY

### **Follicular fluid levels of DA and NE of IVF-ICSI patients with or without Polycystic ovary syndrome; and it's relation with ovulation induction and IVF-ICSI outcomes**

**Purpose:** In this study our primary aim was to evaluate the effects of follicular fluid DA and NE levels on IVF-ICSI and ovulation induction outcomes in patient with and without PCOS.

**Method:** Total of 108 infertile patients were included in the study. Two groups were formed from patient with PCOS(n=47) and those without PCOS(n=61). PCOS group patients were diagnosed according to AES criteria. Patient without PCOS were admitted for IVF-ICSI cycle due to either male factor infertility or unexplained infertility.

Both groups underwent controlled ovarian hyper stimulation with either GnRH agonist or antagonist regime. At the time of oocyte pick-up procedure follicular fluid was collected and stored. Number of oocytes collected, MII oocyte count, good quality embryo count and OHSS rates were recorded and later were compared with DA and NE levels in follicular fluid.

**Results:** In patients with PCOS follicular fluid NE and DA levels were higher than those without PCOS. Number of oocytes retrieved and MII oocyte count were higher in PCOS group. Number of Grade A embryo was higher in patient without PCOS. Pregnancy rates were similar between two groups, albeit statistically insignificant lower rates of pregnancy and higher rates of mild OHSS were detected in PCOS group.

**Discussion:** In patients with polycystic ovary syndrome undergoing IVF-ICSI cycles, follicular fluid level of NE and DA was higher, which maybe associated with anovulation, poor oocyte and embryo quality, lower rate of fertilisation and pregnancy and higher rates of OHSS.

**Keywords:** In Vitro Fertilisation, Polycystic Ovary Syndrome, Norepinephrine, Dopamine, Follicular Fluid

## 7. KAYNAKLAR

1. Leridon H, Slama R. The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. *Hum Reprod.* 2008 Jun;23 (6):1312- 9.
2. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008; 90:S60.
3. Chandra A, Copen CE, Stephen EH. Infertility and Impaired Fecundity in the United States, 1982–2010: Data From the National Survey of Family Growth. *Natl Health Stat Report* 2013; 57:1.
4. Slama R, Hansen OK, Ducot B, et al. Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum Reprod* 2012; 27:1489.
5. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012; 9:e1001356.
6. Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospec randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1999;14:2581–7.
7. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R. *Fertil Steril.* 2012;97(1):28–38. doi:10.1016/j.fertnstert. 2011.09.024. e25.

8. Koivunen, R., Pouta, A., Franks, S., Martikainen, H., Sovio, U., Hartikainen, A.-L., McCarthy, M., Ruukonen, A., Bloigu, A., Jarvelin, M., Morin-Papunen, L., 2008. Fecundability and spontaneous abortions in women with self-reported oligoamenorrhea and/or hirsutism: Northern Finland Birth Cohort 1966 Study. *Hum. Reprod.* 23, 2134–2139.
9. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Reznick AZ, Ishai D, Lahav-Baratz S, Shiloh H, Koifman M, Dirnfeld M. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermo chemiluminescence assay correlate with outcome
10. Costa LO, Mendes MC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Silva de Sá MF. Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Nov;37 (11):1747- 55.
11. Lara H.E., Ferruz, J.L., Luza, S. et al. (1993) Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 133, 2690–2695
12. Heider, U., Pedal, I. & Spanel-Borowski, K. (2001) Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertility Sterility*, 75, 1141–1147.
13. Van Loon GR. Plasma DAE: regulation and significance. *Fed Proc* 1983; 42:3012–3018.
14. Dissen, G.A., Garcia-Ruda, C., Paredes, A. et al. (2009) Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology*, 150, 2906–2914.
15. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181–191.

16. Zawadski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome. In: Givens JHF, Merriman G, editors. *The Polycystic Ovary Syndrome*. Cambridge, MA: Blackwell Scientific; 1992:377–384
17. Attar E, Ata B. (2007) GOMEL'in Jinekolojisi 1. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s: 293-304.
18. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81:19–25.
19. Azziz R, Carmina E, DeWailly D, et al. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4237–4245.
20. Yildiz BO, Bozdog G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2012. doi:10.1093/humrep/des232
21. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010;25(2): 544–551.
22. Mehrabian F, Khani B, Kelishadi R, Ghanbari E. The prevalence of polycystic ovary syndrome in Iranian women based on different diagnostic criteria. *Endokrynol Pol*. 2011;62(3):238–242.
23. Tehrani FR, Simbar M, Tohidi M, Hoseinpanah F, Azizi F. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample of Iranian population: Iranian PCOS prevalence study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:39

24. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, et al. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod* 2003; 18:1959.
25. Halman LJ, Abbey A, Andrews FM. Why are couples satisfied with infertility treatment? *Fertil Steril* 1993; 59:1046.
26. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012; 98:302.
27. Codner E, Soto N, Lopez P, et al. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome and ovarian morphology in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2250–2256.
28. Peppard HR, Marfori J, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence of polycystic ovary syndrome among premenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24:1050–1052.
29. Kashanian M, Fazy Z, Pirak A. Evaluation of the relationship between gestational diabetes and a history of polycystic ovarian syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;80(2):289–292.
30. Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine. Child-rearing ability and the provision of fertility services: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013; 100:50
31. Jaques AM, Amor DJ, Baker HW, et al. Adverse obstetric and perinatal outcomes in subfertile women conceiving without assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2010; 94:2674.

32. Chen ZJ, Zhao H, He L, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat Genet.* 2011;43:55–59
33. Nelson- Degrave VL, Wickenheisser JK, Cockrell JE, et al/ Valproate potentiates androgen biosynthesis in human ovarian theca cells. *Endocrinology* 2004; 145; 799
34. Joffe H, Cohen LS, Suppes T, et al. Valproate is associated with new-onset oligoamenorrhoea with hyperandrogenism in women with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2006; 60:137
35. Polycystic Ovary Syndrome: Diagnosis and Treatment Tracy L. Setji, MD, Ann J. Brown, MD, MHS Department of Medicine, Division of Endocrinology, Duke University Medical Center, Durham, NC. *The American Journal of Medicine* (2007) 120, 128-132
36. Rebar R, Judd HL, Yen SS, et al. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1976; 57:1320.
37. Balen AH. Hypersecretion of luteinizing hormone and the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1993; 8 Suppl 2:123.
38. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, et al. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:165.
39. Taylor AE, McCourt B, Martin KA, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2248.

40. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1318.
41. Nilsson C, Jiang M, Pettersson K, et al. Determination of a common genetic variant of luteinizing hormone using DNA hybridization and immunoassays. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49:369.
42. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, et al. Primary amenorrhea and infertility due to mutation in the [beta] subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet.* 1993;5:83–86.
43. Adams JM, Taylor AE, Crowley WF Jr, Hall JE. Polycystic ovarian morphology with regular ovulatory cycles: insights into the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4343.
44. Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, et al. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2001.
45. Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, et al. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:48.
46. Dokras A, Jagasia DH, Maifeld M, et al. Obesity and insulin resistance but not hyperandrogenism mediates vascular dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 86:1702.
47. Barber TM, McCarthy MI, Wass JA, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65:137.

48. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 1989;38:1165–1174
49. Nestler JE, Barlascini CO, Matt DW, et al. Suppression of serum insulin by diazoxide reduces serum testosterone levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68:1027–1032.
50. Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62:644.
51. Korhonen S, Hippeläinen M, Niskanen L, et al. Relationship of the metabolic syndrome and obesity to polycystic ovary syndrome: a controlled, population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:289.
52. Goldzieher JW, Axelrod LR. Clinical and biochemical features of polycysticovarian disease. *Fertil Steril* 1963; Now-Dec:14:631-53.
53. Dunaif A, Graf M, Maodeli J, Laumas V, Dobrjansky A, Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose intolerance and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:499-507.
54. Sadler TW. *Medikal Embriyoloji (Çev: Başaklar CA) s.9-12, PalmeYayıncılık, Ankara, 1996.*
55. Greenspan`s *Basic and Clinical Endocrinology*, 9th edition, David G, Gardner, Dolares Shobach, 2011
56. Hoff JD, Quigley ME, Yen SS. Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983 Oct;57 (4):792-6

57. Takekida, S., Matsuo, H. and Maruo, T. (2003) GnRH agonist action on granulosa cells at varying follicular stages. *Mol Cell Endocrinol* 202:155–164.
58. Jarkovska K, Kupcova Skalnikova H, Halada P, Hrabakova R, Moos J, Rezabek K, et al. Development of ovarian hyperstimulation syndrome: interrogation of key proteins and biological processes in human follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Mol Hum Reprod* 2011;17: 679–92.
59. Somfai T, Inaba Y, Watanabe S, Geshi M, Nagai T. 2012. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. *Reproduction, Fertility, and Development* 24: 743– 752.
60. Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF III. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:705-13.
61. Blerkom JV. An overview of determinants of oocyte and embryo developmental competence: specificity, accuracy and applicability in clinical IVF. Ed:Gerris J,Adamson GD, De Sutter P, Racowsky C. *Single Embryo Transfer*, pp 29, Cambridge University Press,New York, 2009
62. Strauss III JF, Williams CJ. *The Ovarian Life Cycle*. Ed: Strauss III JF. Yen & Jaffe's *Reproductive Endocrinology*, 6th Edition,pp 168-169, Saunders, Philadelphia, 2010.
63. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod*.2002 Apr;17 (4):1017-22.
64. 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 May 4;7:40.

65. Hunghesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and so-called hyperthecosis. *JCEM* 1982; 65: 233-6.
66. Weitzman VN, Schnee-Riesz J, Benadiva C, Nulsen J, Siano L, Maier D. Predictive value of embryo grading for embryos with known outcomes. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93 (2):658-62.
67. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting, *Human Reproduction*. 2011;26(6):1270–1283.
68. Ojeda S, Skinner M 2006 Puberty in the rat. In: Neill JD, ed. *The physiology of reproduction*. San Diego: Academic Press/Elsevier; 2061–2126
69. Baljet B, Drukker J. 1979. Extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat* 104:243–267
70. Lara HE, Dees WL, Hiney JK, Dissen GA, Rivier C, Ojeda SR. 1991. Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology* 129:1849–1860
71. Boerboom D, White LD, Dalle S, Courty J, Richards JS 2006 Dominant-stable -catenin expression causes cell fate alterations and Wnt signaling antagonist expression in a murine granulosa cell tumor model. *Cancer Res* 66:1964–7193
72. Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE 2005 Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 28:319–324
73. D’Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees WL, Ojeda SR 2002 Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech* 59: 484–489

74. Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR 1998 Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10990–10995
75. Lawrence Jr IE, Burden HW 1980 The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196:51–59
76. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR 1993 Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133:2690–2695
77. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE 1993 Ovarian steroidal response to gonadotropins and  $\alpha$ -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133:2696–2703
78. Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci JA 2008 Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology* 149:2907–2916
79. Bahr JM, Ben-Jonathan N. 1985. Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation. *Endocrinology* 117:620–623.
80. Lara HE, Belmar J. 1991. Release of norepinephrine from the cat ovary: Changes after ovulation. *Biol Reprod* 44:752–759.
81. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR 1997 A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138:3320–3329
82. Morley P, Calaresu FR, ArmstrongDT 1990 Catecholamines inhibit steroidogenesis by cultured porcine thecal cells. *FEBS Lett* 275: 70–72

83. Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A, Lara HE 2008 Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 149:4988–4996
84. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N 2011 Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:1462–1467
85. Yildirim B, Demir S, Temur I, Erdemir R, Kaleli B. Lipid peroxidation in follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome during assisted reproduction cycles. *J Reprod Med* 2007;52:722-6
86. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. *Reprod Biomed Online* 2005;11:641-50.
87. Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: A review. *Reprod Biomed Online* 2006;12:500-6.
88. Qiao J, Feng HL 2011 Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update* 17:17–33
89. Serke H, Bausenwein J, Hirrlinger J, Nowicki M, Vilser C, Jogschies P, Hmeidani FA, Blumenauer V, Spaniel-Borowski K 2010 Granulosa cell subtypes vary in response to oxidized low-density lipoprotein as regards specific lipoprotein receptors and antioxidant enzyme activity. *J Clin Endocrinol Metab* 95:3480–3490
90. Finkel T 2011 Signal transduction by reactive oxygen species *J Cell Biol* 194:7–15

91. Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K 2001 Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril* 75:1141–1147
92. Sverrisdóttir YB, Mogren T, Kataoka J, Janson PO, Stener-Victorin E 2008 Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E576–E581
93. Garcia-Rudaz C, Armando I, Levin G, Escobar ME, Barontini M 1998 Peripheral catecholamine alterations in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:221–228
94. Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A, Ojeda SR 2009 Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology* 150:2906–2914
95. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE 1993 Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133:2696–270
96. Jedel E, Labrie F, Ode'n A, Holm G, Nilsson L, Janson PO, Lind AK, Ohlsson C, Stener-Victorin E 2011 Impact of electro-acupuncture and physical exercise on hyperandrogenism and oligo/amenorrhea in women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E37–E45
97. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. 2000. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low-affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141: 1059–1071.

98. Rey-Ares V, Lazarov N, Berg D, Berg U, Kunz L, Mayerhofer A 2007 A Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 5:40
99. Go´mez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Zimmermann RC, Simo´n C, Gaytan F, Pellicer A. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2484–2492.
100. Van Loon GR. Plasma dopamine: regulation and significance. *Fed Proc* 1983; 42:3012–3018.
101. Lara HE, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM, Fuhrer J, Miranda C, Roblero L. Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 2001;15:187–192
102. S. Saller<sup>1</sup>, L. Kunz, D. Berg, U. Berg, H. Lara, J. Urrea, S. Hecht, R. Pavlik, C.J. Thaler, and A. Mayerhofer Dopamine in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: implications for physiology and pathology *Human Reproduction*, Vol.29, No.3 pp. 555–567, 2014
103. S. Saller, J. Merz-Lange, S. Raffael, S. Hecht, R. Pavlik, C. Thaler, D. Berg, U. Berg, L. Kunz, and A. Mayerhofer Norepinephrine, Active Norepinephrine Transporter, and Norepinephrine-Metabolism Are Involved in the Generation of Reactive Oxygen Species in Human Ovarian Granulosa Cells *Endocrinology*, March 2012, 153(3):1472–1483
104. Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR. Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:10990–10995

105. Artur Mayerhofer, Hugh C. Hemmings Jr., Gretchen L. Snyder, Paul Greengard, Sylvia Boddien, Ulrike Berg, And Cosima Brucker Functional DAe-1 Receptors and DARPP-32 Are Expressed in Human Ovary and Granulosa Luteal Cells in *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 0021-972X/99/\$03.00/0 Vol. 84, No. 1
106. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB 2008 Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update* 14:345–357
107. Lara HE, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM, Fuhrer J, Miranda C, Roblero L. Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 2001;15:187–192
108. Neri M, Cerretani D, Fiaschi AI, Laghi PF, Lazzerini PE, Maffione AB, Micheli L, Bruni G, Nencini C, Giorgi G, D’Errico S, Fiore C, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Fineschi V 2007 Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med* 11:156–170
109. Mao W, Qin F, Iwai C, Vulapalli R, Keng PC, Liang CS 2004 Extracellular norepinephrine reduces neuronal uptake of norepinephrine by oxidative stress in PC12 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H29–H39
110. Yacobi K, Tsafiriri A, Gross A (2007) Luteinizing hormone-induced caspase activation in rat preovulatory follicles is coupled to mitochondrial steroidogenesis. *Endocrinology* 148:1717–1726.
111. Miyazaki T, et al. (1991) Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 91: 207–212

112. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2000;45:314–20
113. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K: Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod* 2006; 21: 2403–2407
114. Karuputhula NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59:91–98
115. Fujii J, Iuchi Y, Okada F: Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 43
116. Spaniel-Borowski, K. (2010) Ovulation as danger signaling event of innate immunity *Mol Cell Endocrinol* 333:1–7.
117. Oyawoye O, Gadir AA, 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
118. Saito, H., Seino, T., Kaneko, T., Nakahara, K., Toya, M. and Kurachi, H. (2002) Endometriosis and oocyte quality. *Gynecol Obstet Invest* 53:46–51.
119. R. Chattopadhyay a A. Ganesh b J. Samanta a S.K. Jana b B.N. Chakravarty a K. Chaudhury Effect of Follicular Fluid Oxidative Stress on Meiotic Spindle Formation in Infertile Women with Polycystic Ovarian Syndrome *Gynecol Obstet Invest* 2010;69:197–202
120. Elsenbruch S, Hahn S, Kowalsky D, Offner AH, Schedlowski M, Mann K, Janssen OE (2003) Quality of life, psychosocial wellbeing, and sexual

satisfaction in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5801–5807

121. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman R, Spiegel AM. 1991. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 325:1688–1695.
122. H.E. Lara, M. Dorfman, M. Venegas, S.M. Luz.L. Luna,. Mayerhofer.A. Guimaraes,A.M. Rosa E Silva, And V.D. Rami´Rez Changes in Sympathetic Nerve Activity of the Mammalian Ovary During a Normal Estrous Cycle and in Polycystic Ovary Syndrome: Studies on Norepinephrine Release *Microscopy Research And Technique* 59:495–502 (2002)

## EKLER

### Ek 1.Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Sayın.....

Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Kadın Doğum ve Üreme Sağlığı merkezine 35 yaş altı nedeni izah edilemeyen infertilite nedeni ile başvurmuş olup,size en uygun görülen tedavi yöntemini almaktasınız.İvf (in vitro fertilizasyon) tedavisinde hastalara OPU (oosit toplama işlemi) uygulanmaktadır.Bu işlem esnasında sizden alınan folikül sıvısında norepinefrin ve dopamin düzeylerine bakılacaktır.Bu işlemin size veya tedaviye etkisi yoktur.

Çalışma süresince rutin tüp bebek uygulamalarında olduğu gibi ultrasonografi,kan hormon düzeyleri takipleri ve rutin tedavi protokolünüz uygulanacaktır.Çalışmaya 100 hasta dahil edilecek ve OPU(yumurta toplama işlemi) esnasında elde edilen folikül sıvılarında bakılan norepinefrin ve dopaminin gebelik oranları ile korelasyonuna bakılacaktır. Çalışmaya katılım tamamı ile kendi rızanıza bağlıdır ve istediğiniz takdirde istediğiniz zaman tek taraflı olarak çalışmadan çekilme hakkına sahip olduğunuzu bilmelisiniz. Sizden bu çalışma için yapılacak testlerden dolayı hiçbir ek ücret talep edilmeyecektir.

Aklınıza takılan herhangi bir soru olduğu takdirde arayabileceğiniz numaralar:

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD: 312 595 64 05

Sorumlu araştırmacı: Doç. Dr. Batuhan Özmen: 312 595 64 05

`PKOS ve PKOS olmayan İVF vakalarında folliküler sıvıda dopamin ve norepinefrin düzeylerinin incelenmesi: ovulyasyon indüksiyonu ve İVF sonuçlarına etkisinin değerlendirilmesi` başlıklı çalışma bana sözlü olarak da açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularına tatmin edici cevaplar aldım. Çalışmaya kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı-Soyadı:

Tarih:

İmza:

Doktor Adı-Soyadı:

Tarih:

İmza:

Tanıklık Eden Kurum Yetkilisinin

Adı-Soyadı:

Tarih:

İmza: