T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İN VİTRO FERTİLİZASYONA GİDEN HASTALARIN SERUM VE FOLİKULER SIVISINDA VİTAMİN, MİKROELEMENT, MAKROELEMENT DÜZEYLERİNİ VE OKSİDATİF VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİ ARAŞTIRMAK

Dr. Raziye ŞENTÜRK

UZMANLIK TEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Esra Nur TOLA

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Yönetim Birimi tarafından 4913-TU2-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

ISPARTA – 2018

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen, değerli bilgi ve zamanını sabırla benimle paylaşan kıymetli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Esra Nur Tola başta olmak üzere; değerli hocalarım Prof. Dr. Gökhan Bayhan, Prof. Dr. Baha Oral, Prof. Dr. Okan Özkaya, Prof. Dr. Mekin Sezik, Prof. Dr. Mehmet Güney, Prof. Dr. Evrim Erdemoğlu, Doç. Dr. İlker Günyeli'ye;

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan Doç. Dr. Duygu Kumbul Doğuç ve Dr. Mustafa Bozkurt'a,

Tez çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen tüm İVF ünitesi embriyolog, hemşire ve yardımcı sağlık personellerine,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan zevk duyduğum asistan arkadaşlarıma, özveriyle çalışan tüm hemşire ve personellerimize,

Tezimin yapılabilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan değerli SDÜ BAP Komisyonu'na,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen sabırla fedakarlıklarla beni yetiştiren canım anneme ve babama, her türlü sevincimi ve sıkıntımı paylaştığım sevgili kardeşlerime,

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlama dönemimdeki tüm sıkıntı ve mutlulukları benimle paylaşan, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen değerli eşime ve hayatımın en güzel hediyesi biricik kızım Zeynep Serra'ya,

Sevgi ve teşekkürlerimi sunarım…

Dr. Raziye ŞENTÜRK

ISPARTA - 2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **vi**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. İnfertilite 3
2.1.1. İnfertilite Tanımı 3
2.1.2. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi 3
2.1.2.1. Anamnez 4
2.1.2.2. Fizik Muayene 5
2.1.2.3. Ultrasonografi 5
2.1.2.4. Laboratuar 5
2.1.2.5. Histerosalpingografi (HSG) 6
2.1.2.6. Laparoskopi ve Histeroskopi 6
2.1.3. İnfertiliteye Yol Açan Spesifik Faktörlerin Değerlendirilmesi 6
2.1.3.1. Ovulatuar Bozukluklar 6
2.1.3.2. Overyan Folikul Rezervi 8
2.1.3.3. Tubaperitoneal Bozukluk 10
2.1.3.4. Uterin Faktörler 11
2.1.3.5. Servikal Bozukluk 11
2.1.3.6. Erkek Faktörü 12
2.1.4. İnfertilite Tedavisinde İn Vitro Fertilizasyon Yöntemleri 12
2.1.4.1. Kontrollu Overyan Stimulasyon 13
2.1.4.2. Tedavide Monitorizasyon 14
2.1.4.3. Ovulasyonun Tetiklenmesi 15
2.1.4.4. İCSİ-ET Yöntemi 15
2.1.4.5. Luteal Faz Desteği 17
2.2. Folikuler Sıvı 17
2.3. Kalsiyum 18
2.3.1. Oosit Maturasyonunda Kalsiyumun Rolü 18

2.3.2. Fertilizasyonda Kalsiyumun Rolü 19
2.4. D Vitamini 20
2.4.1. Fertilizasyonda D Vitamininin Rolü 21
2.5. B12 Vitamini 21
2.5.1. Fertilizasyonda B12 Vitamininin Rolü 22
2.6. Folik Asit 24
2.6.1. Fertilizasyonda Folik Asitin Rolü 25
2.6.2. Folik Asit ve Vitamin B12 İlişkisi 25
2.7. Homosistein 25
2.7.1. Fertilizasyonda Homosisteinin Rolü 26
2.8. Demir ve Ferritin 27
2.8.1. Demir 27
2.8.2. Ferritin 29
2.8.3. Fertilizasyonda Demir ve Ferritinin Rolü 29
2.9. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres 30
2.9.1. Serbest Radikaller 30
2.9.2. Antioksidanlar 30
2.9.2.1. Endojen Antioksidanlar 31
2.9.2.2. Eksojen Antioksidanlar 31
2.9.3. Oksidatif Stres 32
2.9.3.1. Oksidatif Stresin Etkileri 32
2.9.4. Total Antioksidan Status 33
2.9.5. Total Oksidan Status 34
2.9.6. Oksidatif Stres İndeksi 34
2.9.7. Fertilizasyonda Oksidatif Stresin Rolü 35
3. MATERYAL-METOD 37
3.1. Materyal 37
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler 37
3.1.2. Kullanılan Reaktif Malzemeleri 38
3.2. Metod 38
3.2.1. Hastaların Seçimi 38
3.2.2. Kontrollu Overyan Stimulasyon 40
3.2.3. Tedavi Monitorizasyonu ve Oosit Pick-up İşlemi 40
3.2.4. Folikul Sıvılarının ve Serumun Elde Edilmesi ve Hazırlanması 41

3.2.5. İCSİ İşlemi ve Embriyo Transferi 42
3.2.6. Folikul Sıvısı ve Serumda Araştırılan Parametrelerin Tayini..... 43
3.2.6.1. Folikuler Sıvı ve Serumda TAS ve TOS Düzeylerinin Tayini 43
3.2.6.2. Folikuler Sıvı ve Serumda Homosistein Çalışma Prensibi 44
3.2.6.3. Folikuler Sıvı ve Serumda Demir ve Kalsiyum Düzeylerinin Tayini 44
3.2.6.4. Ferritin, folik asit, 25(OH)D_3 ve vitamin B12 çalışma prensibi: 45
3.2.7. İstatiksel Analiz 45
4. BULGULAR 46
4.1. Gruplar Arası Temel Karakteristik Özelliklerin Karşılaştırılması 46
4.2. Gruplar Arası Overyan Stimulasyon Özellikleri ve Embriyolojik Parametreler..... 49
4.3. Gruplar Arası İn Vitro Fertilizasyon Siklusu Başarısının Karşılaştırılması.... 53
4.4. Araştırılan Parametrelerin Gruplar Arası Serum Seviyeleri..... 56
4.5. Araştırılan Parametrelerin Gruplar Arası Folikuler Sıvı Seviyeleri 59
4.6. Gebe Kalan ve Kalmayan Grup Arası Temel Özelliklerinin, İVF Verilerinin ve Araştırılan Parametrelerin Karşılaştırılması..... 63
4.7. Araştırılan Parametrelerin Serum Değerleri ile Bazal Karakteristik Özellikler ve Embriyolojik Parametreler ile Korelasyonu 67
4.8. Araştırılan Parametrelerin Folikuler Sıvı Değerleri ile Bazal Karakteristik Özellikler ve Embriyolojik Parametreler ile Korelasyonu 69
4.9. Araştırılan Parametrelerin Serum ve Folikuler Sıvı Değerlerinin Birbiriyle Korelasyonu..... 71
5. TARTIŞMA 73
SONUÇ..... 86
ÖZET..... 87
SUMMARY 88
KAYNAKLAR 89

SİMGELER ve KISALTMALAR

İVF **:**İn vitro fertilizasyon
FS **:**Folikuler sıvı
Ca^{+2} **:**Kalsiyum
TAS **:**Total antioksidan status
TOS **:**Total oksidan status
PKOS **:**Polikistik over sendromu
VKİ **:**Vücut kitle indeksi
TV-USG **:**Transvaginal ultrasonografi
FSH **:**Folikul stimulan hormon
LH **:**Luteinizan hormon
E_2 **:**Estradiol
AMH **:**Antimüllerian hormon
TSH **:**Tiroid stimulan hormon
HBsAg **:**Hepatit B antijeni
Anti-HBs **:**Hepatit B yüzey antikoru
Anti-HCV **:**Hepatit C antikoru
Anti-HIV **:**İnsan immun yetmelik virusu antikoru
IgG **:**İmmunoglobulin G
IgM **:**İmmunoglobulin M
HSG **:**Histerosalpingografi
PG **:**Progesteron
CL **:**Korpus luteum
CC **:**Klomifen sitrat
EFORT **:**Eksojen folikul stimulan hormone overyan rezerv testi
Sc **:**Subkutan
AFS **:**Antral folikul sayısı
KOS **:**Kontrollu overyan stimulasyon
OHSS **:**Ovaryen hiperstimulasyon sendromu
PIH **:**Pelvik inflamatuar hastalık
Hcg **:**Human koryonik gonadotropin
OPU **:**Oosit pick-up

GIFT **:**Gamet intra fallopian transfer

ZIFT **:**Zigot intrafallopian transfer

İVF-ET **:**İn vitro fertilizasyon ve embriyo transferi

İCSİ **:**İntrastoplazmik sperm injeksiyonu

İCSİ-ET **:**İntrastoplazmik sperm injeksiyonu ve embriyo transferi

MII **:**Metafaz II

GnRH **:**Gonadotropin salgılatıcı hormon

r-hCG **:**Rekombinan human koryonik gonadotropin

ZP **:**Zona pellusida

CO_2 **:**Karbondioksit

PVP **:**Polivinilpirolidin

im **:**İntramuskuler

ROT **:**Reaktif oksijen türleri

MPF **:**Maturasyon promoting(başlatan) faktör

GV **:**Germinal vezikül

25 (OH) D **:**25-hidroksivitamin D

1,25 $(OH)_2$ D **:**1,25-dihidroksivitamin D

25$(OH)D_3$ **:**25-hidroksi D_3

VDR **:**D vitamini reseptörü

HOXA-10 **:**Homeobox A10

CoA **:**Koenzim A

DNA **:**Deoksi ribo nukleik asit

RNA **:**Ribonukleik asit

NTD **:**Nöral tüp defekti

MTHFR **:**Metilen tetrahidrofolat redüktaz

RSA **:**Rekurren spontan abortus

Fe^{+3} **:**Ferrik demir

Fe^{+2} **:**Ferröz demir

O_2^- **:**Süperoksit radikali

H_2O_2 **:**Hidrojen peroksit

OH^- **:**Hidroksil radikali

OS **:**Oksidatif stres

MDA **:**Malondialdehit
Cu **:**Bakır
Zn **:**Çinko
Mn **:**Manganez
Se **:**Selenyum
SOD **:**Süperoksit dismutaz
GSH-Px **:**Glutatyon peroksidaz
GSH R **:**Glutatyon redüktaz
NADPH **:**Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
TAK **:**Total antioksidan kapasite
TAA **:**Total antioksidan aktivite
TAOP **:**Total antioksidan güç
$_1O_2$ **:**Singlet oksijen
NO **:**Nitrik oksit
OSİ **:**Oksidatif stres indeksi
SDÜ **:**Süleyman Demirel Üniversitesi
BAP **:**Bilimsel Araştırma Projeleri
DOR **:**Düşük overyan rezerv
FGS **:**Ferriman–Gallway skoru
DHEA-S **:**Dehidroepiandrosteron sülfat
WHO **:**Dünya Sağlık Örgütü
PRL **:**Prolaktin
EZ **:**Empty (boş) zona
ELİSA **:**Enzim-Linked İmmunosorbent Assay
TPTZ **:**Tripiridil triazin
ECLIA **:**Elektrokemiluminesans immunoassay
TPA **:**Tripropilaminin
SET **:**Single embriyo transfer
DET **:**Diembriyo transfer
EMK **:**Endometrial kalınlık
HCY :Homosistein

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. İnfertilite etyolojisi dağılımı 3
Tablo 2. Semen analizi 12
Tablo 3. Gruplar arası bazal karakteristik özellikler 48
Tablo 4. Grupların overyan stimulasyon özellikleri ve embriyolojik veriler 52
Tablo 5. Gruplar arası İVF başarısı göstergeleri 55
Tablo 6. Araştırılan parametrelerin gruplar arası serum seviyeleri 58
Tablo 7. Araştırılan parametrelerin gruplar arası folikuler sıvı seviyeleri 62
Tablo 8. Gebe kalan ve kalmayan grubun temel özelliklerinin, İVF verilerinin ve araştırılan parametrelerin karşılaştırılması. 66
Tablo 9. Araştırılan parametrelerin serum değerleri ile bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler ile korelasyonu. 68
Tablo10. Araştırılan parametrelerin folikuler sıvı değerleri ile bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler ile korelasyonu. 70
Tablo11. Araştırılan parametrelerin serum ve folikuler sıvı değerlerinin birbiriyle korelasyonu. 72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. OPU işleminin şematik gösterilişi. 41
Şekil 2. İki polar cismi de içeren fertilize oosit. 42

1. GİRİŞ

İnfertilite korunmasız, uygun sıklıkta, düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınamamasıdır. Reproduktif dönemdeki kadınların %10-15'ini etkileyen bir durumdur. Günümüzde infertilite sıklığı giderek artmakta dolayısıyla infertilite nedeni ile in vitro fertilizasyon (İVF) yöntemlerine başvuran hasta sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle İVF yöntemlerinde tedavi başarısını arttırmaya yönelik çalışmalar hız kazanmaktadır.

İVF tedavisinde fertilizasyon, implantasyon ve klinik gebelik başarısını arttıran pek çok parametre tanımlanmıştır. Oosit, gelişimi esnasında granuloza hücreleri ve folikuler sıvı (FS) ile çevrilidir. FS'deki pek çok maddenin düzeyinin oosit gelişimini ve fertilizasyonu etkilediği bulunmuştur. FS'nin bu süreçlerdeki rollerinden yola çıkarak İVF başarısını artırmak için folikul sıvısı İVF çalışmalarında ilgi odağı olmuştur. FS'deki vitamin ve kalsiyum düzeyleri ve oksidatif stres parametreleri hem oosit kalitesine hem fertilizasyon başarısına etki ederek İVF tedavisinde başarı şansını tahminde yardımcı olarak kullanılabilecek parametrelerdir.

Vücudumuzda gelişen birçok biyokimyasal olayda rol üstlenen vitamin ve mineraller, fertilitede de oldukça önemli bir yere sahiptir. Fertilitenin sağlanması için folikulogenez, ovulasyon, korpus luteumun devamı gibi basamaklarda ve sonrasında embriyo gelişimi, implantasyon, gebeliğin devamı ve fetal ve neonatal kayıplara yol açabilecek bazı anomalilerin önüne geçilebilmesi için vitamin ve mineral düzeylerinin yeterli olması gerekmektedir. Vücutta bulunan vitamin ve mineral düzeyleri kan ve folikul sıvılarına yansımakta olup fertilitenin araştırıldığı birçok çalışmada serum ve folikul sıvısı bu amaçla kullanılabilmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız;

1. İnfertilite nedeniyle İVF tedavisine giden hastalardan elde edilen serum ve folikul sıvısında vitamin B12, vitamin D, demir, kalsiyum (Ca^{+2}), folik asit, ferritin, homosistein, total antioksidan status (TAS) ve total oksidan status (TOS) düzeylerini ölçmek,

2. İnfertiliteye sebep olan faktör ile araştırdığımız parametrelerin ilişkisini ortaya koymak,

3. Araştırılan parametreler ile fertilizasyon, implantasyon, klinik gebelik, ‘eve bebek götürme oranı’ gibi İVF başarısı arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak,

İnfertil hastaların serum ve folikul sıvısındaki vitamin ve mineral düzeylerinin infertilite etyolojisi ve İVF başarısına etkisi tespit edilmesi durumunda bu parametrelerin infertilite etyolojisindeki yeri, İVF tedavisinde başarı şansını önceden belirlemede prediktif belirteç olarak kullanılabilirliği ve infertilite tedavisinde vitamin ve mineral destek tedavisine öncülük etme potansiyeli tartışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

2.1.1. İnfertilite Tanımı

İnfertilite korunmasız, düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınamamasıdır. Birinci yılın sonunda sağlıklı çiftlerin %85-90'ında gebelik gerçekleşir. Yani infertilite reproduktif çağdaki kadınların %10-15'ini etkileyen bir problemdir. Otuzlu yaşların sonlarındaki kadınlarda infertilite görülme oranı %25'e ulaşırken, kırk yaşından sonra fertilitede daha hızlı bir düşüş olur (1). Eğer canlı veya cansız hiç gebelik elde edilememiş ise primer infertilite, sonucu her ne olursa olsun gebelik bir kere oluşmuşsa sekonder infertilite durumundan bahsedilir. Fekondabilite ise bir kadının tek bir menstrual siklusta gebe kalabilme olasılığıdır. Büyük data bazlı çalışmalar göstermiştir ki bir kadının fekondabilite oranı %25'tir. Genel olarak infertilitenin 1/3 nedeni kadın kaynaklı, 1/3 nedeni erkek kaynaklı, 1/3 nedeni ise her iki çift kaynaklıdır.

Tablo 1. İnfertilite etyolojisi dağılımı (2, 3).

İnfertilite etyolojisi	**Oran (%)**
Erkek Faktörü	25
Ovulatuar Faktör	27
Tubal/Uterin Faktör	22
Açıklanamayan	17
Diğerleri	9

2.1.2. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

İnfertilite durumu yaşayan çiftlerin hekime ilk başvurularında mutlaka her ikisinin de bulunması sağlanmalıdır. Bu tezde kadın infertilitesi öncelikli olarak ele alınmıştır. Kadının anamnezinde jinekolojik, tıbbi, cerrahi öykü, kullanılan ilaçlar, sosyal öykü ve etnisiteye yer verilmelidir. Ayrıntılı fizik muayene yapılarak gerekli tetkiklerle infertilite etyolojisi anlaşılmaya çalışılmalıdır.

2.1.2.1. Anamnez

Kadın yaşı fertilite potansiyelini etkileyen önemli bir husustur. Kadında ilerleyen yaşla beraber over rezervi, overin gonadotropinlere verdiği cevap ve tedavi başarısı olumsuz etkilenir ve anöploidi oranı artar. Ayrıca ileri yaşlarda gebelik kayıplarının da arttığı bulunmuştur (4).

Jinekolojik öyküde menstruasyon düzeni, önceki kontraseptif kullanımı, infertilite süresi, öncesinde uygulanan tedavi ve yaklaşımlar, tekrarlayan over kisti öyküsü, endometriozis, leiomyomlar, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve pelvik inflamatuar hastalıkla ilgili sorular sorulmalıdır. Varsa önceki gebeliği, gebelik yaşı, gebelik kaybı, abortus öyküsü, erken doğum, postpartum dilatasyon küretaj, koryoamniyonit, fetal anomali olup olmadığı, anormal PAP-smear, servikal konizasyon öyküsü sorgulanmalıdır. Koitus sıklığı ve zamanlaması hakkında detaylı anamnez alınmalıdır.

Tıbbi öyküde hiperprolaktinemi, hipertiroidi, hipotirodi, hiperandrojenemi varlığı (hirsutizm, akantozis nigrikans, alopesi), polikistik over sendromu (PKOS), konjenital adrenal hiperplazi, özellikle reproduktif potansiyeli etkileyen herhangi bir hastalık olup olmadığı sorgulanmalıdır. Over rezervini ve fertiliteyi önemli ölçüde etkileyen kemoterapi, radyoterapi öyküsü araştırılmalıdır.

Cerrahi öyküsünde pelvik ve abdominal operasyonlar, geçirilmiş uterin cerrahiler sorulmalı; rüptüre apandisit pelvik adezyonlara neden olabileceği için bu konuda hastadan bilgi alınmalıdır.

Alışkanlıklar ve ilaç kullanım öyküsünde hastanın özellikle ovulasyonu kötü yönde etkileyebilecek nonsteroid antiinflamatuar ilaç ve bitkisel ilaç kullanımı olup olmadığı öğrenilmelidir. Hastanın yaşam şekli, mesleği, çevresel faktörler, sigara ve alkol kullanma alışkanlığı, kafein, esrar, vb. kullanımı sorgulanmalıdır. Vücut kitle indeksine (VKİ) bakılmalıdır.

Aile öyküsünde infertilite öyküsü, erken menapoz, doğumsal anomaliler, mental retardasyon, tekrarlayan abort, fetal anomali olması genetik bir temel olabileceğini düşündürür. Bu bakımdan aile öyküsü de mutlaka alınmalıdır.

2.1.2.2. Fizik Muayene

İnfertilite nedeni ile başvuran tüm hastalarda kilo, boy, tansiyon arterial ölçümü yapılmalı, hirsutizm, alopesi, akne, akantozis nigrikans varlığına bakılmalı, tiroid ve meme muayenesi mutlaka yapılmalıdır.

Jinekolojik muayenede vagenin nemliliği, serviksin durumu, uterusun şekli ve mobilitesi değerlendirilmelidir. Pelvik veya abdominal hassasiyet varlığına bakılmalıdır. Tüm hastalardan mutlaka servikal smear, neisseria gonore ve klamidya için kültür alınmalıdır.

2.1.2.3. Ultrasonografi

Tüm hastalar mümkünse transvaginal ultrasonografi (TV-USG) ile değerlendirilmelidir. Ultrasonografi uterus boyutu, uterusun kontur ve pozisyonu, myometriumun homojenitesi, myoma uteri varlığı ve bunların uterustaki yerleşimi, endometriumun kalınlığı, yapısı, siklus fazı ile uyumu, intrakaviter patoloji varlığı, overlerin ekojenitesi, stromal yapısı ve volumu, antral folikul sayısı, siklus dönemine göre dominant folikul veya korpus luteum varlığı, over içi ya da paraoveryan solid-kistik kitle varlığı hakkında bilgi verir.

2.1.2.4. Laboratuar

Hormonal testlerden siklusun 3. günü bakılan folikul stimulan hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), estradiol (E2), eğer hirsutizm varsa serbest testosteron, 17 hidroksi progesteron, dehidroepiandrostenodion sülfat, androstenedion, ve random bir günde prolaktin, antimüllerian hormon (AMH), troid stimulan hormon (TSH)

Serolojik testlerden hepatit B antijeni (HBsAg), hepatit B yüzey antikoru (Anti-HBs), hepatit C antikoru (Anti-HCV), insan immun yetmelik virusu antikoru (Anti-HIV), Rubella immunoglobulin G (IgG) ve/veya IgM, Toksoplasma IgG ve/veya IgM,

Hematolojik testlerden kan grubu ve tam kan sayımı ölçümleri tüm infertil hastlardan istenmelidir.

2.1.2.5. Histerosalpingografi (HSG)

HSG, tubal patens hakkında bilgi vermesinin yanında, konjenital uterin anomaliler, intrakaviter patolojiler (myom, polip, adezyon) açısından da yol gösterici olabilir.

2.1.2.6. Laparoskopi ve Histeroskopi

Hem diagnostik hem operatif amaçlı laparoskopi ve/veya histeroskopi yapılabilir. Pahalı ve invaziv yöntemlerdir. ***Histeroskopi*** uterin kavite hakkında, ***laparoskopi*** batın içi ve tubalar hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Endometriozis şüphesi varsa (dismenore, pelvik ağrı, derin disparoni), pelvik adezyon ve tubal hastalık için riskli olgularda (pelvik ağrı hikayesi, komplike apandisit, pelvik enfeksiyon, pelvik cerrahi, geçirilmiş ektopik gebelik), anormal fizik muayene ve HSG varlığında laparoskopi ve/veya histeroskopi düşünülür.

2.1.3. İnfertiliteye Yol Açan Spesifik Faktörlerin Değerlendirilmesi

2.1.3.1. Ovulatuar Bozukluklar

Ovulatuar bozukluklar hipotalamik, hipofizer ya da overyan patolojilere bağlı olabilir. Hipotalamik bozukluklar edinsel ya da kalıtsal olabilir. Edinsel olanlara örnek olarak aşırı egzersiz, yeme bozuklukları ve stres sayılabilir. Kalıtsal olanlar ise Kallman Sendromu ve idiopatik hipotalamik hipogonadizm olabilir. Ovulatuar bozuklukların tanısında değişik metodlar kullanılabilir. Metodların birbirlerine üstünlükleri fazla değildir. Bazı metodlar daha basit, noninvazif ve ucuz, bazı metodlar ise daha karmaşık ve pahalı yöntemlerdir. Bu metodlar şunlardır:

a. Bazal Vücut Isısı

Bazal vücut sıcaklığı folikuler fazda düşüktür, ovulasyondan sonra luteal fazda progesteronun (PG) termogenik etkisiyle 0.4-0.8°C artar ve menstruasyondan hemen önce tekrar bazal seviyelerine düşer. Bu bifazik patern ovulasyon için prediktiftir (5). PG >5 ng/ml olduğunda veya ovulasyondan yaklaşık 4 gün sonra ısı artışı belirgindir (6). Bazal vücut ısısına bakarak ovulasyon tayini yapmak ucuz bir yöntemdir. Ancak

bazı kadınlarda, düzenli ovulasyon olmasına rağmen bifazik patern gözlenmediği de unutulmamalıdır.

b. Menstrual Öykü

21-35 gün arası siklus süresi olan, menstruasyon periyodu 3-10 gün arası süren, ovulasyon kanaması izlenen, premenstrual semptomların (memede hassasiyet, duygudurum değişikliği, dismenore) izlendiği sikluslar genelde ovulatuar sikluslardır.

c. Ovulasyon Kitleri

İdrarda kolorimetrik yöntemle LH ölçümüne dayanır. Ölçüme, tahmin edilen LH pikinden yaklaşık 2-3 gün önce başlanmalıdır ve günlük devam edilmelidir. LH pikinden sonra 48 saat içinde ovulasyon gerçekleşir (7).

d. Midluteal Serum Progesteron Düzeyi

Luteal faz ortasında serum PG düzeyi ölçümüne dayanır. Yirmisekiz gün süren bir siklusta 21. gün bakılan serum PG değerinin >10 ng/ml olması ovulasyonu destekler (7, 8).

e. Endometrial Biyopsi

Ovulasyon gerçekleşmesi sonucu korpus luteumdan (CL) salınan PG etkisi ile endometriumda sekretuar özellikler meydana gelir. Bu nedenle geç luteal dönemde, genellikle beklenilen menstruasyondan 2-3 gün önce alınan endometrial örnekte sekretuar endometriumun olması ovulasyon olduğunu, proliferatif endometrium olması ise anovulasyonu gösterir. Siklus gününe göre 2 gün veya daha fazla gecikme luteal faz defektini düşündürür. İnvaziv bir işlemdir, bu yüzden kronik anovulasyonlu kadınlarda hiperplazinin ekarte edilmesi amacı ile veya kronik endometrit şüphesi varsa kullanılması önerilen bir yöntemdir (9).

f. Ultrasonografi

Seri TV-USG ile dominant folikulun rüptüre olduğunun saptanmasına dayanır. Zaman alıcı olup ovulasyon atlanabilir.

2.1.3.2. Overyan Folikul Rezervi

35 yaş üzeri kadınlar, sigara kullanımı, geçirilmiş over cerrahisi, tek overe sahip olmak, açıklanamayan infertilite, daha önceki infertilite tedavilerinde başarısızlık, ailede erken menopoz öyküsü, endometriozis, kemoterapi ve/veya radyoterapi öyküsü gibi durumlarda over rezervinin bakılması faydalıdır. Over rezerv testleri şunlardır:

a. Yaş

Kadın yaşı ve fertilite arasında ters orantı vardır. İVF başarısı kadın yaşı arttıkça azalmaktadır. İleri yaşta olan kadınlarda oosit, embriyo sayısı ve implantasyon şansı düşüktür (10). Chuang ve ark. yapmış olduğu bir araştırmada 1045 İVF siklusunda 35 yaş altında, yaşın FSH değerinden daha anlamlı derecede İVF başarısını gösterdiğini saptamışlardır (11).

b. Bazal Estradiol

Siklusun 3.gününde FSH ile beraber bakılan E2 over rezervinin tahmin edilmesinde kullanılabilir. Over rezervi düşük kadınlarda bazal E2 düzeyi artmıştır (>80 pg/mL). Evers ve ark. folikuler evrenin başlangıcında bakılan E2 seviyesi 60 pg/ml üzerinde olanlarda yüksek siklus iptali ve toplanan oosit sayısında azalma saptamıştır (12). Frattarelli ve ark. ise bazal E2 20 pg/ml altında ve 80 pg/ml üzerinde olan kadınlarda daha yüksek siklus iptali olduğunu saptamışlardır (13).

c. Bazal Serum FSH

Siklusun 3. gününde bakılan serum FSH düzeyi değişkenlik gösterebildiği için fekundabiliteyi belirlemede sensitivitesi oldukça düşüktür. Aschrafti ve ark. 212 İVF siklusunda erken folikuler evrede bakılan FSH düzeyleri 15 IU/ml üzerinde olan kadınlarda, daha az oosit toplandığını ve siklus iptalinin daha fazla olduğunu saptamıştır (14).

d. İnhibin B

İnhibin B, overde granuloza ve teka hücrelerinden salgılanan, primer olarak görevi FSH salgılanmasını inhibe etmek olan hormondur. Overyan rezervi düşük kadınlarda inhibin B düzeyi de düşüktür. Seifer ve ark. serum inhibin B seviyelerinin

45 pg/ml olanlarda daha yüksek E2 cevabı olduğunu ve daha fazla oosit toplandığını göstermişlerdir (15).

e. Klomifen sitrat (CC) stimulasyon testi

Over rezervinin belirlemede kullanılan dinamik bir testtir. Menstrual siklusun 3. gününde FSH düzeyleri ölçülür. Siklusun 5. ile 9. günleri arasında 5 gün 100 mg/gün oral CC kullanılmasını takiben 10. günde FSH düzeyi tekrar ölçülür. CC'nin pituiter reseptörlerde estrojeni antagonize ederek FSH düzeylerini arttırması sonrası oluşan folikullerden salgılanan E2'nin FSH'yı baskılamasına dayanmaktadır (16). Bazal ve stimule (3. ve 10. gün) FSH düzeylerinin toplamının 26 IU/ml üzerinde olması düşük overyan rezerv göstergesi olarak yorumlanmıştır (17).

f. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonisti stimulasyon testi

GnRH agonisti uygulanması sonrasındaki ilk 24 saatte flare-up etkiyle E2 ve inhibin B seviyelerinde artış olmasını esas alan dinamik over rezerv testidir. Yüksek maliyetli olması ve gebelik planlanmadan analogların kullanılması nedeniyle kullanımı kısıtlanmıştır (18).

g. Eksojen FSH overyan rezerv testi (EFORT)

Menstrual siklusun 3. gününde 300 IU rekombinan FSH'nın subkutan olarak uygulanmasını takiben 24 saat sonra E2 ve inhibin B seviyesinin ölçülmesine dayanır.

h. Antral Folikul Sayısı (AFS)

Menstrual siklusun başında TV-USG ile overlerdeki 2-10 mm çapındaki folikullerin sayılmasıyla uygulanan bir testtir. Chang ve ark. tarafından İVF sikluslarında yapılan bir çalışmada AFS'e göre hastaları üç gruba ayırmıştır (AFS<4, AFS=4-10, AFS>10) ve bu 3 grupta sırasıyla siklus iptal oranlarını %68.8, %5.3, %0 olarak bulunmuştur (19). AFS'e göre yapılan over derecelendirmesi, İVF'de tedavi şeması ve ilaç dozlarını belirlemede yardımcıdır (20, 21). Buna göre;

-Grade I overler (AFS<4) kontrollu overyan stimulasyona (KOS) yanıtı genellikle başarısızdır.

-Grade II overlerin (AFS=4-6) KOS yanıtı yetersizdir.

-Grade III overler (AFS=7-10) KOS'a iyi cevap verirler.

-Grade IV overler polikistik over ya da polikistik over benzeri olup, bunlarda folikuler atrezi ya da ovaryen hiperstimulasyon sendromu (OHSS) riski yüksektir.

i. Over hacmi

Stimule olmamış overlerin TV-USG ile hacminin hesaplanmasına dayanmaktadır. Over hacmi <3 cm^3 olması olumsuz prognostik faktördür.

j. Over kan akımı

TV-USG yardımıyla over stroması ve perifolikuler over dokusunun kan akımının doppler ile ölçülmesiyle hesaplanmaktadır. Shrestha ve ark. 34 infertil kadında yaptıkları çalışmada yüksek perifolikuler kan akımı bulunanlarda gebe kalma oranlarını anlamlı olarak yüksek tespit etmişlerdir (22). Kim ve ark. KOS yapılan 99 hastada overin stromal arterindeki kan akımlarının doppler incelemesinde düşük pulsatilite indeksinin yüksek gebelik oranını predikte ettiğini göstermişlerdir (23).

k. Over biyopsisi

Birim hacimdeki over folikul sayısının histolojik olarak hesaplanması esası ile ölçülür. Primordial folikullerin over dokusu içerisinde farklı yoğunluklarda olması ve invazif bir yöntem olması nedeniyle over biyopsisi önerilmemektedir.

l. Antimüllerian hormon

Başlıca primordial ve preantral folikullerden sentezlenen AMH (24) klinik olarak inaktif overyan primordial folikul havuzunu gösterdiği için over rezerv testleri içinde önemli bir yere sahiptir. Diğer over rezerv testlerine göre avantajı siklusun herhangi bir gününde bakılabilir. Zebitay ve ark. yaptıkları çalışmada serum AMH düzeyinin FSH, kadın yaşı ve AFS'ye kıyasla toplanan oosit sayısı için en iyi belirteç olduğunu göstermişlerdir (25).

2.1.3.3. Tubaperitoneal Bozukluk

Pelvik inflamatuar hastalık (PIH), ektopik gebelik, endometriozis ve tubal cerrahi tuboperitoneal ve pelvik adezyon için risk faktörleri olarak sayılmaktadır. Bir kez akut PIH geçirenlerde %10-12, iki epizod sonrası %23-25 ve üç epizod sonrası %54–75 oranında tubal infertilite oluşmaktadır. PIH'ın en sık nedeni Neisseria gonore

ve Clamidya trachomatistir. Tubal rekonstruksiyon cerrahisi, geçirilmiş tubal sterilizasyon sonrasında gebelik isteyen kadınlarda, hafif distal tubal hastalığı olanlarda (özellikle genç hastalarda) ve proksimal tubal tıkanıklığı olan bazı kadınlarda tedavi seçeneği olabilmesine rağmen tubal cerrahiden sonra ektopik gebelik riskinin artacağı unutulmamalıdır. Tubal patolojilerde infertilite tedavisinde İVF en iyi seçenektir. Tubal patolojisi olan hastalarda, özellikle hidrosalpenks varlığında, laparoskopik salpenjektomi ve proksimal tubal okluzyonun İVF başarı oranlarını arttırdığı bilinmektedir. Tubal patoloji tanısında HSG, sonohisterografi ve laparoskopi kullanılmaktadır.

2.1.3.4. Uterin Faktörler

Konjenital uterin anomaliler, myom, intrauterin adezyon, endometrial polip ve kronik endometrit uterusa ait fertiliteyi olumsuz etkileyebilecek patolojilerdir. Konjenital uterin anomaliler içinde en sık görülen ve infertilite ile en fazla ilişkisi olan uterin septumdur. İnfertiliteyi en fazla etkileyen myom, kornual myom olmakla beraber submukozal myomlar implantasyonu bozduğu için infertiliteye sebep olmaktadır. Uterin patolojilerin değerlendirilmesinde HSG, TV-USG, sonohisterografi ve histeroskopi, manyetik rezonans ve laparoskopi kullanılmaktadır.

2.1.3.5. Servikal Bozukluk

Normal servikal mukus, spermin geçişini kolaylaştıran özelliklere sahiptir. E2, servikal mukus üretimini ve akışkanlığını artırırken, PG tam ters bir etki gösterir. Servikal mukus yeterliliğini ve sperm-mukus etkileşimini değerlendirmek için postkoital test (Sims Hühner Testi) kullanılmaktadır. Postkoital testte servikal mukus, ovulasyondan hemen önce veya ilişkiden sonra 2-12 saat içinde değerlendirilir. Servikal mukusun fiziksel özellikleri, vizkositesi, Ferning testi ve motil sperm aranması esasına dayanır. Başarılı bir mukus üretimi durumunda ise postkoital testin erkek infertilitesini ayırt etmek için kullanılması tartışmalıdır (26). Bu sebeplerden dolayı servikal faktör tanısı için postkoital test artık önerilmemektedir (27).

2.1.3.6. Erkek Faktörü

Yaşam tarzı ve sağlık problemleri bir erkeğin fertilite potansiyelini değiştirilebilir. Varikosel, aşırı alkol tüketimi, ilaçlar, sigara, yaş, pestisitler ve kurşun dahil olmak üzere çevresel toksinler, kabakulak, böbrek hastalığı, diyabet, kistik fibroz, travma, hormonal sorunlar, anabolik steroid kullanımı, radyoterapi ve kemoterapi sperm kalitesi ve sayısını azaltabilecek etkenlerden bazılarıdır. Erkek faktörün araştırılmasında ana test semen analizidir.

Semen Analizi

Üç-beş gün (ortalama 4 gün) günlük koitus yasağından sonra erkekten masturbasyon yöntemi ile ejakulat alınır. Alınan ejakulatın volumune, viskositesine, spermlerin sayısına ve morfolojisine bakılır. İlk sperm örneği normal sınırlarda ise test tekrarlanmaz; aksi takdirde 6-12 hafta sonra ikinci bir örnek alınmalıdır (28).

Tablo 2. Semen analizi (29).

Ejakulat volumu	≥1,5 ml (1,4- 1,7)
Sperm konsantrasyonu	≥15 milyon/ml (12-16)
Motilite	Progresif motil sperm oranı (A+B) ≥%32 (31-34) Total motilite ≥%40 (38-42)
Morfoloji	>%4 (3-4) (Kruger's)
Lökosit sayısı	<1 milyon/mL
Ph	>7,2

2.1.4. İnfertilite Tedavisinde İn Vitro Fertilizasyon Yöntemleri

KOS ile büyütülen folikuller belirli boyuta geldikten sonra insan koryonik gonadotropin (hCG) verilmesiyle maturasyonları tamamlanır. hCG verilmesinden 36 saat sonra gerçekleştirilen oosit pick-up (OPU) işlemi ile alınan oositler, laboratuar ortamında belli işlemlere tabi tutularak tek tek ya da zigot veya embriyo halinde kadına verilir. Gebelik sonuçlarını artırmak için oosit, sperm ve embriyonun manipule edilebileceği birçok teknik tanımlanmıştır. Bunlar gamet intra fallopian transfer (GİFT), zigot intrafallopian transfer (ZİFT), in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi (İVF-ET) ve intrastoplazmik sperm injeksiyonu (İCSİ) ve ET (İCSİ-ET)

prosedurlerini içermektedir. Bunlardan günümüzde en çok kullanılanı ilk kez 1992'de bildirilen ve son yıllarda popularite kazanan İCSİ-ET prosedürüdür.

GİFT yöntemi fallop tüpüne oosit ve sperm aktarılmasını içerir. Fertilizasyon vücutta gerçekleşir. Daha az tercih edilen bir yöntemdir.

ZİFT yönteminde fertilizasyon laboratuarda gerçekleşir, oluşan zigot laparoskopik olarak fallop tüpüne yerleştirilir.

İVF yönteminde masturbasyon yöntemi ile alınan semen, swim up ya da gradient santrifuj yöntemleri ile işleme tabii tutulur ve spermler proteinle desteklenmiş ortamda kapasitasyonu gerçekleştirmesi için 4 saate kadar inkübe edilir. Ovum başına en az 100 bin kapasite olmş sperm olacak şekilde oosit ve spermler bir petri kabına yerleştirilip inkube edilir ve 18 saat sonra oositler fertilizasyon açısından incelenir ve spermin oositi döllemesi beklenir (30).

İCSİ yöntemi ise erkek faktör infertilitesi olan çiftler için kullanılmaya başlayan daha sonra pek çok merkezde tercih edilen bir yöntemdir. İCSİ'de tek sperm, metafaz (MII) olgun bir oosit içine enjekte edilir.

2.1.4.1. Kontrollu Overyan Stimulasyon

İVF yöntemlerinde öncelikle KOS yapılarak overyan folikul gelişimi sağlanır. Elde edilen folikuller yaklaşık 18-20 mm çapa ulaştıklarında OPU işlemi ile oositler toplanır ve hangi İVF yöntemi yapılacaksa işleme o şekilde devam edilir. Uterusa birden fazla embriyo verilerek gebelik hızının arttığının anlaşılmasıyla iyi kalitede oositlerin seçilebilmesine imkan verecek ve mümkün olduğunca çok folikulun elde edilebileceği KOS rejimleri önem kazanmıştır. Agonist ya da antagonist protokol uygulanarak overyan folikuller rekombinan ve/veya üriner gonadotropinler kullanılarak belirli boyuta getirilirler. Gonadotropin başlangıç dozunun belirlenmesinde dikkate alınması gereken ve over cevabını belirleyen başlıca faktörler; kadın yaşı, over rezervi, VKİ, sigara ve önceki ovulasyon induksiyonu ya da KOS'a verilen cevaptır. Her ne kadar hem FSH hem de LH normal folikuler estrojen sentezi için gerekse de süperovulatuar sikluslarda FSH tek başına kullanılsa bile estrojen üretimini sağlayabilmektedir. Rekombinan FSH kullanılarak overyan folikul boyutları 18-20 mm oluncaya kadar TV-USG ile hastalar monitörize edilir. İstenilen boyutta

folikul elde edildiğinde ise ovulasyon medikal olarak tetiklenir (ovulasyonun tetiklenmesi).

KOS yönetiminde hipofizer bezi suprese etmek için GnRH agonisti veya antagonisti kullanılır. Antagonist protokolun kısa olması nedeni ile hasta uyumunun yüksek olması, kullanılan eksojen gonadotropin miktarının, OHSS sıklığının ve toplam maliyetin az olması ve İVF başarısında agonist protokol ile karşılaştırıldığında benzer klinik sonuçların görülmesi günümüzde hipofizer bezi baskılamada GnRH antagonistlerinin daha sık kullanılmasına neden olmuştur. GnRH antagonistleri, pituiter GnRH reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanırlar ancak Ca^{+2} aracılı gonadotropin salınımını yapamazlar. Sonuçta ilk flare-up etkisi olmadan güçlü kısa süreli supresyon yaparlar ve böylece desensitizasyon süresi gerektirmezler. Etkileri agonistlerden daha fazla olarak doza bağlıdır. Şu ana kadar 3 jenerasyon antagonist kullanılmıştır. Üçüncü jenerasyon antagonistlerden üzerinde en çok çalışılanları cetrorelix ve ganirelixtir. GnRH antagonistleri ile ilgili iki tedavi rejimi mevcuttur:

a. Multiple doz GnRH antagonisti kullanımı en sık kullanılan rejimdir. Siklusun 5 ya da 6. gününden başlayarak hCG gününe kadar düşük dozda günlük GnRH antagonisti enjeksiyonları yapılır (31).

b. Tek doz GnRH antagonisti kulanımı: Antagonist 8.günde ya da over cevabı hızlı ise daha önce kullanılır.

2.1.4.2. Tedavide Monitorizasyon

Monitorizasyondaki amaç folikuler maturasyonu kontrol etmek, hCG verilme zamanını tespit etmek ve siklusun geleceğini tahmin edebilmektir. Yüksek over cevaplılarda siklusu iptal ederek OHSS'yi engellemek, düşük cevaplıları tespit ederek tedavide ayarlama yapmak için monitorizasyon gereklidir. KOS takibinde serum E2, LH ölçümü ve TV-USG kullanılır. Klinik pratikte en sık kullanılan TV-USG ile folikul boyutunun takibidir. Serum E2 seviyesi her zaman folikul büyümesi ile korele değildir. Ayrıca değişken protokollerden dolayı optimal estrojen paterni tanımlanmamıştır. Yine de hangi protokol kullanılırsa kullanılsın E2 seviyesinde 3 günden fazla süre devam eden plato siklustaki zayıf sonuçla ilişkilidir. Folikul boyutları 13-14 mm çapa ulaştığında veya E2 düzeyi 250 pg/ml seviyesine yükseldiğinde LH pikinin takip

edilmesi gerekir. Bu ölçüm oosit toplanma saatinin ve prematur luteinizasyonun saptanması için bilgi sağlamaktadır. Folikuler büyümeyi TV-USG ölçümü ile değerlendirerek folikuler maturasyon ve hCG zamanlaması hakkında bilgi edinilebilir. USG'de en az 3 adet 16 mm folikul gözlendiğinde hCG enjeksiyonu önerilir. USG ile endometrial kalınlık ölçümü de en az 6 mm olmalıdır. Endometrial kalınlık <6 mm olduğunda gebelik oluşmadığı izlenmiştir.

2.1.4.3. Ovulasyonun Tetiklenmesi

Overyan folikuller 18-20 mm çapa ulaştıklarında hCG kullanılarak ovulasyon tetiklenir. Piyasada iki çeşit hCG preparatı vardır. İlk preparat olan Pregnyl (Organon) idrardan elde edilmiştir dolayısıyla idrardan elde edilen preperatların ortak dezavantajlarını taşır. Teknolojik gelişmelerle brlikte saf yapıda rekombinan teknolojiyle hCG (r-hCG) [Ovitrelle (Serono)] üretilmiştir. r–hCG'nin 250 µg'ı, 5000 IU üriner hCG'ye eşdeğerdir. Çalışmalarda toplanan oosit sayısı ve matur oosit sayısı konusunda çelişkili sonuçlar olmakla beraber ortak nokta hCG sonrası serum PG konsantrasyonun r-hCG ile daha yüksek olduğu yönündedir. hCG ile ovulasyonun tetiklenmesinden yaklaşık 36 saat sonra folikuller TV-USG eşliğinde OPU işlemi ile toplanır.

2.1.4.4. İCSİ-ET Yöntemi

Sperm sayısı düşük, motilitesi az ve morfolojisi bozuk olduğunda konvansiyonel İVF başarısız olur (32). Bu durumda bir ovumun fertilizasyonu için sadece fonksiyonel bir genomu ve sentrozomu olan bir spermatozoa yeterli olduğu İCSİ işlemi kullanılır. Böylece kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona pellusida (ZP) ve oolemmanın tanınması ve geçilmesi safhaları atlanmış olur. İCSİ ile immotil ve vital olmayan spermatozoa ile fertilizasyon oranları düşüktür. Bunun dışında konsantrasyon, morfoloji (globozoospermi dışında) ve yüksek antisperm antikor konsantrasyonları İCSİ başarısını etkilemez. İCSİ için öncelikle oositler ön inkübasyon için 37^{o}C ve %5 karbondioksitli (CO_2) ortamda 1 ile 9 saat arasında bekletilir. İCSİ işlemi uygulanacak petriler hazırlanır. Bu petrilerin içinde, içine oosit konulan her biri 5 µl'lik HEPES tamponlu damlalar hazırlanır, damlaların yanına

polivinilpirolidin (PVP) içeren diğer bir damla daha konur. PVP damlacığı spermler içindir. Damlaların üzeri CO_2 ile dengelenmiş mineral ve yağ ile örtülür. Hazırlanan petri kapları inkübatöre konulur. Ön inkübasyona alınan oositler enzimatik (hyaluronidaz) ve mekanik yollarla denudasyon işlemine tabi tutulur. Denudasyon işlemi ile oositler kumulus ve korona hücrelerinden arındırılırlar. Bu işlemin yapılmasında iki amaç vardır: Birincisi oositin etrafındaki hücrelerin işlem sırasında İCSİ pipetini tıkamasına engel olmak, ikincisi ise oosit maturasyonunun tam olarak tespit edilmesini sağlamaktır. Çünkü oosit etrafında bulunan kumulus hücreleri görüntünün net olarak izlenmesini engeller. Çıplak bırakılmış oositlerin ZP, germinal vezikul ve ilk polar cisimcikleri, perivitellin aralıkları incelenerek oosit kaliteleri değerlendirilir. İCSİ işleminde haploid kromozoma sahip, 1. polar cisimciği gözlenebilen MII oositler kullanılır. PVP içine zenginleştirme işlemi yapılan spermler konur. HEPES tamponlu damlalara da tek tek denudasyon işlemi yapılmış olan oositler konur. OPU işleminden yaklaşık 4-6 saat sonra İCSİ pipeti ile sperm kuyruğuna hafif bir bası oluşturularak immobilizasyon sağlanır. Sperm immobilize edilip pipet içine alındıktan sonra içinde oosit bulunan damlaya gidilir ve polar cisme mümkün olduğu kadar uzak bir noktadan oolemma delinerek ooplazmanın ortasına sperm yavaş bir ekspirasyon ile verilir. Fertilize olmuş oositin ilk değerlendirilmesi İCSİ işleminden 16-18 saat sonra yapılmalıdır. Yapılacak ilk inceleme pronukleuslar ve polar cisimciklerinin varlığı ve morfolojileri üzerine olur.

Transfer edilecek embriyonun kalitesinin değerlendirilmesinde bazı parametreler önem taşır. Blastomer sayısının gün ile uyumu, nukleer fragmantasyon, vakulolizasyon, ZP kalınlığı ve perivitellin aralık özellikleri bunlardan bazılarıdır. İkinci gün kontrollerinde 2 ila 4 blastomerli embriyolar oluşmuş olmalıdır. Üçüncü gün yapılacak kontrollerde blastomer sayısının en az 7 veya 8 olması beklenir. Gelişimi çok iyi olan embriyolarda üçüncü günün sonunda kompaktlaşmanın başladığı görülebilir. Bu tür embriyoların gelişim potansiyeli ve başarılı implantasyon oranı fazladır. Dördüncü gün blastomerler arası bağlantı kompleksleri oluşur. Beşinci gün blastomerlerin arasında sıvı birikerek blastokist oluşur. Blastomerlerdeki nukleer fragmantasyonun hiç olmaması veya <%20 olması, stoplazmik vakuolizasyonun olmaması, ZP kalınlığının normal aralıkta olması ve ZP renginin açık olması ve perivitellin aralıkta debri bulunmaması embryonun iyi kalitede olduğunun

göstergeleridir. Blastokistteki sıvı boşluğunun genişlemesi ile birlikte blastomerler iki farklı hücre grubunu oluştururlar. ZP'nin altını çevreleyen hücre grubuna trofoblast denir. Merkezi olarak yerleşen blastomer grubuna iç hücre kitlesi adı verilir. Fetus iç hücre kitlesinden meydana geleceğinden dolayı bu hücre kitlesine embriyoblast adı da verilmektedir. Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde blastosel yapısı, iç hücre kitlesi, trofoblast hücrelerinin yapısı da göz önünde bulundurulur. İç hücre kitlesinin değerlendirilmesinde hücrelerin sıkıca ve bir arada olması embriyo kalitesinin olumlu olduğunu gösterir. Trofoblastik doku çok sayıda hücre ve sıkı epitelyum içermelidir. Blastokist boşluğunun büyük olması da implantasyon oranlarını arttırır.

2.1.4.5. Luteal Faz Desteği

KOS sikluslarında GnRH analog veya antagonistlerinin kullanılması ile CL fonksiyonunun anormal olduğu görülmüş ve luteal faz desteğinin önemi açığa çıkmıştır. PG'nin olduğu kadar estrojenin de PG reseptörü yenilenmesinde gerekli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle CL'dan estrojen ve PG salınımına neden olması özelliğinden dolayı hCG kullanımı ileri sürülmüştür. Ancak yapılan klinik çalışmalara göre tek başına veya estrojenle kombine intramuskuler (im) PG ya da vajinal yolla verilen PG'a göre hCG'nin üstünlüğü olmadığı sonucuna varılmıştır. İntramuskuler PG ile vajinal PG karşılaştırıldığında klinik gebelik oranı ve doğum oranı açısından iki yöntemin de benzer olduğu, vaginal uygulamanın im uygulamaya göre daha kolay ve daha az invaziv olduğu ve apse oluşma riskinin daha az olduğu ve tüm tedavi formlarına göre oral progesteronun en etkisiz olduğu görülmüştür (33,34).

2.2. Folikuler Sıvı

Hem kan folikul bariyerini geçen kan plazma bileşenlerinin hem de granuloza ve teka hücrelerinin sekretuar aktivitesinin bir ürünü olan FS, oositlerin gelişimi için çok önemli bir mikroçevre oluşturur (35). Oositi çevreleyen FS'nin bazı biyokimyasal özelliklerinin, oosit kalitesi ve embriyo gelişimi üzerine etki ettiği ve FS'nin fertilizasyon başarısında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. FS'nin bileşenleri dolaşımdaki biyokimyasal çevreye de yansıyabileceğinden, FS

komponentlerinin incelenmesi kan serumundaki metabolik değişimler hakkında da bilgi sağlayabilir (36).

OPU sırasında oositlerle birlikte aspire edildiğinden FS'nin temini oldukça kolaydır. Son yıllarda FS içeriğinin incelenmesi, çeşitli folikullerden alınan sıvıda bir yada daha fazla substantın analizi veya bunların o spesifik folikulden gelen oositin akıbetiyle ilişkilendirilmesi önem kazanmıştır.

FS'nin biyokimyasal bileşenlerinden bazıları hormonlar, büyüme faktörleri, interlökinler, reaktif oksijen türleri (ROT), anti-apoptotik faktörler, proteinler, peptidler ve amino asitler, şekerler ve prostanoidlerdir.

2.3. Kalsiyum

Vücuttaki en fazla miktarda bulunan mineral kalsiyumdur. Gıdalarla, besin takviyesi olarak veya bazı ilaçlarla (antiasitler gibi) alınabilir. Kalsiyumun iki temel formu vardır: Kalsiyum karbonat ve kalsiyum sitrattır. Kalsiyum karbonat daha yaygın olarak mevcuttur ve hem ucuz hem de kullanışlıdır. Emilim için mide asidine bağımlı olması nedeniyle, kalsiyum karbonat gıda ile birlikte alındığında daha iyi emilirken, kalsiyum sitratın emilimi açlık veya tokluktan etkilenmez. Kalsiyum sitrat aklorhidri, inflamatuvar barsak hastalığı veya emilim bozuklukları olan kişiler için yararlıdır.

Kalsiyum, vaskuler kontraksiyon ve dilatasyon, kas fonksiyonu, sinir iletimi, hücre içi sinyalizasyon ve hormonal sekresyon için gereklidir ve bu kritik metabolik fonksiyonları desteklemek için toplam vücut kalsiyumunun % 1'den azına ihtiyaç duyulmaktadır (37). Serum kalsiyumu çok sıkı düzenlenir ve diyet alımlarındaki değişikliklerden etkilenmez. Kemik dokusu, kan, kas ve interseluler sıvılardaki kalsiyum konsantrasyonlarını sabit tutmak için kalsiyum kaynağı olarak kullanır (37). Vücuttaki kalsiyumun % 99'u kemiklerde ve dişlerde depolanır (37). Kemik dokuda, sürekli rezorpsiyon, kalsifikasyon ve remodeling olayları gerçekleşir.

2.3.1. Oosit Maturasyonunda Kalsiyumun Rolü

Primer oositler over korteksinde primordial folikuller içinde bulunurlar. Primer oosit mayoz bölünmenin profaz 1 evresinde olan oosittir. Gonadotropin uyarısı ile

primer oositler folikuller içinde gelişmeye başlarlar. Graff folikulu aşamasına gelindiğinde ovulasyondan önce mayoz bölünmenin devam etmesi Ca^{+2}' nin tetiklediği bir mekanizma ile gerçekleşir. Folikulerde granuloza hücrelerinde sentezlenen oosit maturasyon inhibitor (OMİ) oluklu bağlantılar aracılığı ile oosite geçer. OMİ molekül kitlesi küçük bir proteindir. Oositin spontan mayoz bölünmesine engel olur. Oosit stoplazmasındaki maturasyon başlatan faktör (MPF), profaz 1 evresinde düşük seviyededir. Oosit maturasyon süreci içinde artarak MII evresinde en yüksek düzeye ulaşan MPF, Cdc2-siklinB kompleksidir. MPF, mayotik bölünmenin profazını tamamlamak için germinal vezikülün (GV) yıkımını sağlar. Ovulasyondan hemen önce 1. mayoz bölünme de tamamlanır ve 1.mayoz bölünmesini tamamlamış olan sekonder oosit ovulasyonla beraber overden atılır ve fallop tüplerince tutulur.

2.3.2. Fertilizasyonda Kalsiyumun Rolü

Fertilizasyonda 4 olay meydana gelir: Akrozom reaksiyonu, ZP-3'e sperm bağlanması, sperm oosit füzyonu ve plazma membran füzyonu. Bu aşamalardan sperm oosit füzyonu sırasında ZP'i geçen ilk sperm, oositin plazma membranı ile birleşir. Oolemma altındaki kortikal granullerin Ca^{+2} bağımlı ekzositozunu uyarır. Ca^{+2} aracılığı ile bu granullerden salınan proteazlar sayesinde ZP-3'ten karbonhidratlar uzaklaşır ve başka bir spermin bağlanmasını önlemek için ZP-3, ZP-2'den kısmen ayrılır.

Ca^{+2}, sinyal iletiminde çok önemli rolleri olan bir iyondur. Ca^{+2}' un, oosit aktivasyonu, fertilizasyon, embriyo gelişiminin tamamlanması üzerinde önemli olduğu gösterilmiştir (38, 39, 40). Ca^{+2} iyonunun fertilizasyondaki önemi, oositlerin içerisinde sinyal yolaklarını uyarmak, hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımını sağlamak ve bunun neticesinde oosit hücresini aktive etmekten kaynaklanmaktadır (41, 42). Kalsiyum iyonofor kullanılarak yapılan bir çalışmada, kalsiyum iyonofor verilen grupta kontrol grubuna göre embriyo mitotik aktivitesi, implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranları daha fazla saptanmıştır (43). Tola ve ark.' ın çalışmasında, granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} düzeyleriyle oosit kalitesi ve fertilizasyon ile arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (44).

2.4. D Vitamini

D vitamini, doğal olarak çok az gıdada bulunan yağda çözünen bir vitamindir. Güneş ışığındaki ultraviyole ışınlar cilde temas ettiğinde vitamin D sentezi tetiklenerek endojen olarak da üretilir. Güneşe maruz kalarak, gıdalarla ve oral yoldan alınan D vitamini, biyolojik olarak inaktiftir ve aktivasyon için vücutta iki hidroksilasyon işlemi geçirmelidir. Birinci hidroksilasyon karaciğerde oluşarak D vitamini kalsidiol olarak da bilinen 25-hidroksivitamin D [25 (OH) D] 'ye dönüştürülür. İkinci hidroksilasyon primer olarak böbrekte oluşur ve kalsitriol olarak da bilinen fizyolojik olarak aktif form olan 1,25-dihidroksivitamin D [1,25 $(OH)_2$ D] 'ye dönüşür. Serum 25 (OH) D konsantrasyonu, D vitamini statusunun en iyi göstergesidir ve dolaşımda 15 günlük oldukça uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir.

Yağlı balıklar (somon, orkinos, uskumru, vb.) ve balık karaciğeri yağı en iyi D vitamini kaynakları arasındadır. Bu gıdalardaki D vitamini, esas olarak D_3 vitamini ve metaboliti 25-hidroksi D3 [25(OH)D_3] şeklindedir. Sadece doğal gıdalardan yeterli D vitamini elde etmek zordur. Vitamin D takviyeli gıdaları tüketmek ve güneş ışığına maruz kalmak D vitamini statutusunun korunması için gereklidir. Bazı gruplarda günlük vitamin D ihtiyacını karşılamak için diyet takviyeleri gerekebilir. Emzirilen bebekler, yaşlılar, sınırlı güneş maruziyeti olanlar, koyu tenliler, inflamatuar bağırsak hastalığı olan ve yağ malabsorbsiyonuna neden olan durumlar, obez veya gastrik bypass ameliyatı geçirmiş kişiler vitamin D yetersizliği riski olan gruplardır.

D vitamininin başlıca görevi kemiğin normal mineralizasyonunu sağlamak ve hipokalsemik tetaniyi önlemek için yeterli serum kalsiyum ve fosfat konsantrasyonlarını sağlamaktır. Vitamin D'nin vücuttaki diğer görevleri arasında, hücre büyümesinin modulasyonu, nöromuskuler ve immun fonksiyonların düzenlenmesi ve inflamasyonun azaltılması sayılabilir. Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozisi düzenleyen proteinleri kodlayan birçok gen kısmen D vitamini ile module edilir. Birçok hücre D vitamini reseptörüne sahiptir ve bazıları 25 (OH) D' yi 1,25 $(OH)_2$ D'ye dönüştürür.

2.4.1. Fertilizasyonda D Vitamininin Rolü

D vitamini streoid bir hormon olup biyolojik etkilerini D vitamini Reseptörü (VDR) aracılığıyla gerçekleştirir (45, 46). VDR steroid/tiroid nukleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve kalsiyum regulasyonu yapan dokular olan barsaklar, iskelet sistemi ve paratiroid bezlerinin yanısıra over, uterus, plasenta, testis ve hipofiz de dahil olmak üzere reproduktif dokularda gösterilmiştir. Vitamin D' nin etkili olduğu birçok önemli fizyolojik süreç arasında kadın üreme fizyolojisindeki kritik roller de belirtilmiştir. D vitaminin plasental Ca^{+2} transportunu, endometrial desidualizasyonu ve homeobox A10 (HOXA-10) denilen implantasyonda önemli olan genin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (47, 48, 49, 50). Yapılan çalışmalarda, folikuler sıvı vitamin D düzeyleri yüksek olan grupta, düşük olan gruba göre 4 kat fazla klinik gebelik elde edilmiş olması, araştırmacıların folikuler sıvı D vitamini düzeylerinin İVF'te siklus başarısının bağımsız bir prediktoru olduğu sonucuna varmalarına neden olmuştur (51). Yaş, VKİ, etnisite ve embriyo transfer sayısı ile birlikte düşünüldüğünde folikuler sıvı vitamin D düzeylerindeki her bir ng/mL artışın klinik gebelik elde etme olasılığını %7 arttırdığı bulunmuştur (51). Vitamin D' nin embriyo ve endometrium arasındaki sinyali düzenleyerek tüm plasental-desidual üniteyi etkilediği ve bu mekanizmayla asıl etkisini endometrium üzerine yaptığı bulunmuştur (52).

2.5. B12 Vitamini

Kobalamin olarak da bilinen B12 vitamini, suda çözünen bir vitamindir. Belirli bazı mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Bitkilerde üretilmez ve bulunmazlar. Hayvanlarda bu vitamin ya barsaklarında bulunan mikroorganizmalar tarafından üretilir ya da onların beslenme sırasında yedikleri diğer hayvansal besinlerden alınır.

Metilkobalamin ve 5-deoksiadenosilkobalamin, B12 vitaminin aktif formlarıdır. Sırasıyla metionin sentaz ve L-metilmalonil Koenzim A (CoA) mutaz enzimlerinin kofaktörleridir. Metionin sentaz, homosisteinin metionine dönüşmesini katalize eder. Metionin; deoksi ribo nükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA), hormonlar, proteinler ve lipidler de dahil olmak üzere yaklaşık 100 farklı substrat için bir metil donoru olan S-adenozilmetioninin oluşumu için gereklidir. L-metilmalonil-

CoA mutaz ise, yağ ve protein metabolizmasında önemli bir biyokimyasal reaksiyon olan propionatın degradasyonunda L-metilmalonil-CoA'yı suksinil-CoA'ya dönüştürür. Suksinil-CoA ise hemoglobin sentezi için gereklidir. Dolayısıyla eritrosit üretimi, nörolojik fonksiyonlar ve DNA sentezi için vitamin B12 gereklidir.

Vitamin B12 eksikliği megaloblastik anemi, yorgunluk, zayıflık, konstipasyon, iştahsızlık ve kilo kaybı ile karakterizedir. El ve ayaklarda hissizlik gibi nörolojik değişiklikler, depresyon, konfuzyon, demans, hafıza zayıflığı, irritabilite gibi belirtiler ortaya çıkabilir. Nörolojik belirtiler anemi olmadan ortaya çıkabilir, bu nedenle erken teşhis ve tedavi irreversibl hasarı önlemek açısından önemlidir. En bilinen laboratuar bulgusu ise megaloblastik anemidir (pernisiyoz anemi).

Vitamin B12 eksikliğinin başlıca nedenleri arasında, gıda malabsorpsiyonu, pernisiyoz anemi, cerrahi sonrası malabsorpsiyon ve beslenme yetersizliği sayılabilir. Bununla birlikte, çoğu durumda, vitamin B12 eksikliğinin nedeni bilinmemektedir. Vitamin B12 eksikliği riski olan gruplar şunlardır: Yaşlılar, pernisiyoz anemisi olanlar, gastrointestinal bozuklukları olanlar, gastrointestinal cerrahi geçirenler, vejetaryenler, sıkı vejetaryen diyetindeki gebe ve emziren kadınlar.

B12 vitamini, gebelik sırasında plasentaya geçmekte ve anne sütünde bulunmaktadır. Tamamen vejeteryan olan annelerin sütüyle beslenen bebeklerin sadece çok sınırlı miktarda vitamin B12 rezervi olabilir ve doğumdan aylar sonra B12 vitamini eksikliği gelişebilir. Bebeklerdeki tespit ve tedavi edilmemiş B12 vitamini eksikliği, beyin gelişiminin çok önemli olduğu bu dönemde ciddi ve kalıcı nörolojik hasara neden olabilir.

2.5.1. Fertilizasyonda B12 Vitamininin Rolü

Vitamin B12 eksikliğinin toplumdaki prevalansı % 3-29 arasında değişmektedir. Vitamin B12 eksikliğinin impotans, hipospermi, infertilite nedeni olduğu araştırmalar ile ortaya koyulmaktadır. Dikkat çekici olan ise infertilitenin, vitamin B12' nin neden olduğu anemi tablosu tespit edilmeden yıllar önce ortaya çıkmasıdır. Dolayısı ile vitamin B12 eksikliğinin neden olduğu tam kan parametrelerindeki değişiklik laboratuar olarak ortaya çıkmadan önce, dokudaki etkileri başlamakta ve doku yapısındaki bozukluklar (özellikle endometrial respetivite

azalması yoluyla) ile infertiliteye neden olduğu düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak, açıklanamayan infertilite durumlarında, tam kan incelemelerindeki hematolojik değerler normal olsa bile serum vitamin B12, metilmalonik asit, homosistein seviyesi araştırılmalıdır (53). Etyoloji ilişkisinin çok net olmamasına karşın, DNA yapımının vitamin B12 aracılığı ile olması, dolayısıyla, vitamin B12 eksikliğinde meydana gelebilecek bozulmuş DNA' lı hücrelerin özellikle fertilizasyon ve implantasyon dönemini etkileyerek infertiliteye yol açabilmesi vitamin B12 ve infertilite arasındaki muhtemel mekanizmalardan birisidir (54, 55). Diğer bir mekanizma B12 vitamini eksikliğinin embryo viabilitesi üzerine olan negatif etkisidir (56). Koyunlarda subklinik vitamin B12 defektinin ovulatuar cevabı azalttığı da gösterilmiştir (57). Ronnenberg ve ark.' nın yaptığı prospektif bir çalışmada prekonsepsiyonel vitamin B12 durumu incelenmiş, B12 vitamin eksikliğinin azalmış konsepsiyon, artmış erken gebelik kaybı ve azalmış klinik gebelik açısından risk oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır (58). Pernisiyoz anemi, vitiligo ve infertilitesi olan vakalarda B12 tedavisini takiben aylar içinde infertilitenin düzeldiği de gösterilmiştir (59). Çelebi ve ark.' nın 3 vakalık bir çalışmasında makrositer anemili 3 infertil hastada vitamin B12 eksikliği tespit edilmiş ve tedaviyi takiben 9, 18 ay sonra gebelik elde edilmiştir (60). Benzer şekilde ülkemizden 2 olguda yine B12 vitamin replasmanı ile gebelik elde edildiği bildirilmiştir (61).

B12 vitamini eksikliğinin homosistein seviyelerini arttırarak erken gebelik kayıplarına yol açtığı net olarak ortaya konmuştur (54, 55). B12 metabolizmasını ilgilendiren genlerdeki sekans varyasyonları da erken gebelik kayıpları ile ilişkili bulunmuştur (62). B kompleks vitaminleri ile desteklenen hastalarda İVF sonrası dizigotik gebeliklerin arttığı da belirtilmektedir. Bu amaçla 602 infertil hastada yapılan bir araştırmada B vitamini ile ilgili 5 gen varyasyonu tespit edilmiş, ayrıca gıdalara vitamin takviyesi sonrasında İVF yapılmasını takiben ikiz gebelik oranlarında artış olduğu belirtilmiştir (56).

İVF tedavisine başvuran hastalarda yapılan bir çalışmada, serum vitamin B12 düzeyi yüksek olan kadınlarda düşük olanlara göre implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (63). Hollanda'da yapılan diğer bir çalışmada ise serum ve folikuler sıvı vitamin B12 konsantrasyonlarının embriyo kalitesi ile pozitif korelasyon gösterdiği anlaşılmıştır (56).

2.6. Folik Asit

Folat, bazı gıdalarda bulunan ve bir diyet takviyesi olarak da kullanılabilen suda çözünen bir B vitaminidir. Folik asit, bir pteridin halkasına bağlı bir p-aminobenzoik asit ve bir glutamik asit molekülünden oluşur. Folat, nükleik asitlerin (DNA ve RNA) sentezinde tek karbon transferlerinde ve amino asitlerin metabolizmasında koenzim veya yardımcı substrat olarak olarak işlev görür. Folat bağımlı en önemli reaksiyonlardan biri, önemli bir metil donoru olan S-adenozil-metioninin sentezinde homosisteinin metiyonine dönüştürülmesidir. DNA' nın oluşumunda deoksiuridilatın timidata metillenmesi folata bağlı başka bir reaksiyondur. Bu reaksiyonun bozulması folat eksikliğinin önemli özelliklerinden biri olan megaloblastik anemiye neden olabilecek süreci başlatır.

Folat, sebzeler (özellikle koyu yeşil yapraklı sebzeler), meyve ve meyve suları, fındık, fasulye, bezelye, süt ürünleri, kümes hayvanları, et, yumurta, deniz ürünleri ve tahıllar dahil olmak üzere çok çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunur. Ispanak, karaciğer, maya, kuşkonmaz ve brüksel lahanası en yüksek folat seviyesine sahip gıdalar arasındadır.

İzole folik asit eksikliği nadirdir; genellikle diğer besin eksiklikleriyle birlikte bulunur. Büyük, anormal çekirdekli eritrositlerle karakterize olan megaloblastik anemi, folat veya vitamin B12 eksikliğinin primer klinik belirtisidir. Folat eksikliği dil ve ağız mukozasında ağrılı ülserler, deri, saç veya tırnak pigmentasyonundaki değişiklikler ve homosisteinin kan konsantrasyonlarında yükselmeye neden olur. Folik asit alımı yetersiz olan kadınların nöral tüp defekti (NTD) olan bebek doğurma riski yüksektir. Yetersiz maternal folat seviyesi aynı zamanda düşük bebek doğum ağırlığı, preterm doğum ve fetal büyüme geriliği ile ilişkilendirilmiştir. Folate yetersizliği riski olan gruplar şunlardır: Alkol bağımlılıları, reprodüktif çağdaki kadınlar, gebeler ve malabsorptif bozuklukları olanlar.

Gebelik sırasında nükleik asit sentezindeki rolu nedeniyle folat ihtiyacı artar. Bu yüzden gebelerin yeterli miktarda folik asit ve diğer besin maddelerini almalarını sağlamak için prenatal vitamin takviyesi önerilmektedir.

2.6.1. Fertilizasyonda Folik Asitin Rolü

İnfertil kadınlarda yapılan çalışmalarda, prekonsepsiyonel folik asit takviyesinin folikul sıvısında folat düzeylerini arttırdığını ve homosistein seviyesini düşürdüğünü göstermiştir (64). Ek olarak, folik asit takviyesi, daha iyi embriyo kalitesi ve gebelik şansı ile ilişkilendirilmiştir (65) ve folik asit de dahil olmak üzere multivitamin alan kadınlarla yapılan bir çalışmada ise, ovulatuar infertilite riski daha düşük bulunmuştur (66). Özellikle NTD'nin önlenmesi için önerilen dozlardan daha yüksek dozlarda suplemental folik asit alımı, düşük infertilite sıklığı, düşük gebelik kaybı riski ve infertilite tedavisinde daha büyük başarıyla ilişkili bulunmuştur (67). İnfertil hastalarda folat desteğinin total ve matur oosit sayısını ve kalitesini (68), embriyo kalitesini (65), ve doğum oranlarını (64) arttırdığı bulunmuştur.

2.6.2. Folik Asit ve Vitamin B12 İlişkisi

Diyette büyük miktarda alınan folik asit, vitamin B12 eksikliğinin neden olduğu megaloblastik anemiyi düzelterek aynı zamanda ortaya çıkan nörolojik hasarı düzeltmeden, vitamin B12 eksikliğinin zararlı etkilerini maskeleyebilir. B12 vitamini eksikliği tedavi edilmezse kalıcı nörolojik hasar meydana gelebilir.

2.7. Homosistein

Homosistein protein üretimi, doku restorasyonu ve devamlılığı için kullanılan bir amino asittir. Sülfür içeren bir amino asit olan homosistein, diyetten elde edilemez, hücrelerde metioninin sisteine dönüşmesinden oluşur. Genellikle iki metabolik yoldan birisi aracılığıyla hızla metabolize olur. Bunlar: (1) Metionini yeniden üreten; vitamin B12 ve folata bağımlı bir remetilasyon yolu (2) Homosisteini sisteine dönüştüren bir vitamin B6 bağımlı transsülfürasyon yolu. Bu nedenle, bu vitamin ve kofaktorlerin düşük seviyeleri, hafif (15-30 µmol/L), orta (31-100 µmol/L) veya ağır (>100 µmol/L) olarak sınıflandırılabilen hiperhomosisteinemi ile ilişkilidir. Homosistein seviyelerinin ölçülmesi genellikle açlık sonrası yapılır. Normalde yetişkinlerin plazmasında total homosistein konsantrasyonu: yaklaşık 10 µmol/L'dir. (69). Total plazma homosisteininin % 90' ından fazlası plazma proteinlerine bağlanır ve plazmada sadece yaklaşık 0.1 µmol/L' lik eser miktarda serbest homosistein mevcuttur (70).

Plazma homosistein konsantrasyonundaki artışlar çeşitli nedenlere bağlı olabilir: (1) Homosistein metabolizmasında rol oynayan enzimlerde genetik defekt (metilen tetrahidrofolat reduktaz (MTHFR)'ın termo-labil varyantının üretilmesiyle), (2) Vitamin B12, B2, folat (B9) ve kolinin (B4) diyetle alım yetersizlikleri (3) Kronik hastalıklar, alışkanlıklar (obezite, sigara, fiziksel hareketsizlik, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diabetes mellitus ve kronik böbrek yetmezliği) ve ilaçlar (fenofibrat, metotreksat ve nikotinik asit). Artan homosistein seviyesi, tiol grubunun oto-oksidasyonuna maruz bırakarak hidrojen peroksit ve diğer ROT'lar ile hücrelerde OS'e neden olur (71, 72). Artmış OS, endotel hücrelerinin işlev bozukluğuna, endotel hücrelerinin ödemlenmesi ve vakuolizasyonuna, fibrin birikmesine ve hatta vaskuler trombus formasyonuna neden olur. Artmış homosistein kan düzeyleri tromboemboli riskini arttırarak serebrovaskuler olaylara, periferik arteriyal tromboza, koroner kalp hastalıklarına yol açarak venöz tromboembolik hastalık riskini arttırmaktadır. Hiperhomosisteineminin kardiyovaskuler hastalık için bir risk faktörü olduğu net olarak ortaya konmuştur (73, 74).

MTHFR'nin termo-labil varyantı obstetrik komplikasyonlarla bağlantılıdır. Bu komplikasyonlar; intervillöz veya spiral arter trombozu ve yetersiz plasental perfuzyona bağlı oluşan şiddetli preeklampsi, ablasyo plasenta, fetal büyüme geriliği ve ölü doğumdur (75).

2.7.1. Fertilizasyonda Homosisteinin Rolü

Homosistein, metionin kataboliti olan bir aminoasit olup vücutta çok yönlü etkileri bulunmaktadır. FS'de homosistein konsantrasyonu ile oosit kalitesi ve maturasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu, folik asit takviyesi ile hem FS hem de serumda homosistein konsantrasyonunun azaldığı bulunmuştur (68**)**. İVF tedavisine giden PKOS'lu hastalarda yapılan bir çalışmada, PKOS grubunda, açıklanamayan infertilite ve erkek faktörü olan gruba göre serum homosistein düzeylerinde anlamlı artış tespit edilirken, FS homosistein düzeyleri açısından fark tespit edilememiştir. Aynı çalışmada, serum homosistein düzeyleri ile MII oosit ve embriyo sayısı arasında negatif etki bulunmasına rağmen serum homosistein düzeylerinin klinik gebelik oranına etkisi bulunamamıştır (76).

Jerzak ve ark. (2003) rekurren spontan abort (RSA) öyküsü olan 8 kadın, daha önce başarılı gebelik öyküsü olan sağlıklı 8 kadın ve İVF uygulanan 15 kadının (6'sı açıklanamayan infertilite, 6'sı erkek faktör, 3'ü tubal faktör) serum ve FS'da total açlık homosistein konsantrasyonlarını enzyme linked immunosorbent assay (ELİSA) yöntemiyle tayin etmişlerdir. Bu araştırmacılar, RSA 'lı kadınların normal sağlıklı kadınlara göre anlamlı derecede daha yüksek serum homosistein konsantrasyonuna sahip olduklarını bulmuşlardır. İVF başarısızlığı olan kadınlarda, İVF tedavisi sonrası başarı elde edilen kadınlara göre serum ve FS homosistein düzeyini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Araştırmacılar, bu ön verilere göre yüksek homosistein düzeyinin spontan gebelik veya İVF' i takiben gebelik sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği sonucuna varmışlardır (77).

Pacchiarotti ve ark. (2007) hiperhomosisteineminin İVF başarısına etkisini değerlendirmek amacıyla prospektif olarak hiperhomosisteinemisi olan toplam 48 infertil çifti incelemişler. Hiperhomosisteinemi tedavisi alan grupta almayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek gebelik oranı, implantasyon hızı görülürken daha düşük abort izlenmiştir. Transfer edilen embriyo sayısı ve kalitesi gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Araştırmacılar, buradan yola çıkarak, hiperhomosisteineminin İVF başarısını negative yönde etkileyebileceğini belirtmişlerdir (78).

Boxmeer ve ark. (2009) homosistein yolunun biyolojik belirteçlerinin İVF sonucu ile ilişkisini incelemiş ve FS'da optimal bir homosistein yolağının, daha iyi bir embriyo kalitesi ve gebelik şansı ile bağlantılı olduğu sonucuna varmışlardır (65).

2.8. Demir ve Ferritin

2.8.1. Demir

Demir doğal olarak birçok gıdada bulunan, bazı gıda ürünlerine eklenen ve bir diyet takviyesi olarak da bulunan bir mineraldir. Demir, oksijeni akciğerlerden dokulara aktaran bir eritrosit proteini olan hemoglobinin önemli bir bileşenidir. Kaslara oksijen sağlayan bir protein olan miyoglobinin bileşeni olarak demir,

metabolizmayı desteklemektedir. Demir büyüme, gelişme, normal hücresel fonksiyonlar, bazı hormonlar ve bağ dokusunun sentezi için de gereklidir.

Yetişkinlerde 3-4 gram elementer demirin çoğu hemoglobindedir. Demirin kalan büyük bir kısmı, karaciğer, dalak ve kemik iliğinde ferritin veya hemosiderin olarak depolanır veya kas dokusundaki miyoglobinde bulunur. İdrar, dışkı, gastrointestinal yol ve deri yoluyla az miktarda demir kaybedilir. Menstruasyonda demir kaybı daha fazladır. Hepsidin, esas olarak karaciğerde sentezlenen, demir emiliminin ve demirin plazmada da dahil olmak üzere vücuda dağılımının anahtar düzenleyicisi olan dolaşımdaki bir peptit hormondur.

Diyetteki demirin iki ana formu vardır: Hem ve nonhem. Bitkiler ve demir destekli gıdalar yalnızca nonhem demir içermektedir; buna karşın et, deniz ürünleri ve kümes hayvanları hem demir içermektedir. Normal batı diyeti, hem formunda %10, nonhem formunda %90 demir içerir. Diyetteki hem demirin %30'u, nonhem demirin ise %5'i emilir ve emilim başlıca duenumda gerçekleşir. Nonhem demirin yapısındaki demir, ferrik (Fe^{+3}) demirdir ve bu formu biyolojik olmadığı için, Fe^{+3} intestinal epitelden transport olmadan önce, koenzim olarak C vitamini kullanan ferritin reduktaz enzimi ile ferröz (Fe^{+2}) formuna indirgenmektedir.

Demir insan vücudunda daima iki oksidasyon durumu olan ferrik (Fe^{+3}) veya ferröz (Fe^{+2}) şekilde bulunur. Demirin bu elektron değişimi bir taraftan gerekli ve yararlı olurken, diğer taraftan demir fazlalığı durumlarında oluşan serbest demirin prooksidan özellik göstermesiyle, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu yüzden demir hiçbir zaman serbest bırakılmamaya çalışılır.

İzole demir eksikliği nadirdir çünkü demir eksikliği fakir diyet, malabsorptif bozukluklar ve kan kaybıyla ilişkili olduğundan, demir eksikliği olan kişilerin genellikle başka besin eksiklikleri de vardır. Demir eksikliği riski olan gruplar gebeler, bebekler ve küçük çocuklar, ciddi menstrual kanaması olan kadınlar, sık kan bağışı yapanlar, kanser hastaları, gastrointestinal cerrahi geçirenler, gastrointestinal hastalığı olanlar ve kalp hastalarıdır.

2.8.2. Ferritin

Ferritin demir depolayan, vücudunuzun ihtiyacı olduğunda bu demiri serbest bırakan bir proteindir. Ferritin genellikle hücre içinde olup, çok az miktarda dolaşımda bulunur. Ferritin en çok hepatositlerde ve retikuloendotelyal hücrelerde bulunur. Ferritin, eritrosit üretimi için kullanılmak üzere hücrelerde depolanır. Dolaşımda ise transferrin adı verilen ferritini taşıyan bir proteine bağlanır.

Vücudumuzda demirin yeterli miktarda olması oldukça önemlidir. Bir kişide yeterli ferritin yoksa, demir depoları hızlı bir şekilde tükenebilir. Normalden düşük ferritin seviyesi, günlük diyette yeterli miktarda demir tüketimi olmadığını, demir emilimini engelleyen gastrointestinal bir bozukluk olduğunu veya demir kaybına yol açan aşırı menstrual kanama veya gastrointestinal kanama gibi bir durum söz konusu olabileceğini gösterir. Ferritin düzeyleri düşük olduğunda yorgunluk, baş dönmesi, kronik baş ağrısı, zayıflık, kulaklarda çınlama, sinirlilik, bacak ağrıları, nefes darlığı gibi semptomlar görülebilir.

2.8.3. Fertilizasyonda Demir ve Ferritinin Rolü

İnfertilite ve demir ilişkisini araştıran çalışmalarda artmış demir alımının ovulatuar infertilite riskini azalttığını bulmuşlardır (79). Perikonsepsiyonel dönemde içinde demir ve folik asitin de bulunduğu multivitamin ve mineral suplementasyonunun infertilite tedavisi üzerinde pozitif etkisinin olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir (80).

Ferritin, demir depolarını gösteren bir proteindir. İVF tedavisine giden hastaların FS ve serumunda yapılan bir çalışmada, İVF tedavisi sonucu gebe kalan ve kalmayan hasta grubu arasında serum ve FS ferritin düzeyleri açısından fark saptanmamıştır (81). Serum demir ve ferritin düzeylerinin infertil hastaların %80'den fazlasında yeterli olduğu bulunmuştur (82).

2.9. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

2.9.1. Serbest Radikaller

Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektronu olan kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük reaktif atom ve moleküllere serbest radikal denir. İnflamasyon, alınan besin maddeleri, normal metabolizma, yaşlanma, hiperoksi, iskemi, radyasyon, kimyasal maddeler, sigara, ozon, azot dioksit ve ilaçlar gibi birçok uyaranın etkisiyle oksidan adı verilen serbest radikaller açığa çıkarlar. Serbest radikallerin en önemli özelliği son derece reaktif olmalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı karşılaştıkları atom ve moleküllerle kolayca reaksiyona girerek onları kararsız bir yapı haline dönüştürürler (83, 84). Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen oldukça reaktif yapıya sahip olan serbest radikaller, elektronu çiftleyebilmek için tüm hücre bileşenleri ile etkileşime girebilirler (85). Birçok fizyolojik olayda rol oynayan serbest radikaller, aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemi yetersiz kaldığında biyomoleküller ve doku komponentlerine zarar verirler. Serbest radikaller hücrenin lipit, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunum ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu arttırırlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir (86). Oksijenin toksik etkisi yoktur ancak aerobik hücre metabolizması sırasında moleküler oksijen, ROT'ne dönüşür. Normal O_2 metabolizması sonucu oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) ROT'lara örnektir. Fizyolojik şartlarda serbest oksijen radikalleri hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu, karaciğerde detoksifikasyon işlemi gibi vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynar.

2.9.2. Antioksidanlar

Vücutta eksojen ya da endojen yol ile oluşan reaktif oksijen radikallerini ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemleri vardır. Antioksidanlar değişik etki mekanizmalarına sahiptirler.

1) Onarıcı etki ile lipid, protein, ve DNA gibi yapılarda olan biyolojik moleküler hasarı onarır.

2) Zincir kırıcı etki ile oksidanları bağlayarak, zincirlerini kırıp işlevlerini engeller, serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurur.

3) Baskılayıcı etki ile oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak etkinliklerini azaltır veya inaktif şekle dönüştürür; reaksiyon hızını azaltır.

4) Temizleme etkisiyle oksidanları enzimler aracılığıyla zayıf bir moleküle dönüştürür.

Antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir:

2.9.2.1. Endojen Antioksidanlar

a. Enzimatik antioksidanlar: Aktif merkezlerinde bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn), demir (Fe^{+2}), selenyum (Se) gibi metalleri içerirler. Düzeyleri genetik kontrol altındadır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH R), glutatyon-S-transferaz enzimatik endojen antioksidanlardır.

b. Non enzimatik antioksidanlar: Melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albumin non enzimatik endojen antioksidanlara örnektir.

2.9.2.2. Eksojen Antioksidanlar

a. Vitaminler: α-tokoferol (vitamin E), ß-karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit.

b. İlaçlar: Ksantin oksidaz inhibitorleri, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), rekombinant SOD, nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar, demir redoks döngüsü inhibitörleri, demir şelatörleri, sitokinler, barbituratlar, nötrofil adezyon inhibitörleri.

c. Eser mineraller: Selenyum.

2.9.3. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikal oluştuğu zaman bu radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler vardır. Serbest radikal oluşum hızı ile bunların antioksidan sistemler tarafından kaldırılma hızı bir denge içindedir. Bu denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres (OS) olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (87). OS proteinlere, membran lipitlerine, nükleik asitlere ve karbonhidratlar üzerine etki ederek organizmada birçok hasara neden olmaktadır.

2.9.3.1. Oksidatif Stresin Etkileri

a. Oksidatif stresin proteinlere etkisi: Proteinler aminoasitlerden oluşmaktadır. Serbest radikallerin özellikle duyarlı aminoasitler ile doğrudan etkileşimi sonucunda proetinlerde fragmantasyon, çapraz bağlanmalar ve agregasyon meydana gelerek hasar oluşur. Proteinler oksidasyona uğradıkları zaman sekonder ve tersiyer yapılarında meydana gelen değişiklik sayesinde fonksiyonları etkilenir. Serbest radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran taşıyıcı proteinlerini ve reseptor etkileşimlerini bozarlar (88).

b. Oksidatif stresin membran lipidlerine etkisi: Membran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitleri OS'e oldukça duyarlıdır. Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (89) Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonlar şeklinde oluşur, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirlerinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılmasıyla başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. En önemli peroksidasyon ürünü

malondialdehittir (MDA). MDA membranlardan kolaylıkla difuze olarak, DNA yapısında yer alan nitrojen bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Sonuçta; oluşan yapısal hasarın şiddetine göre, plazma membranının akışkanlığında azalma, membran geçirgenliğinde değişme, membran potansiyelinde ve membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir. Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteoliz hızlanır ve doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliği bozulursa potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları değişir ve böylece protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir.

c. Oksidatif stresin nükleik asitlere etkisi: DNA' nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Serbest radikaller özellikle bu bazlarda mutasyona neden olurlar. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (90).

d. Oksidatif stresin karbonhidratlara etkisi: Özellikle glikoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak O_2^- ve H_2O_2'i meydana getirirler. Okside glikoz, protein ile reaksiyona girer ve glikolizasyon ve glikasyon ürünleri oluşturur (91).

2.9.4. Total Antioksidan Status

Vücudun antioksidan kapasitesine en büyük katkıyı plazmadaki antioksidan moleküller sağlamaktadır. Plazma farklı kan bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyabildiği gibi, diyetle alınan antioksidanların vücudun diğer kısımlarına dağıtılmasını da sağlayabilir. İn vivo her bir antioksidanın katkısı onun etkinliğine ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonuna bağlıdır (92). Serum ve dokulardaki farklı antioksidan bileşiklerin çeşit olarak fazlalığı, bağımsız olarak her bir antioksidan bileşiğin ölçümünü nispeten zorlaştırmaktadır. İlave olarak ölçüm sırasında farklı antioksidanlar arasında etkileşim olmasından dolayı bu antioksidanların birinin diğerlerini hesaba katmadan ölçülmesi, antioksidanların toplamının etkilerini doğru

olarak yansıtmayabilir. Tek tek ölçüm aynı zamanda hem pahalı hem de zaman alıcıdır. Bundan dolayı tüm parametrelerin tek tek ölçümü yerine plazma ve serumda bulunan ve antioksidan kapasitesi olan suda çözünen molekülleri yansıtan total antioksidan kapasitenin (TAK) ölçümü tüm antioksidan durumunun değerlendirilmesi için uygun bir biyokimyasal parametre özelliği taşır (93, 94). Total antioksidan aktivite (TAA), total antioksidan güç (TAOP), TAS terimleri de TAK yerine kullanılan sinonim kelimelerdir (95). Ürik asit, askorbik asit, albumin insan plazmasındaki TAS' a ana katkıyı sağlar. Çünkü bu moleküller kandaki diğer antioksidanlara (bilirubin, α-tokoferol, β-karoten gibi) nispeten yüksek konsantrasyondadır. Plazma ayrıca, transferrin ve seruloplazmin gibi demir tutucu antioksidan proteinlere ve direkt olarak radikalleri toplayabilen zincir kırıcı antioksidanlara da sahiptir Her bir antioksidanın, antioksidan defans sisteminde özel bir yeri olmasına rağmen, in vivo oksidatif hasara karşı organlara sinerjistik bir koruma sağlamak amacıyla birlikte etki etmesi özellikle önemlidir (92).

2.9.5. Total Oksidan Status

Vücutta çeşitli reaksiyonlarla oluşan birçok oksidan madde; singlet oksijen ($^1O_2$), O_2^-, H_2O_2, OH^- radikali ve nitrik oksit (NO) üretilmektedir. Bu oksidan maddelerin düzeyleri serum ve plazmada tek tek ölçülebilir fakat bunun oldukça maliyetli ve zaman alıcı olmasından dolayı son yıllarda kullanılan TOS, plazma ve vücut sıvılarındaki tüm oksidanların ölçümüne olanak sağlamaktadır (96).

2.9.6. Oksidatif Stres İndeksi

Oksidatif stres indeksi (OSİ), total plazma TOS'un TAS'a oranıdır (TOS/TAS) ve oksidatif stress indikatörüdür (97).

Plazma TAS, TOS, OSİ; oksidasyon ve antioksidasyon arasındaki redoks balansı yansıtır. TAS, TOS ölçümü oksidatif durumun tahmini için yararlı testlerdir (98).

2.9.7. Fertilizasyonda Oksidatif Stresin Rolü

Vücutta fizyolojik koşullarda üretilen serbest radikaller antioksidan mekanizmalar ile dengelenmektedir. Bu dengenin oksidatif yöne kayması olarak tariflenen OS'nin infertilitede rol oynadığı öne sürülmektedir (99). Fizyolojik şartlarda reaktif oksijen radikalleri ovulasyon sürecinde folikul içerisinde üretilmektedir (100) ve bir miktar oksidatif stimulasyon oosit maturasyonu ve ovulasyon için gereklidir. Çeşitli oksidatif belirteçlerin düzeylerinin FS'da seruma göre daha düşük iken antioksidan belirteçlerin daha yüksek olması FS'nin oositi oksidatif hasardan koruyucu etkisinin olduğunu gösterir (101). Antioksidan bir enzim olan SOD, overde özellikle antral folikullerin teka interna hücrelerinde bulunur (102). Bu nedenle teka interna hücreleri oosit maturasyonu sırasında oositi OS'den korur. OS durumunun oosit kalitesinde azalmaya sebep olabileceği gösterilmiştir. Açıklanamayan infertilitesi olan kadınların FS'da antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz düzeyinin azalmış olduğu rapor edilmiştir (100). Yang ve ark. nonfragmente embriyolarda yüksek düzeyde oksidan özelliği olan hidrojen peroksit saptamışlardır (103). Yapılan bir çalışmada İVF hastalarında fertil gruba göre lipid peroksidasyon düzeyleri artmış, serum vitamin A, C ve folikul sıvısı vitamin C ve glutatyon peroksidaz düzeyleri azalmıştır. Multivitamin ve mineral takviyesi alan grupta FS ve serumda lipid peroksidasyon düzeyleri azalmış, serum glutatyon peroksidaz, vitamin C ve E konsantrasyonları ve FS glutatyon peroksidaz ve vitamin C konsantrasyonları artmıştır (104). A, C, E vitaminleri ve folat gibi antioksidan vitaminler, çinko ve bakır gibi mineraller kan ve dokulardaki oksidatif dengeyi korumak ve onarmak için önemlidirler (99, 104). Bu antioksidanlar hücreleri, ROT'ların DNA, protein ve hücre membranı gibi yapılara olan zararına karşı korur (104). Antioksidanlar içerisinde bulunan demir bağlayan plazma glikoproteini olan transferrinin ROT oluşumunu suprese ettiği ve başarılı folikul gelişimi için önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (105). Ayrıca yine antioksidanlardan askorbik asitin eksikliği karakteristik olarak overyan atrofiye, yoğun folikuler atreziye, erken mayotik bölünmeye neden olabilir. Diğer antioksidan enzimler (katalaz, vb.) ve enzimatik olmayan antioksidanlar (E vitamini, vb.) ROT yapımını engelleyerek veya nötralize ederek oosit ve embriyoyu OS' den korur (106). Multivitamin ve mineral takviyesinin İVF tedavisi sonuçlarına ve OS'e etkisini araştıran bir çalışmada İVF siklusu öncesinde multivitamin ve mineral

takviyesi alan hastaların serum ve FS proteinlerinin oksidatif hasardan korunduğu, TAS düzeylerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Multivitamin ve mineral takviyesinin iyi kalite oosit sayısını önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (107). Azalmış folikuler TAS düzeyleri fertilizasyon düşüklüğü ile ilişkili olduğu bulunmuştur (108-111) OS'nin tubal kaynaklı infertilitede de etkisi bulunmaktadır. Tubal sıvıda ROT konsantrasyonunun artması oosit ve sperm viabilitesi, tubada fertilizasyon ve embriyo transportu üzerine olumsuz etki yapabilmektedir. Ayrıca aktif nötrofil, makrofaj ve proinflamatuvar faktörlerin tubal sıvıda bulunması endometriotik odaklar tarafından ROT üretimini ciddi olarak artırabilmektedir. ROT' un endometrial hücrelerin peritoneal kavitede büyümesini ve adezyonunu artırarak endometriozise bağlı adezyonlara ve infertiliteye neden olduğu düşünülmektedir (112). Ayrıca yapılan çalışmalarda, açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda fertil gruba göre periton sıvılarında anlamlı derecede yüksek ROT düzeyleri saptanmıştır (113).

3. MATERYAL-METOD

Prospektif ve tek merkezli olarak dizayn edilen bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İVF Ünitesi ve SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ortaklığı ile gerçekleştirildi. SDÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 07.03.2017 tarih ve 72867572.050.01-43857 nolu karar ile onaylandı ve SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) yönetim birimi tarafından 4913-TU2-17 proje numarası ile desteklendi.

3.1. Materyal

Folikul sıvıları, SDÜ Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İVF Ünitesine infertilite nedeniyle başvurup İCSİ-ET siklusu planlanan ve KOS protokolu başlanan hastalardan oosit toplama işlemi esnasında elde edildi. Aynı hasta grubundan OPU işlemi yapılacağı gün 12 saatlik açlık sonrası jelli biyokimya tüpüne de venöz kan alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifuj edilmesiyle serum elde edildi. Hastalardan alınan serum ve FS örnekleri SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Laboratuarında kalsiyum, demir, ferritin, vitamin B12, vitamin D, TAS, TOS, folik asit ve homosistein düzeyleri tayini yapılması için -80 ^{0}C' de ependorf tüplerde saklandı.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Derin dondurucu: Kirsch Bosch -80°C (Almanya)
2. Santrifüj cihazı: Nüve NF 1200 R model soğutmalı (Almanya)
3. Santrifüj cihazı: Eppendorf 5415 R eppendorf (Almanya)
4. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
5. BECKMAN Coulter: AU5800 biyokimya otoanalizörü (ABD)
6. ELİSA plate yıkıcı: Rayto Strip Washer Elx50 (Çin)
7. ELİSA okuyucu: Microplate Reader-6000 (Çin)
8. Roche Cobas 6000 E 411 hormon otoanalizörü (Almanya)
9. Vorteks cihazı: Nüve NM 100 (Türkiye)

3.1.2. Kullanılan Reaktif Malzemeleri

1. Rel Assay Homosistein ELISA Kiti (Türkiye)
2. Roche Diagnostics COBAS Elecsys Folik Asit (Almanya)
3. Roche Diagnostics COBAS Elecsys D vitamini (Almanya)
4. Roche Diagnostics COBAS Elecsys Ferritin (Almanya)
5. Roche Diagnostics COBAS Elecsys B12 vitamini (Almanya)
6. Beckman Coulter Kalsiyum (ABD)
7. Beckman Coulter Demir (ABD)
8. Rel Assay Diagnostics Total Antioksidan Statüs (Türkiye)
9. Rel Assay Diagnostics Total Oksidan Statüs (Türkiye)

3.2. Metod

Çalışmaya SDÜ Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İVF Ünitesine PKOS, düşük overyan rezerv (DOR), erkek faktörü ve açıklanamayan infertilite nedeniyle başvurup İCSİ-ET siklusu planlanan 21-44 yaş arası 80 infertil hasta dahil edildi. Çalışmaya katılan tüm hastalardan yazılı onam alındı.

3.2.1. Hastaların Seçimi

Çalışmaya erkek faktörü (erkek faktör grubu, n=20), açıklanamayan infertilite (açıklanamayan infertile grup, n=20), PKOS (PKOS grubu, n=20) ve DOR (DOR grubu, n=20) nedeniyle SDÜ Tıp Fakültesi İVF ünitesine başvuran, İCSİ-ET siklusu planlanan 21-44 yaş arası 80 infertil hasta dahil edildi.

Açıklanamayan infertilite spermiogram, ovulasyon, HSG ve eğer gerekli ise overyan rezerv testleri ve laparoskopi incelemeri normal gelen hastalar açıklanamyan infertile grup olarak kabul edildi (114). Bu gruptaki hastalar en az 1 yıl süre ile infertil olan, 21-35 gün arası değişen düzenli menstrual sikluslara sahip, ovulasyon kanıtı olan (midluteal serum PG>5 ng/ml), siklusun 2. günü FSH<10 IU/L değerine sahip, HSG ile normal tubal patens izlenen ve normal sperm parametreleri olan (sperm

konsantrasyonu >15 milyon/mL, progresif motil>40% ve normal morfoloji >4% veya total progresif motil sperm sayısı >5 million) hastalardı (29).

PKOS tanısı revize Rotterdam konsensusuna göre konuldu ve aşağıdaki 3 kriterden en az 2'ine sahip hastalar PKOS olarak kabul edildi (115). **1. Menstrual düzensizlik (Oligo-anovulasyon), 2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenemi, 3. Polikistik overler.** Oligo-anovulasyon siklus uzunluğunun 45 günden fazla olması veya yılda 8'den az spontan menstrual siklus a sahip olma olarak tanımlandı (116). Klinik hiperandrojenemi vücudun 8 farklı bölgesinde hirsutizmi derecelendiren Ferriman–Gallwey skorunun (FGS) 8' den fazla olması olarak tanımlandı (117). Biyokimyasal hiperandrojenemi tanımı serbest testesteron düzeyinin >3.6 ng/ml, ve/veya dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S) düzeyinin >9.7 µmol/l olması olarak yapıldı (118). Over volumunun 10 cm^3'den fazla olması veya siklusun folikuler fazında ultrasonografik muayenede 2-9 mm arası 12' den fazla folikul olması polikistik over olarak tanımlandı (119,120).

Erkek faktörü grubu ise; kadında infertiliteyi ekarte ettiğimiz ve erkekte çeşitli faktörlere (hipotalamohipofizer, testiküler, post-testiküler, vb.) bağlı olarak semen analizi sonuçları WHO 2010 kriterlerine göre oligospermi (sperm sayısının normalin altında olması konsantrasyon <15milyon), azospermi (semende hiç sperm bulunmaması), treatozoospermi (< %4 normal form sperm), astenospermi (motil sperm yüzdesinin düşük olması <%32 progresif motil), oligoastenospermi (sperm sayı ve motilitesinin normalin altında olması, konsantrasyon< 15 milyon ve <%32 progresif motil) olarak değerlendirilen veya İCSİ işlemi için TESE yapılarak sperm elde edilen hastalardan oluşmaktadır (121).

Anormal overyan rezerv testlerine sahip (bazal Serum FSH >15 IU/ml, bazal E2 >80 pg/mL, CC stimulasyon testi negatif, AFS<4, AMH düzeyleri düşük) hastalar DOR olarak tanımlandı (122-125). Erkek faktör, tubal patolojiler, uterin faktör ve endometriozis durumu olan hastalar bu gruptan dışlandı.

Kronik sistemik hastalık, endokrinopati (hipo/hipertirodi, hiperprolaktinemi, vb.), endometriozis, otoimmun hastalık, malabsorbsiyon durumu olan hastalar durumu olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Hastaların yaş, kilo (kg), boy (m), sigara, alkol kullanımı, ek hastalık varlığı, meslek, eğitim durumu ve infertilite süresi gibi demografik özellikleri kaydedildi. VKİ, kilonun (kg) boyun (m^2) karesine bölünmesiyle elde edildi.

Çalışmaya katılan tüm hastaların İCSİ-ET siklusuna alınmadan siklusun 2. günü FSH, LH ve E2 düzeyleri ve random bir günde TSH ve prolaktin (PRL) düzeyleri bakıldı. Hastaların tubal patensleri siklusun 7-10. günü çekilen HSG ile değerlendirildi. Siklusun 2. günü TV-USG (Voluson 730 Expert marka USG cihazı ve 5-9 MHz'lik vaginal prob) ile hastaların overyan gradeleri değerlendirildi.

Üroloji bölümünden konsultasyon istenerek eşlerinden 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası masturbasyon yöntemi ile alınan semen örneği incelendi.

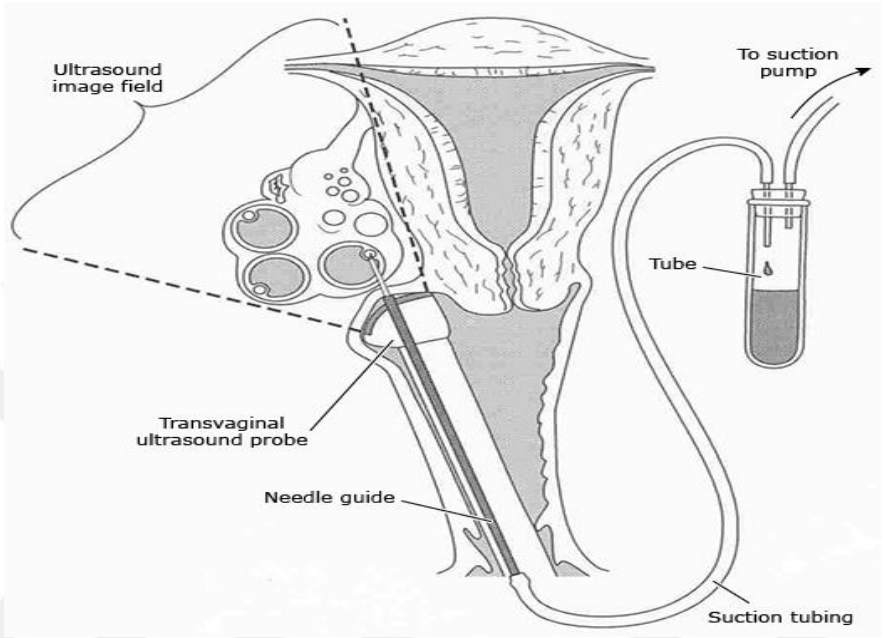
3.2.2. Kontrollu Overyan Stimulasyon

Tüm hastalara GnRH antagonist protokolu ile KOS uygulandı. Siklusun 2. günü TV-USG yapılarak overyan stimulasyon için rekombinant FSH (Gonal–F RFF Pen-follitropin alfa injection; Merck Serono veya Puregon; Schering-Plough, Turkey) ve/veya üriner FSH (Menogon 75 IU; Ferring) tedavisi başlandı. Gonadotropin dozu hastaların VKİ, yaş, önceki İVF tedavisine verdiği yanıt ve AMH düzeyleri ve TV-USG ile belirlenen overyan gradelerine göre ayarlandı. Pituiter supresyon için folikul boyutu 13-14 mm çapa ulaştığında veya E2 seviyesi 800 pg/ml olduğunda 0.25 mg/gün cetrorelix subkutan (Cetrotide flakon ® 0.25 mg; Merck Serono, Turkey) injeksiyonu başlandı ve hCG gününe kadar devam edildi.

3.2.3. Tedavi Monitorizasyonu ve Oosit Pick-up İşlemi

Hastalara folikul gelişiminin takibi amacıyla uygun aralıklarla TV-USG ve seri E2 ölçümleri yapıldı. Her kontrolde ölçülen folikullerin boyutu, sayısı ve endometrium kalınlıkları hasta takip formlarına kaydedildi. TV-USG' de iki veya daha fazla folikul >17mm olduğunda rekombinant hCG (Ovitrelle® PreFilled Syringe Choriogonadotropin alfa injection, 250 mikrogram/0,5mL, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) ile ovulasyon tetiklendi. hCG uygulamasından yaklaşık 36 saat sonrasında hastalar genel anestezi altında OPU işlemine alındı.

OPU işlemi genel anestezi altında, hasta dorsolitotomi pozisyonunda iken gerçekleştrildi. Hasta steril örtülerle örtüldü, vagene spekulum yerleştirildi, vagen steril serum fizyolojik ile yıkandı. TV-USG eşliğinde çift lümenli 17 mm boyutlarında oosit aspirasyon iğnesi kullanılarak transvaginal yoldan oosit toplama işlemi uygulandı.



Şekil 1. OPU işleminin şematik gösterilişi.

Alınan FS ve oositler, embryologa verilerek oositlerin ışık mikroskobu altında gelişimsel evreleri kaydedildi. Toplanan oosit sayısı, MII, MI ve GV aşamasında kaç oosit olduğu, empty zona (EZ) ve anomalili oosit sayısı kaydedildi.

3.2.4. Folikul Sıvılarının ve Serumun Elde Edilmesi ve Hazırlanması

OPU işlemi esnasında aspire edilen FS örneklerinden embriyolog tarafından oositler ayrıştırıldı. Kalan sıvılar 10 dakika 3000 rpm'de santrifuj edilerek, oluşan süpernatanlarından ayrılarak, sarı berrak renkli olan FS'ları eppendorf tüplere konuldu.

Çalışmaya dahil edilen hastaların OPU işleminin yapılacağı gün, 12 saat açlık sonrası venöz kan örnekleri jelli biyokimya tüplerine alınarak 3000 rpm devirde 10 dakika santrifuj edilerek serum elde edildi.

Serum ve FS örnekleri kalsiyum, demir, ferritin, vitamin B12, vitamin D, folik asit, TAS, TOS ve homosistein düzeylerinin tayinine kadar eppendorf tüplerine iki porsiyona ayrılarak -80°C'de saklanmıştır.

3.2.5. İCSİ İşlemi ve Embriyo Transferi

OPU günü hastanın eşinden masturbasyon yoluyla elde edilen spermlerin likefaksiyon sonrası sayı ve motilitesi değerlendirildi. Her hastada eşinin spermleri kullanıldı. Alınan spermler swim-up veya gradient yöntemlerinden geçirildikten sonra modifiye insan tubal sıvı medyumu (PureSperm 40/80 Nidacon international Mölndal Sweden) ile yıkanarak hazırlandı. Oositler, petri kabında %7 sentetik serum ilave edilmiş modifiye insan tubal sıvı medyumuyla (Vitrolife G-TL Europe Sweden AB) 37^0 C'de ve %5 CO_2 ortamında inkube edildi. Alınan MII oositler, içinde 5 µl' lik HEPES tamponlu damlaların olduğu petri kabına yerleştirildi ve İCSİ işlemi uygulandı. ***Fertilizasyon*** İCSİ prosedurundan bir gün sonra değerlendirildi ve 2 pronukleus gözlenen oositler fertilize olarak kabul edildi (Şekil 2). Fertilize oosit sayısının MII oosit sayısına bölünmesi ile ***fertilizasyon oranı*** tayin edildi [(Fertilize oosit/MII oosit)X100].



Şekil 2. İki polar cismi de içeren fertilize oosit.

Embriyolar 2. ve 4. günde tekrar değerlendirildi. İkinci günde 4 hücreli, 3. günde 8 hücre aşamasına gelen embryolar normal olarak değerlendirildi. Nukleer fragmentasyona göre embriyoların gradelemesi yapıldı. Nukleer fragmentasyon olmayan embriyolar Grade 1 embriyo (iyi kaliteli embryo), nukleer fragmentasyonun %20 olduğu embryolar Grade 2 (orta kaliteli embryo), nukleer fragmentasyon oranının %21-50 olduğu embryolar Grade 3, fragmentasyonun >%50 olduğu embryolar ise

Grade 4 embriyo (kötü kaliteli embryo) olarak değerlendirildi. Grade 1, 2, 3 embriyolar Wallace kateteri (Sure View embriyo replacement catheter Wallace Ltd., made in Mexico, Smiths medical) ile TV-USG eşliğinde transfer edildi. Hastanın yaşı ve elde edilen embriyoların sayısı ve kalitesi göz önüne alınarak 1 veya 2 embriyo/embryolar transfer edilmiştir. Tüm hastalara luteal destek sağlamak amacıyla OPU gününden 1 gün sonra başlayarak intravaginal progesteron jel (Crinone® %8 jel, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) uygulanmıştır. Embryo transferinden 12 gün sonra kanda bakılan hCG'nin pozitif olması ***implantasyon*** olarak kabul edildi. Embryo transferinden 5 hafta sonra TV-USG'de uterin kavitede gestasyonel kese izlenmesi ***klinik gebelik*** olarak kabul edildi. Viabl canlı bebek doğurmak (500 gram üzeri ve/veya 24. gebelik haftasından sonra doğum yapmak) ***eve bebek götürme***, 500 gram altı ve/veya 20. gebelik haftasından önce olan gebelik kaybı ise ***abort*** olarak değerlendirildi.

3.2.6. Folikul Sıvısı ve Serumda Araştırılan Parametrelerin Tayini

3.2.6.1. Folikuler Sıvı ve Serumda TAS ve TOS Düzeylerinin Tayini

Numunelerde spektrofotometrik yöntemle Rel Assay Diagnostics Assay Kitleri kullanılarak TAS ve TOS çalışılmıştır. Her iki kit de Beckmann Coulter AU 5800 otoanalizörüne aplike edilmiştir.

a. TAS Çalışma Prensibi:

Numunede bulunan antioksidan maddeler, kit içindeki reaktiflerden biri olan koyu mavi-yeşil renkteki ABST radikal solusyonunu renksiz forma redüklemiştir ve reaksiyon karışımının 660 nm deki absorbans değişimi ölçülmüştür. Absorbans değişimi, numunede bulunan TAS düzeyi ile doğru orantılıdır. Yöntem, stabil antioksidan standart solusyonu (E vitamini analoğu) Trolox Equivalent ile kalibre edilmiştir (126).

b. TOS Çalışma Prensibi:

Numunede bulunan oksidan maddeler, ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyon haline okside etmiştir. Ferrik iyon formu, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirmiştir. Renk oluşumu; numunedeki oksidan moleküllerin

miktarı ile doğru orantılı olduğundan, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve TOS değeri elde edilmiştir. Yöntem, hidrojen peroksit ile kalibre edilmiştir (126).

c. Oksidatif Stres İndeksi

Elde edilen TAS ve TOS değerleri kullanılarak OSİ değerleri aşağıdaki gibi hesaplanır:

OSİ: TOS/TAS şeklinde beklinde bölünerek hesaplanmıştır.

OSI (arbitrary unit) =TOS (µmol H2O2 Eq/L) / TAS (µmol Trolox Eq/L) x 100.

$$OSI = \frac{TOS,\ \mu\text{mol}\ H_2O_2\ equivalent/L}{TAS,\ \mu\text{mol Trolox}\ equivalent/L} X100$$

3.2.6.2. Folikuler Sıvı ve Serumda Homosistein Çalışma Prensibi

Homosistein seviyesinin kantitatif ölçümü enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile ticari kit (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak yapılmıştır. Kit 6 nokta kalibratör içermekteydi (2nmol/ml, 4nmol/ml, 8nmol/ml, 16nmol/ml, 32nmol/ml, 64nmol/ml) ve tüm standartlar duplike çalışılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen optik dansite verileri alınmıştır. Prosedür sonunda standartların optik dansite- konsantrasyon grafiği çizilmiş ve tüm numunelerin konsantrasyonları bu grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Homosistein duyarlılık sınırı 0.09 nmol/ml'dir.

3.2.6.3. Folikuler Sıvı ve Serumda Demir ve Kalsiyum Düzeylerinin Tayini

Serum demir ve kalsiyum düzeylerinin ölçümü biyokimya analizörü ile uyumlu ticari kitlerle biyokimya otoanalizöründe (Beckman Coulter AU5800, ABD) çalışılmıştır.

a. Demir Çalışma Prensibi:

Demir, fotometrik renk testi yöntemi ile çalışılmaktadır. Asidik bir ortamda, transferrine bağlı demir serbest değerlikli demir iyonları ve apo-transferrin halinde parçalanır. Hidroklorik asit ve sodyum askorbat, 3 değerlikli demir iyonlarını 2

değerlikli hale indirger. İki değerlikli demir iyonları, TPTZ (tripiridil triazin) ile reaksiyona girerek 600/800 nm'de bikromatik olarak ölçülebilen mavi renkli bir kompleks oluşturur. Absorbanstaki artış mevcut demir miktarıyla doğru orantılıdır.

b. Kalsiyum Çalışma Prensibi:

Kalsiyum, fotometrik renk testi yöntemi ile çalışılmaktadır. Test prensibi Arsenazo III ile yoğun bir mor renkli kompleks oluşturacak şekilde reaksiyona giren kalsiyum iyonlarına dayanmaktadır. Bu yöntemde, Ca-Arsenazo III kompleksinin absorbansı 660/700nm'de bikromatik olarak ölçülmektedir. Reaksiyon karışımının absorbansında ortaya çıkan artış numunedeki kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.2.6.4. Ferritin, folik asit, 25(OH)D_3 ve vitamin B12 çalışma prensibi:

Serum ferritin, folik asit, 25(OH)D_3 ve vitamin B12 düzeyleri hormon otoanalizöründe (Roche Cobas 6000 E 411, Almanya) cihaz ile uyumlu ticari kitlerle elektrokemilüminesans yöntemle (ECLIA= Elektrokemiluminesans immunoassay) çalışılmıştır. ECLIA yönteminin geliştirilmesi, bir rutenyum kompleksi ve tripropilaminin (TPA) kullanımına dayanır. Reaksiyon kompleksinin kimyasal ışık verme reaksiyonu, örnek çözeltiye bir voltaj uygulayarak başlatılır ve sonuçta tam olarak kontrollü bir reaksiyon meydana gelir.

3.2.7. İstatiksel Analiz

Veriler SPSS version 17.0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. p değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Devamlı değişkenler dağılımlarının normal ya da anormal olduğun anlamak için Kolmogorov–Smirnov testi ile analiz edildi. Normal dağılan devamlı değişkenlerin karşılaştırılmasında Student-t test, anormal dağılan devamlı değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Devamlı değişkenler ortalama±standart sapma (SD) değerleri olarak verildi. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare ve Fisher's kikare testleri kulanıldı. Serum ve folikuler sıvıda araştırılan parametrelerin ilişkisini değerlendirmek için korelasyon analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamıza infertilite nedeniyle başvurup İCSİ-ET siklusu planlanan 21-44 yaş arası 80 infertil hasta dahil edildi. Hastalar infertilite nedenine göre PKOS (n=20), DOR (n=20), erkek faktörü (n=20) ve açıklanamayan infertil (n=20) grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

4.1. Gruplar Arası Temel Karakteristik Özelliklerin Karşılaştırılması

Çalışmamıza katılan hastaların yaş ortalaması 30,40±5,96 yıldı. Yaş açısından bakıldığında DOR grubunun yaş ortalaması (36.15±5.26 yıl), PKOS grubu (28,55±3,0 yıl, p=<0,0001), açıklanamayan infertil grup (30,60±6,61, p=0,003) ve erkek grubu (26,30±3,37, p=<0,0001) yaş ortalamasından anlamlı olarak daha büyük saptandı. Açıklanamayan infertil grubun yaş ortalaması da (30,60±6,61 yıl) erkek grubu yaş ortalamasından (26,30±3,37 yıl) anlamlı olarak daha büyüktü (p=0,035).

Çalışmadaki hastaların ortalama partner yaşları 33,75±5,96 yıldı. DOR grubunun ortalama partner yaşı (38,75±5,90 yıl), erkek grubu (30,85±4,41 yıl, p=<0,0001), PKOS grubu (31,80±3,69, p=<0,0001) ve açıklanamayan infertil grupla (33,60±6,39, p=0,015) kıyaslandığında anlamlı olarak daha büyüktü.

Çalışmaya katılan tüm hastaların ortalama VKİ' leri 25,44±4,68 kg/m^2 olup gruplar arasında VKİ açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,058).

Katılımcıların ortalama partner VKİ'leri ortalama 26,57±3,79 kg/m^2 olup gruplar arasında partner VKİ açısından da anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Hastaların ortalama infertilite süresi 5,46±3,99 yıl ve İVF siklus sayıları ortalama 1,33±0,61 idi. İnfertilite süreleri ve siklus sayıları gruplar arasında homojen olarak dağılmıştı (p>0,005).

Sperm parametreleri açısından bakıldığında; erkek grubunun ortalama sperm konsantrasyonu (6,65±14,25 10^6/ml) ve PKOS grubu (48,69±40,37 10^6/ml, p=0,001), açıklanamayan infertil grup (61,08±42,50 10^6/ml, p=<0,0001) ve DOR (59,65±30,04 10^6/ml, p=<0,0001) grubunun ortalama sperm konsantrasyonuna göre anlamlı olarak daha düşük olarak izlendi. Progresif motil sperm yüzdesi açısından değerlendirme

yapıldığında erkek grubunun ortalama progresif sperm motilitesi (%20,55±23,94), PKOS grubu (%51,65±19,81), açıklanamayan infertil grup (%56,1±18,86) ve DOR grubu ile karşılaştırıldığında (%52,75±14,05) anlamlı olarak daha düşüktü (p=<0,0001).

Çalışmaya katılan hastaların bazal hormon değerleri karşılaştırıldığında; DOR grubunun FSH düzeyleri (9,27±3,02 mIU/mL), erkek grubu (7,02±2,58 mIU/mL, p=0,016), açıklanamayan infertil grup (6,84±1,52 mIU/mL, p=0,008) ve PKOS grubuna (7,27±1,75 mIU/mL, p=0,044) göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. PKOS grubu (6,89±2,76 mIU/mL) LH değerleri, açıklanamayan infertil gruba (4,74±2,05 mIU/mL) göre anlamlı düzeyde yüksek bulunurken (p=0,03), diğer gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi. E2 düzeylerine akıldığında gruplar arasında E2 düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p>0,05). PG düzeyleri gruplar arasında homojen olarak dağılmıştı (p>0,05).

TSH düzeyleri ortalama 2,25±1,17 uIU/mL olup gruplar arasında TSH düzeyleri açısından anlamlı farklılık yoktu (p>0,05). PRL düzeyleri ortalama 15,90±7,60 ng/mL olup gruplar arasında PRL düzeyleri de homojen olarak dağılmıştı (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların %11,3'ü (9/80) sigara ve %1,3'ü (1/80) alkol kullanmakta olup; PKOS grubunun %10'u (2/20), açıklanamayan infertil grubun %5'i (1/20), DOR grubunun %20'si (4/20), erkek grubunun ise %10'unda (2/20) sigara kullanımı mevcuttu. Gruplar içinde sadece DOR grubunda %5 (1/20) oranında alkol kullanımı mevcuttur. Gruplar arasında sigara ve alkol kullanımı açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Gruplar arası temel karakteristik özellikler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Gruplar arası bazal karakteristik özellikler

	PKOS (n=20)	**Açıklanamayan (n=20)**	**DOR (n=20)**	**Erkek (n=20)**	**p değeri**
Yaş (yıl)	28,55±3,03	30,60±6,61	36,15±5,26	26,30±3,37	*<0,0001**
Partner yaş (yıl)	31,80±3,69	33,60±6,39	38,75±5,90	30,85±4,41	*<0,0001**
VKİ (kg/m^2)	23,75±4,94	27,69±4,84	25,25±3,59	25,07±4,66	0,058
Partner VKİ (kg/m^2)	26,52±4,64	27,52±3,84	26,86±2,40	25,37±3,89	0,3
İnfertilite süresi (yıl)	4,40±2,04	5,92±3,62	6,85±5,39	4,70±4,00	0,1
Siklus sayısı (n)	1,30±0,57	1,40±0,60	1,40±0,75	1,20±0,52	0,6
Sperm parametreleri					
Konsantrasyon (10^6/mL)	48,69±40,37	61,08±42,50	59,65±30,04	6,65±14,25	*<0,0001**
Motilite (%A+B)	51,65±19,81	56,1±18,86	52,75±14,05	20,55±23,94	*<0,0001**
Bazal hormon değerleri					
FSH (mIU/mL)	7,27±1,75	6,84±1,52	9,27±3,02	7,02±2,58	*0,004**
LH (mIU/mL)	6,89±2,76	4,74±2,05	5,53±1,95	5,39±2,71	*0,044**
E2 (pg/ml)	47,30±23,29	43,15±14,98	46,23±27,41	40,87±17,98	0,7
PG (ng/ml)	0,75±0,60	0,92±1,01	0,60±0,32	0,87±0,55	0,4
TSH (uIU/mL)	2,18±0,92	1,97±0,99	2,53±1,65	2,30±0,97	0,6
PRL (ng/ml)	16,35±6,12	15,26±7,23	18,09±10,39	13,88±5,70	0,3
Alışkanlıklar					
Sigara (n, %)	2/20 (%10)	1/20 (%5)	4/20 (%20)	2/20 (%10)	0,4
Alkol (n, %)	0/20 (%0)	0/20 (%0)	1/20 (%5)	0/20 (%0)	0,3

PKOS: Polikistik over sendromu; DOR: Düşük overyan rezev; VKİ: Vücut kitle indeksi; A: İleri hızlı hareketli sperm yüzdesi; B: İleri yavaş hareketli sperm yüzdesi; FSH: Folikul stimulan hormon; LH: Luteinizan hormon; E2: Estradiol; TSH: Tiroid stimulan hormon; PRL: Prolaktin.

Yaş açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri< 0,0001; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri 0,003; açıklanamayan infertil grup ve erkek grubu arası p değeri 0,035; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

Eş yaşları açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri<0,0001; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri 0,015; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

Sperm konsantrasyonları açısından; PKOS ve erkek grubu arası p değeri 0,001; açıklanamayan infertil grup ve erkek grubu arası p değeri <0,0001; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

Sperm total motilitesi açısından; PKOS ve erkek grubu arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve erkek grubu arası p değeri <0,0001; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

FSH düzeyleri açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri 0,044; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri 0,008; DOR ve erkek grup arası p değeri 0,016.

LH düzeyleri açısından; PKOS ve açıklanamayan infertil grup arası p değeri 0,03.

4.2. Gruplar Arası Overyan Stimulasyon Özellikleri ve Embriyolojik Parametreler

Tüm hastalara pituiter supresyon için GnRH antagonisti ile kısa antagonist protokol uygulandı.

Hastaların %27,5' ine (22/80) r-FSH ile %72,5'ine (58/80) r-FSH+u-FSH kombinasyonu ile KOS protokolu uygulandı. PKOS grubunun %35'ine (7/20), açıklanamayan infertil grubun %35'ine (7/20), DOR grubunun %10'una (2/20) ve erkek grubunun %30'una (6/20) r-FSH ile; PKOS grubunun %65'ine (13/20), açıklanamayan infertil grubun %65'ine (13/20), DOR grubunun %90'ına (18/20) ve erkek grubunun %70'ine (14/20) r-FSH+u-FSH kombinasyonu ile KOS uygulandı. Verilen gonadotropin tipi açısından gruplar arası anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Ortalama r-FSH başlama dozu 256,09±56,36 IU, u-FSH başlama dozu 127,59±34,31 IU'dir. Ortalama r-FSH başlama dozu PKOS grubunda 240±57,58 IU, açıklanamayan infertil grupta 249,37±52,01 IU, DOR grubunda r-FSH 281,25±63,8 IU ve erkek grubunda 253,75±46,08 IU idi. Ortalama u-FSH başlama dozu PKOS grubunda 119,23±37,02 IU, açıklanamayan infertil grubta 115,38±38,92 IU, DOR grubunda 137,5±28,76 IU ve erkek grubunda 133,93±31,94 IU idi. Ortalama r-FSH ve u-FSH başlama dozları açısından gruplar arası istatiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (p>0,05).

OPU esnasında toplanan oosit sayıları; PKOS grubunda ortalama 18,45±5,11, açıklanamayan infertil grupta ortalama 10,15±5,17, DOR grubunda ortalama 3,05±1,67 ve erkek grubunda ortalama 11,65±4,84 idi. PKOS grubunda toplanan oosit sayısı, açıklanamayan infertil grup, DOR grubu ve erkek grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,0001$). DOR grubunda toplanan oosit sayıları ise PKOS grubu, açıklanamayan infertil grup ve erkek grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0,0001$).

Ortalama MII oosit sayıları açısından; PKOS grubu ortalama MII oosit sayısı (12,95±3,76) açıklanamayan infertil grup (7,95±4,2, $p<0,0001$), DOR grubu (2,55±1,64, $p<0,0001$) ve erkek grubu (8,85±4,2, $p=0,03$) ortalama MII oosit sayısında göre anlamlı düzeyde daha fazla idi. DOR grubu MII oosit sayıları ise PKOS grubu, açıklanamayan infertil grup ve erkek grubuna göre istatistiksel olarak daha düşüktü ($p<0,0001$).

PKOS grubu ortalama MI oosit sayısı (2,10±2,17), DOR grubuna (0,20±0,41, $p<0,0001$) göre anlamlı düzeyde yüksekti. Açıklanamayan infertil grubun MI oosit sayısı (1,55±1,32) da DOR grubuna göre (0,20±0,41, $p=0,02$) anlamlı düzeyde yüksekti. Erkek grubunun MI oosit sayısı 1,25±1,25 olup diğer 3 grupla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

GV oosit sayısıları açısından gruplar arası anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0,0001$). PKOS (1,95±1,76) grubunun; açıklanamayan infertil grup (0,55±0,69, $p=0,001$), DOR grubu (0,15±0,37, $p<0,0001$) ve erkek grubu (1,00±1,08, $p=0,048$)'na göre anlamlı düzeyde yüksek GV oosit sayısına sahip olduğu görüldü.

Gruplar arasında anomalili oosit sayısı açısından anlamlı fark bulundu ($p=0,016$), PKOS grubu ortalama anomalili oosit sayısı (0,60±1,35) ile açıklanamayan infertil grup (0) ve DOR grubu (0)'na göre anlamlı daha yüksek bulundu ($p=0,043$).

EZ olan oosit sayıları da gruplar arasında anlamlı farklı idi ($p=0,026$). EZ olan oosit sayıları açısından PKOS grubu (0,70±1,53) açıklanamayan infertil gruba (0) göre anlamlı olarak daha yüksek EZ oosit sayısına sahipti ($p=0,04$).

Çalışmaya katılan tüm hastaların MII oranları ortalama % 77,09±18,03 olup; PKOS grubu % 72,9±19,14, açıklanamayan infertil grup % 79,61±15,04, DOR grubu

% 81,11±21,44 ve erkek grubu % 75,16±16,4 düzeyinde MII oranlarına sahipti. Gruplar arasında MII oranı açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Tüm hastaların %26,3 (21/80)'ünde zayıf overyan cevap (toplam oosit sayısı<5) olduğu görüldü ve zayıf overyan cevap açısından gruplar arası anlamlı düzeyde fark saptandı (p<0,0001). PKOS grubunda zayıf overyan cevap izlenmedi (0/20 %0). Açıklanamayan infertil grupta %15 (3/20), DOR grubunda %85 (17/20) ve erkek grubunda %5 (1/20) oranında zayıf overyan cevap tespit edildi.

Çalışmaya katılan hastaların %76,7 (56/73)'sine tek embriyo transferi yapılırken, %23,3 (17/73)'üne iki embriyo transfer edildi. Verilen embriyo sayıları açısından gruplar arası anlamlı fark izlenmedi (p>0,05). PKOS grubunun %85 (17/20)'ine tek, %15 (3/20)'ine iki; açıklanamayan infertil grubun %75 (15/20)'ine tek, %25 (5/20)'ine iki; DOR grubunun %69,2 (9/13)'sine tek, %30,8 (4/13)'ine iki ve erkek grubunun %75 (15/20)'ine tek, %25 (5/20)'ine iki embriyo transfer edildi.

Tüm hastaların ortalama %11,3 (9/80)'ünde embriyo dondurma işlemi yapıldı. Embriyo dondurma açısından gruplar arası anlamlı düzeyde farklılık saptandı (p<0,0001). Bu farklılık özellikle PKOS [%40 (8/20)] grubundan kaynaklandı. Açıklanamayan infertil grup ve DOR grubunda embriyo dondurma işlemi yapılmayıp erkek grubunda sadece 1 hastanın [%5 (1/20)] embriyosu donduruldu.

OHSS, tüm hastaların %8,8 (7/80)'inde görülürken, PKOS grubunda %20 (4/20) açıklanamayan infertil grupta %5 (1/20), DOR grubunda %5 (1/20) ve erkek grubunda %5 (1/20) oranında OHSS geliştiği görüldü. Gruplara arası OHSS açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların embriyo transfer işlemi günü ortalama endometrial kalınlıkları 12,09±1,96 mm olup endometrial kalınlık açısından gruplar arası anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Grupların overyan stimulasyon özellikleri ve embriyolojik veriler Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Grupların overyan stimulasyon özellikleri ve embriyolojik veriler

	PKOS (n=20)	Açıklanamayan (n=20)	DOR (n=20)	Erkek (n=20)	p değeri
r-FSH (n, %)	7/20 (%35)	7/20 (%35)	2/20 (%10)	6/20 (%30)	0,2
r-FSH + u-FSH (n, %)	13/20(%65)	13/20(%65)	18/20 (%90)	14/20 (%70)	0,2
r-FSH başlama dozu (IU)	240,00±57,58	249,37±52,01	281,25±63,8	253,75±46,08	0,1
u-FSH başlama dozu (IU)	119,23±37,02	115,38±38,92	137,5±28,76	133,93±31,94	0,2
OPU parametreleri					
Toplam oosit sayısı (n)	18,45±5,11	10,15±5,17	3,05±1,67	11,65±4,84	*<0,0001**
MII (n)	12,95±3,76	7,95±4,2	2,55±1,64	8,85±4,2	*<0,0001**
MI (n)	2,10±2,17	1,55±1,32	0,20±0,41	1,25±1,25	*0,001**
GV (n)	1,95±1,76	0,55±0,69	0,15±0,37	1,00±1,08	*<0,0001**
Anomalili oosit(n)	0,60±1,35	0	0	0,05±0,22	*0,016**
Dejenere oosit (n)	0,15±0,67	0,05±0,22	0,05±0,22	0,40±0,99	0,2
EZ (n)	0,70±1,53	0	0,10±,310	0,10±,310	*0,026**
MII Oranı (%)	72,9±19,14	79,61±15,04	81,11±21,44	75,16±16,4	0,4
Poor (n, %)	0/20 (%0)	3/20 (%15)	17/20 (%85)	1/20 (%5)	*<0,0001**
Verilen embriyo sayısı					
SET (n, %)	17/20 (%85)	15/20 (%75)	9/13 (%69,2)	15/20 (%75)	0,7
DET (n, %)	3/20 (%15)	5/20 (%25)	4/13 (%30,8)	5/20 (%25)	
Freezing (n, %)	8/20 (%40)	0/20 (%0)	0/20(%0)	1/20 (%5)	*<0,0001**
OHSS (n, %)	4/20 (%20)	1/20 (%5)	1/20 (%5)	1/20 (%5)	0,2
EMK (mm)	12,37±1,97	11,6±1,64	11,69±1,84	12,55±2,28	0,3

PKOS: Polikistik over sendromu; DOR: Düşük overyan rezerv; r-FSH: Rekombinan folikul stimulan hormon; u-FSH: Uriner folikul stimulan hormon; OPU: Oosit pick-up; MII: Metafaz II; MI: Metafaz I; GV: Germinal vezikül; EZ: Empty zona; SET: Single embriyo transfer; DET: Diembriyo transfer; OHSS: Overyan hiperstimulasyon sendromu: EMK: Endometrial kalınlık.

Toplam oosit sayıları açısından; PKOS ve açıklanamayan infertil grup arası p değeri <0,0001; PKOS ve DOR grubu arası p değeri <0,0001; PKOS ve erkek grubu arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri <0,0001; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

MII oosit sayıları açısından; PKOS ve açıklanamayan infertil grup arası p değeri <0,0001; PKOS ve DOR grubu arası p değeri <0,0001; PKOS ve erkek grubu arası p değeri 0,03; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri <0,0001; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

MI oosit sayıları açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri 0,02.

GV oosit sayıları açısından; PKOS ve açıklanamayan infertil grup arası p değeri 0,001; PKOS ve DOR grubu arası p değeri <0,0001; PKOS ve erkek grubu arası p değeri 0,048.

Anomali oosit sayıları açısından; PKOS ve açıklanamayan infertil grup arası p değeri 0,043; PKOS ve DOR grubu arası p değeri 0,043

EZ oosit sayıları açısından; PKOS ve açıklanamayan infertil grup arası p değeri 0,04.

4.3. Gruplar Arası İn Vitro Fertilizasyon Siklusu Başarısının Karşılaştırılması

İVF başarısı açısından gruplar arasında fertilizasyon, FO, oluşan embriyo sayısı, embriyo kalitesi, gebelik, klinik gebelik ve eve bebek götürme oranlarına bakıldı.

Çalışmaya katılan hastaların %93,6 (73/80)'ında fertilizasyon olup fertilizasyon açısından gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık saptandı (p<0,0001). DOR grubunun %72,2 (13/20)'inde fertilizasyon gerçekleşirken; PKOS grubu [%100 (20/20)], açıklanamayan infertil grup [%100 (20/20)] ve erkek grubuna [%100 (20/20)] oranla DOR grubunda anlamlı düzeyde düşük fertilizasyon saptandı (p<0,0001).

Fertilizasyon oranları açısından; PKOS grubu (%46,71±22,21), açıklanamayan infertil grup (%56,74±22,21), DOR grubu (%49,81±39) ve erkek grubu (%51,28±27,34) arasında anlamlı fark izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların oluşan embriyo sayısı ortalama 4,05±3,04 olup oluşan embriyo sayısı açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptandı (p<0,0001). DOR grubunda oluşan embriyo sayısı ortalama 1,50±1,34 olup DOR grubu ortalama embriyo sayısı PKOS grubu (5,85±2,89, p<0,0001), açıklanamayan infertil grup

(4,65±3,67, p=0,003) ve erkek grubu (3,95±1,99, p=0,03)'na oranla anlamlı düzeyde düşüktü.

PKOS grubunun %85 (17/20)'i Grade I, %15 (3/20)'i Grade II; açıklanamayan infertil grubun %80 (16/20)'i Grade I, %20 (4/20)'si Grade II; DOR grubunun %84,6 (11/13)'sı Grade I, %15,4 (2/13)'ü Grade II ve erkek grubunun %80 (16/20)'i Grade I, %20 (4/20)'si Grade II embriyolara sahipti. Embriyo kalitesi açısından gruplar arası anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

PKOS grubunun %35 (7/20)'inde, açıklanamayan infertil grubun %15 (3/20)'inde, DOR grubunun %30,8 (4/13)'inde ve erkek grubunun %30 (6/20)'unda gebelik elde edildi. Gruplar arasında gebelik elde edilmesi açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

PKOS grubunun %30 (6/20)'unda, açıklanamayan infertil grubun %15 (3/20)'inde, DOR grubunun %23,1 (3/13)'inde ve erkek grubunun %25 (5/20)'inde klinik gebelik gerçekleşmiş olup gruplar arasında klinik gebelik açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların %20,5 (15/73)'i canlı doğum yaparak eve bebek götürmüştür. PKOS grubunun %25 (5/20)'inde, açıklanamayan infertil grubun %15 (3/20)'inde, DOR grubunun %23,1 (3/13)'inde ve erkek grubunun %20 (4/20)'sinde canlı doğum gerçekleşmiştir. Gruplar arası eve bebek götürme sayıları açısından anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (p>0,05).

Gruplar arası İVF başarısı göstergeleri Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. Gruplar arası İVF başarısı göstergeleri

	PKOS (n=20)	**Açıklanamayan (n=20)**	**DOR (n=20)**	**Erkek (n=20)**	**p değeri**
Fertilizasyon (n, %)	20/20 (%100)	20/20 (%100)	13/20 (%72,2)	20/20 (%100)	*<0,0001**
Fertilizasyon oranı (%)	46,71±22,21	56,74±22,21	49,81±39,00	51,28±27,34	0,7
Oluşan embriyo sayısı (n)	5,85±2,89	4,65±3,67	1,50±1,34	3,95±1,99	*<0,0001**
Embriyo Kalite **Grade I (n, %)** **Grade II (n, %)**	 17/20 (%85) 3/20 (%15)	 16/20 (%80) 4/20 (%20)	 11/13 (%84,6) 2/13 (%15,4)	 16/20 (%80) 4/20 (%20)	 0,9
Gebelik (n, %)	7/20 (%35)	3/20 (%15)	4/13 (%30,8)	6/20 (%30)	0,5
Klinik gebelik (n, %)	6/20 (%30)	3/20 (%15)	3/13 (%23,1)	5/20 (%25)	0,7
Eve bebek götürme (n, %)	5/20 (%25)	3/20 (%15)	3/13 (%23,1)	4/20 (%20)	0,8

PKOS: Polikistik over sendromu; DOR: Düşük overyan rezerv.

Fertilizasyon açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri <0,0001; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

Oluşan embriyo sayıları açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri 0,003; DOR ve erkek grup arası p değeri 0,03.

4.4. Araştırılan Parametrelerin Gruplar Arası Serum Seviyeleri

Çalışmaya katılan hastaların serum vitamin B12 düzeyleri ortalama 308,21±95,32 pg/mL olup; PKOS grubunda 308,82±87,7 pg/mL, açıklanamayan infertil grupta 301,22±80,33 pg/mL, DOR grubunda 329,12±121,06 pg/mL ve erkek grubunda 293,70±90,40 pg/mL düzeyinde vitamin B12 bulundu. Gruplar arasında serum vitamin B12 düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

Çalışmaya katılan hastaların serum folik asit düzeyleri ortalama 10,38±4,78 ng/mL olup; PKOS grubunda 8,94±3,41 ng/mL, açıklanamayan infertil grupta 10,74±5,75 ng/mL, DOR grubunda 12,82±4,95 ng/mL ve erkek grubunda 8,93±3,82 ng/mL düzeyinde folik asit bulundu. Gruplar arasında serum folik asit düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlendi ($p=0,028$). DOR grubu serum folik asit düzeyleri PKOS grubuna ($p=0,01$) ve erkek grubuna ($p=0,009$) göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Çalışmaya katılan hastaların serum homosistein düzeyleri ortalama 37,69±21,94 nmol/ml olup; gruplar arası serum homosistein düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlendi ($p<0,0001$). PKOS grubunda 19,88±15,64 nmol/ml, açıklanamayan infertil grupta 32,62±19,38 nmol/ml, DOR grubunda 41,58±20,50 nmol/ml ve erkek grubunda 55,77±15,65 nmol/ml düzeyinde serum homosisteini bulundu. PKOS grubunda DOR grubuna ($p=0,002$) ve erkek grubuna ($p<0,0001$) göre anlamlı düzeyde daha düşük serum homosistein düzeyleri saptandı. Açıklanamayan infertil grup serum homosistein düzeyleri de erkek grubu serum homosistein düzeyinden anlamlı oranda düşük ölçüldü ($p=0,001$).

Çalışmaya katılan hastaların serum D vitamini düzeyleri ortalama 15,84±9,97 ng/mL olup; PKOS grubunda 15,04±8,72 ng/mL, açıklanamayan infertil grupta 14,24±8,42 ng/mL, DOR grubunda 20,37±14,24 ng/mL ve erkek grubunda 13,67±4,62 ng/mL düzeyinde D vitamini bulundu. Gruplar arasında serum D vitamini düzeyleri homojen olarak dağılmıştı ($p>0,05$).

Çalışmaya katılan hastaların serum kalsiyum düzeyleri ortalama 8,77±0,66 ng/mL olup; PKOS grubunda 8,52±0,87 ng/mL, açıklanamayan infertil grupta 8,87±0,64 ng/mL, DOR grubunda 8,77±0,66 ng/mL ve erkek grubunda 8,92±0,39

ng/mL düzeyinde serum kalsiyumu bulundu. Gruplar arasında serum kalsiyum düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların serum ferritin düzeyleri ortalama 25,21±24,29 ng/mL olup; PKOS grubunda 22,81±21,15 ng/mL, açıklanamayan infertil grupta 24,83±17,39 ng/mL, DOR grubunda 21,95±26,53 ng/mL ve erkek grubunda 31,11±30,63 ng/mL düzeyinde serum ferritini bulundu. Gruplar arasında serum ferritin düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların serum demir düzeyleri ortalama 54,58±31,75 µgr/dL olup; PKOS grubunda 54,76±29,92 µgr/dL, açıklanamayan infertil grupta 63,08±36,84 µgr/dL, DOR grubunda 46,61±33,08 µgr/dL ve erkek grubunda 53,89±26,34 µgr/dL düzeyinde serum demiri bulundu. Gruplar arasında serum demir düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Tüm hastaların serum TAS düzeyleri ortalaması 1,14±0,14 µmol Trolox Eq/L ‘dir. PKOS grubunda 1,09±0,16 µmol Trolox Eq/L, açıklanamayan infertil grupta 1,16±0,15 µmol Trolox Eq/L, DOR grubunda 1,15±0,15 µmol Trolox Eq/L ve erkek grubunda 1,16±0,10 µmol Trolox Eq/L düzeyinde serum TAS ölçümü yapıldı. Gruplar arasında serum TAS düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Tüm hastaların serum TOS düzeyleri ortalaması 7,38±7,06 µmol H2O2 Eq/L’dir. PKOS grubunda 8,24±10,80 µmol H2O2 Eq/L, açıklanamayan infertil grupta 9,63±6,16 µmol H2O2 Eq/L, DOR grubunda 6,17±5,15 µmol H2O2 Eq/L ve erkek grubunda 5,51±4,27 µmol H2O2 Eq/L düzeyinde serum TOS ölçümü yapıldı. Gruplar arasında serum TOS düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların serumda ölçülen TAS ve TOS değerleri kullanılarak hesaplanan oksidatif stres indeksi ortalama 635,81±585,65 olup; PKOS grubunda 731,87±916,75, açıklanamayan infertil grupta 821,63±502,06, DOR grubunda 522,89±378,28 ve erkek grubunda 471,64±359,63 serum OSİ bulundu. Gruplar arasında serum OSİ açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Araştırılan parametrelerin gruplar arası serum düzeyleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Araştırılan parametrelerin gruplar arası serum seviyeleri

	PKOS (n=20)	Açıklanamayan (n=20)	DOR (n=20)	Erkek (n=20)	p değeri
B12 (pg/mL)	308,82±87,7	301,22±80,33	329,12±121,06	293,70±90,40	0,6
Folik asit (ng/mL)	8,94±3,41	10,74±5,75	12,82±4,95	8,93±3,82	*0,028**
Homosistein (nmol/ml)	19,88±15,64	32,62±19,38	41,58±20,50	55,77±15,65	*<0,0001**
D Vitamini (ng/mL)	15,04±8,72	14,24±8,42	20,37±14,24	13,67±4,62	0,1
Kalsiyum(mg/dL)	8,52±0,87	8,87±0,64	8,77±0,66	8,92±0,39	0,2
Ferritin(ng/mL)	22,81±21,15	24,83±17,39	21,95±26,53	31,11±30,63	0,6
Demir (µgr/dL)	54,76±29,92	63,08±36,84	46,61±33,08	53,89±26,34	0,4
TAS(µmol Trolox Eq/L)	1,09±0,16	1,16±0,15	1,15±0,15	1,16±0,10	0,3
TOS (µmol H2O2 Eq/L)	8,24±10,80	9,63±6,16	6,17±5,15	5,51±4,27	0,2
OSİ (arbitrary unit)	731,87±916,75	821,63±502,06	522,89±378,28	471,64±359,63	0,1

PKOS: Polikistik over sendromu; DOR: Düşük overyan rezerv; TAS: Total antioksidan status; TOS: Total oksidan status; OSİ: Oksidatif stres indeksi.

Serum folik asit düzeyleri açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri 0,01; DOR ve erkek grup arası p değeri 0,009.

Serum homosistein düzeyleri açısından PKOS ve erkek grubu arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve erkek grubu arası p değeri 0,001; DOR ve PKOS grubu arası p değeri 0,002.

4.5. Araştırılan Parametrelerin Gruplar Arası Folikuler Sıvı Seviyeleri

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı vitamin B12 düzeyleri ortalama 570,57±135,77 pg/mL olup; PKOS grubunda 511,88±120,6 pg/mL, açıklanamayan infertil grupta 595,23±142,13 pg/mL, DOR grubunda 568,27±166,08 pg/mL ve erkek grubunda 606,92±93,05 pg/mL düzeyinde vitamin B12 bulundu. Gruplar arasında folikuler sıvı vitamin B12 düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı folik asit düzeyleri ortalama 17,13±4,19 ng/mL olup; PKOS grubunda 15,97±4,10 ng/mL, açıklanamayan infertil grupta 17,33±4,28 ng/mL, DOR grubunda 17,42±4,18 ng/mL ve erkek grubunda 17,81±4,29 ng/mL düzeyinde folikuler sıvı folik asiti bulundu. Gruplar arasında folikuler sıvı folik asit düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı homosistein düzeyleri ortalama 30,93±27,05 nmol/ml olup; gruplar arası folikuler sıvı homosistein düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlendi ($p<0,0001$). PKOS grubunda 12,06±15,47 nmol/ml, açıklanamayan infertil grupta 12,34±7,07 nmol/ml, DOR grubunda 33,52±20,76 nmol/ml ve erkek grubunda 65,81±17,18 nmol/ml düzeyinde folikuler sıvı homosisteini bulundu. PKOS grubunda DOR grubuna ($p<0,0001$) ve erkek grubuna ($p<0,0001$) göre anlamlı düzeyde daha düşük folikuler sıvı homosistein düzeyleri saptandı. Açıklanamayan infertil grup folikuler sıvı homosistein düzeyleri ise DOR grubu ($p<0,0001$) ve erkek grubu ($p<0,0001$) folikuler sıvı homosistein düzeyinden anlamlı olarak düşük ölçüldü. DOR grubunun folikuler sıvı homosistein düzeyleri de erkek grubu folikuler sıvı homosistein düzeyinden anlamlı olarak düşük ölçüldü ($p<0,0001$).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı D vitamini düzeyleri ortalama 25,14±10,91 ng/mL olup; PKOS grubunda 22,92±10,33 ng/mL, açıklanamayan infertil grupta 25,74±9,72 ng/mL, DOR grubunda 28,32±15,66 ng/mL ve erkek grubunda 23,57±5,41ng/mL düzeyinde D vitamini bulundu. Gruplar arasında folikuler sıvı D vitamini düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı kalsiyum düzeyleri ortalama 8,51±0,92 ng/mL olup; PKOS grubunda 8,48±0,65 ng/mL, açıklanamayan infertil

grupta 8,76±1,35 ng/mL, DOR grubunda 8,24±0,93 ng/mL ve erkek grubunda 8,56±0,52 ng/mL düzeyinde folikuler sıvı kalsiyumu bulundu. Gruplar arasında folikuler sıvı kalsiyum düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı ferritin düzeyleri ortalama 49,10±63,80 ng/mL olup; PKOS grubunda 45,84±58,80 ng/mL, açıklanamayan infertil grupta 64,42±70,87 ng/mL, DOR grubunda 29,72±18,85 ng/mL ve erkek grubunda 56,45±85,91 ng/mL düzeyinde folikuler sıvı ferritini bulundu. Gruplar arasında folikuler sıvı ferritin düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı demir düzeyleri ortalama 42,15±21,64 µgr/dL olup; PKOS grubunda 37,81±19,56 µgr/dL, açıklanamayan infertil grupta 50,94±26,19 µgr/dL, DOR grubunda 32,62±17,46 µgr/dL ve erkek grubunda 47,23±18,73 µgr/dL düzeyinde folikuler sıvı demiri bulundu. Gruplar arasında folikuler sıvı demir düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlendi (p=0,025). Açıklanamayan infertil grubun folikuler sıvı demir düzeyleri DOR grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı (p=0,04).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı TAS düzeyleri ortalaması 1,01±0,19 µmol Trolox Eq/L idi. PKOS grubunda 0,99±0,18 µmol Trolox Eq/L, açıklanamayan infertil grupta 1,02±0,27 µmol Trolox Eq/L, DOR grubunda 0,97±0,16 µmol Trolox Eq/L ve erkek grubunda 1,03±0,11 µmol Trolox Eq/L düzeyinde folikuler sıvı TAS ölçümü yapıldı. Gruplar arasında folikuler sıvı TAS düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvı TOS düzeyleri ortalaması 7,85±5,04 µmol H2O2 Eq/L'dir. PKOS grubunda 8,49±3,94 µmol H2O2 Eq/L, açıklanamayan infertil grupta 10,14±6,69 µmol H2O2 Eq/L, DOR grubunda 6,25±4,76 µmol H2O2 Eq/L ve erkek grubunda 6,54±3,52 µmol H2O2 Eq/L düzeyinde folikuler sıvı TOS ölçümü yapıldı. Gruplar arasında folikuler sıvı TOS düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlendi (p=0,047). Açıklanamayan infertil grubun folikuler sıvı TOS düzeyleri DOR grubuna (p=0,01) ve erkek grubuna (p=0,02) göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı.

Çalışmaya katılan hastaların folikuler sıvısında ölçülen TAS ve TOS değerleri kullanılarak hesaplanan oksidatif stres indeksi ortalama 758,13±425,38 olup; PKOS

grubunda 843,48±355,14, açıklanamayan infertil grupta 948,24±504,34, DOR grubunda 612,23±420,30 ve erkek grubunda 628,56±330,83 düzeyinde folikuler sıvı OSİ bulundu. Gruplar arasında folikuler sıvı OSİ açısından anlamlı farklılık izlendi (p=0,026). Açıklanamayan infertil grubun folikuler sıvı OSİ düzeyleri DOR grubuna (p=0,01) ve erkek grubuna (p=0,01) göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı.

Araştırılan parametrelerin gruplar arası folikuler sıvı düzeyleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Araştırılan parametrelerin gruplar arası folikuler sıvı seviyeleri

	PKOS (n=20)	Açıklanamayan (n=20)	DOR (n=20)	Erkek (n=20)	p değeri
B12 (pg/mL)	511,88±120,6	595,23±142,13	568,27±166,08	606,92±93,05	0,1
Folik asit (ng/mL)	15,97±4,10	17,33±4,28	17,42±4,18	17,81±4,29	0,5
Homosistein(nmol/ml)	12,06±15,47	12,34±7,07	33,52±20,76	65,81±17,18	*<0,0001**
D Vitamini (ng/mL)	22,92±10,33	25,74±9,72	28,32±15,66	23,57±5,41	0,3
Kalsiyum (mg/dL)	8,48±0,65	8,76±1,35	8,24±0,93	8,56±0,52	0,3
Ferritin (ng/mL)	45,84±58,80	64,42±70,87	29,72±18,85	56,45±85,91	0,3
Demir (µgr/dL)	37,81±19,56	50,94±26,19	32,62±17,46	47,23±18,73	*0,025**
TAS(µmol Trolox Eq/L)	0,99±0,18	1,02±0,27	0,97±0,16	1,03±0,11	0,6
TOS(µmol H2O2 Eq/L)	8,49±3,94	10,14±6,69	6,25±4,76	6,54±3,52	*0,047**
OSİ (arbitrary unit)	843,48±355,14	948,24±504,34	612,23±420,30	628,56±330,83	*0,026**

PKOS: Polikistik over sendromu; DOR: Düşük overyan rezev; TAS: Total antioksidan status; TOS: Total oksidan status; OSİ: Oksidatif stres indeksi.

Folikul sıvısı demir düzeyleri açısından; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri <0,04;

Folikul sıvısı TOS düzeyleri açısından; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri 0,01; açıklanamayan infertil grup ve erkek grubu arası p değeri 0,02.

Folikul sıvısı OSİ açısından; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri 0,01; açıklanamayan infertil grup ve erkek grubu arası p değeri 0,01.

Folikul sıvısı homosistein düzeyleri açısından; PKOS ve DOR grubu arası p değeri <0,0001; PKOS ve erkek grubu arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve DOR arası p değeri <0,0001; açıklanamayan infertil grup ve erkek grubu arası p değeri <0,0001; DOR ve erkek grup arası p değeri <0,0001.

4.6. Gebe Kalan ve Kalmayan Grup Arası Temel Özelliklerinin, İVF Verilerinin ve Araştırılan Parametrelerin Karşılaştırılması

Çalışmada hastaların 20'si gebe kalmış (n=20) ve 53'ü ise gebe kalmamış (n=53) olup; gebe kalan grupta yaş ortalaması 28,70±3,76 yıl, gebe kalmayan grupta yaş ortalaması 30,04±5,95 yıldır. İki grup arasında yaş açısından anlamlı farklılık bulunmadı (p>0,05).Her iki grubun partner yaşları sırasıyla 32,00±3,96 yıl ve 33,70±6,31 yıl olup partner yaşları da gruplar arası anlamlı farklılık göstermedi (p>0,05).

Hastaların VKİ'leri gebelik oluşan grupta 25,11±4,73 kg/m^2 ve gebelik oluşmayan grupta 25,49±4,92 kg/m^2 olup, VKİ'leri gruplar arası anlamlı farklılık göstermedi (p>0,05).

İnfertilte süreleri gebe kalan grupta 4,85±3,90 yıl ve gebe kalmayan grupta 5,54±3,81yıldır. İVF siklus sayıları sırasıyla 1,40±0,60 ve 1,30±0,61 idi. Gruplar arası infertilite süresi ve siklus sayıları bakımından anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05).

Gebe kalan gruba ortalama 236,25±50,31 IU r-FSH ve kalmayan gruba ortalama 260,61±57,35 IU r-FSH başlanmış; u-FSH ise sırasıyla 121,43±36,50 IU ve 125,68±35,59 IU olarak başlanmıştır. Verilen gonadotropin dozları gebe kalan ve kalmayan grupta anlamlı farklılık göstermedi (p>0,05).

Embriyolojik verilere bakıldığında; gebe kalan grupta total oosit sayısı 6,61±13,50 ve gebe kalmayan grupta 11,04±6,66 idi. MII oosit gebe kalan grupta 10,15±5,54 adet, kalmayan grupta 8,21±4,55 adet olup MII oranları sırasıyla % 74,04±15,20 ve % 78,44±18,52 olarak belirlendi. Fertilizasyon gerçekleşme oranları gebe kalan grupta %55,57±27,83 ve gebe kalmayan grupta % 54,34±24,47 olup embriyo sayıları sırasıyla 4,85±2,87 ve 4,13±2,97 idi. Her iki grupta tüm embriyolojik parametreler için anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (p>0,05). Gebe kalan grubun %75 (15/20)' ine tek embriyo transferi; %25 (5/20)' ine iki embriyo transferi yapıldı. Gebe kalmayan grubun ise %77,4 (41/53)' üne tek embriyo transferi; %22,6 (12/53)' sına iki embriyo transferi yapıldı. Gruplar arası verilen embriyo sayıları açısından anlamlı fark bulunmadı (p=0,83). Oluşan embriyoların transfer edileceği gün ölçülen endometrial kalınlıkları gebe kalan grupta 11,67±1,14 mm ve gebe kalmayan grupta

12,24±2,18 mm olup gruplar arası verilen embriyo sayısı ve endometrial kalınlık açısından farklılık saptanmadı (p>0,05).

Hastaların partner semen analizlerine bakıldığında gebe kalan grupta sperm konsantrasyonu 37,81±33,27 10^6/mL ve progresif motilite % 41,65±26,78; gebe kalmayan grupta sperm konsantrasyonu 44,60±42,59 10^6/mL ve progresif motilite % 45,66±23,51'dir. Gruplar arasında sperm parametreleri anlamlı farklılık göstermedi (p>0,05).

Hastaların bazal hormon değerleri karşılaştırıldığında; gebe kalan grupta; FSH düzeyleri 7,15±2,22 mIU/mL, LH düzeyi 5,93±2,56 mIU/mL, E2 düzeyi 45,45±14,64 pg/ml ve PG düzeyi 0,87±0,64 ng/ml olarak bulundu. Gebe kalmayan grupta ise; FSH düzeyleri 7,49±2,22 mIU/mL, LH düzeyi 5,68±2,56 mIU/mL, E2 düzeyi 42,94±22,21 pg/ml ve PG düzeyi 0,77±0,71 ng/ml olarak bulundu. Bazal hormon değerleri gebe kalan ve kalmayan grupta anlamlı farklılık göstermedi (p>0,05).

TSH düzeylerine bakıldığında; gebe kalan grupta (2,73±1,40 uIU/mL) TSH düzeylerinin gebe kalmayan gruba (2,09±0,99 uIU/mL) göre benzer olduğu saptandı (p=0,6). PRL düzeyleri ise gebe kalan (15,88±6,61 ng/ml) ve gebe kalmayan (15,28±6,14 ng/ml) grupta farklılık göstermedi (p>0,05).

Gruplar arası hastaların alışkanlık durumuna baktığımızda; gebe kalan grupta sigara kullanım oranı %5 (1/20) olup alkol kullanımı yoktu. Gebe kalmayan grupta sigara kullanım oranı %9,4 (5/53) ve alkol kullanım oranı ise %1,9 (1/53) olup; gruplar arası sigara ve alkol kullanımı anlamlı farklı değildi (p=0,53).

Çalışmamızda araştırdığımız parametrelerin serum düzeyleri gebe kalan ve kalmayan gruplar arası karşılaştırıldığında; vitamin B12 düzeyleri gebe kalan grupta 328,28±105,65 pg/mL ve gebe kalmayan grupta 296,61±86,44 pg/mL; folik asit düzeyleri gebe kalan grupta 11,37±4,33 ng/mL, gebe kalmayan grupta 9,85±4,66 ng/mL; homosistein düzeyleri gebe kalan grupta 34,95±26,07 nmol/ml, gebe kalmayan grupta 38,83±19,87 nmol/ml; vitamin D düzeyleri gebe kalan grupta 15,47±6,94 ng/mL, gebe kalmayan grupta 15,85±11,24 ng/mL; kalsiyum düzeyleri gebe kalan grupta 8,79±0,69 mg/dL, gebe kalmayan grupta 8,79±0,63 mg/dL; ferritin düzeyleri gebe kalan grupta 30,93±30,48 ng/mL, gebe kalmayan grupta 23,41±22,51 ng/mL; demir düzeyleri gebe kalan grupta 54,77±27,65 µgr/dL, gebe kalmayan grupta

54,43±32,06 µgr/dL; TAS düzeyleri gebe kalan grupta 1,14±0,13 µmol Trolox Eq/L, gebe kalmayan grupta 1,14±0,14 µmol Trolox Eq/L; TOS düzeyleri gebe kalan grupta 7,17±10,58 µmol H2O2 Eq/L, gebe kalmayan grupta 7,55±5,79 µmol H2O2 Eq/L; OSİ gebe kalan grupta 627,86±895,47, gebe kalmayan grupta 646,47±471,14 olarak ölçülmüştür. Her iki grup arasında serumda çalışılan parametreler açısından anlamlı düzeyde farklılık görülmedi (p>0,05).

Araştırılan parametrelerin folikul sıvısı düzeyleri gebe kalan ve kalmayan gruplar arası karşılaştırıldığında; vitamin B12 düzeyleri gebe kalan grupta 598,75±151,78 pg/mL ve gebe kalmayan grupta 554,97±132,10 pg/mL; folik asit düzeyleri gebe kalan grupta 18,51±2,79 ng/mL, gebe kalmayan grupta 16,66±4,56 ng/mL; homosistein düzeyleri gebe kalan grupta 31,87±28,35 nmol/ml, gebe kalmayan grupta 29,01±27,16 nmol/ml; vitamin D düzeyleri gebe kalan grupta 27,58±10,42 ng/mL, gebe kalmayan grupta 15,85±11,24 ng/mL; kalsiyum düzeyleri gebe kalan grupta 8,64±1,29 mg/dL, gebe kalmayan grupta 8,79±0,63 mg/dL; ferritin düzeyleri gebe kalan grupta 44,95±35,88 ng/mL, gebe kalmayan grupta 53,19±74,88 ng/mL; demir düzeyleri gebe kalan grupta 47,70±24,36 µgr/dL, gebe kalmayan grupta 41,02±20,73 µgr/dL; TAS düzeyleri gebe kalan grupta 1,06±0,16 µmol Trolox Eq/L, gebe kalmayan grupta 0,99±0,19 µmol Trolox Eq/L; TOS düzeyleri gebe kalan grupta 8,83±4,52 µmol H2O2 Eq/L, gebe kalmayan grupta 7,90 ±5,31µmol H2O2 Eq/L; OSİ gebe kalan grupta 811,45±348,45, gebe kalmayan grupta 775,46±454,27 olarak ölçülmüştür. Her iki grup arasında folikul sıvısında çalışılan parametreler açısından anlamlı düzeyde farklılık görülmedi (p>0,05).

Gebe kalan ve kalmayan gruplar arası ilgili veriler Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Gebe kalan ve kalmayan grubun temel özelliklerinin, İVF verilerinin ve araştırılan parametrelerin karşılaştırılması.

	Gebe kalan grup (n=20)	**Gebe kalmayan grup (n=53)**	**p değeri**
Yaş (yıl)	28,70±3,76	30,04±5,95	0,3
Eş yaş (yıl)	32,00±3,96	33,70±6,31	0,2
VKİ (kg/m^2)	25,11±4,73	25,49±4,92	0,7
İnfertilite süresi (yıl)	4,85±3,90	5,54±3,81	0,4
Siklus sayısı (n)	1,40±0,60	1,30±0,61	0,5
r-FSH dozu (IU)	236,25±50,31	260,61±57,35	0,09
u-FSH dozu (IU)	121,43±36,50	125,68±35,59	0,7
Embriyolojik veriler			
Total oosit sayısı (n)	6,61±13,50	11,04±6,66	0,1
MII oosit (n)	10,15±5,54	8,21±4,55	0,1
MII oranı (%)	74,04±15,20	78,44±18,52	0,3
FO (%)	55,57±27,83	54,34±24,47	0,8
Oluşan embriyo sayısı (n)	4,85±2,87	4,13±2,97	0,3
Verilen embriyo sayısı			
SET (n, %)	15/20 (%75)	41/53 (%77.4)	0,83
DET (n, %)	5/20 (%25)	12/53 (%22.6)	
EMK (mm)	11,67±1,14	12,24±2,18	0,2
Sperm parametreleri			
Konsantrasyon (10^6/mL)	37,81±33,27	44,60±42,59	0,5
Motilite (%A+B)	41,65±26,78	45,66±23,51	0,5
Bazal hormon değerleri			
FSH (mIU/mL)	7,15±2,22	7,49±2,22	0,5
LH (mIU/mL)	5,93±2,56	5,68±2,56	0,7
E2 (pg/ml)	45,45±14,64	42,94±22,21	0,6
PG (ng/ml)	0,87±0,64	0,77±0,71	0,5
TSH (uIU/mL)	2,73±1,40	2,09±0,99	0,6
PRL (ng/ml)	15,88±6,61	15,28±6,14	0,7
Alışkanlıklar			
Sigara (n, %)	1/20 (%5)	5/53 (%9.4)	0,53
Alkol (n, %)	0/20	1/53 (%1.9)	0,53
Araştırılan parametrelerin serum düzeyleri			
B12 (pg/mL)	328,28±105,65	296,61±86,44	0,1
Folik asit (ng/mL)	11,37±4,33	9,85±4,66	0,2
Homosistein (nmol/ml)	34,95±26,07	38,83±19,87	0,4
D Vitamini (ng/mL)	15,47±6,94	15,85±11,24	0,8
Kalsiyum (mg/dL)	8,79±0,69	8,79±0,63	0,9
Ferritin (ng/mL)	30,93±30,48	23,41±22,51	0,2
Demir (µgr/dL)	54,77±27,65	54,43±32,06	0,9
TAS(µmol Trolox Eq/L)	1,14±0,13	1,14±0,14	0,9

TOS(µmol H2O2 Eq/L)	7,17±10,58	7,55±5,79	0,8
OSİ (arbitrary unit)	627,86±895,47	646,47±471,14	0,9
Parametrelerin FS düzeyleri			
B12 (pg/mL)	598,75±151,78	554,97±132,10	0,2
Folik asit (ng/mL)	18,51±2,79	16,66±4,56	0,09
Homosistein (nmol/ml)	31,87±28,35	29,01±27,16	0,6
D Vitamini (ng/mL)	27,58±10,42	15,85±11,24	0,2
Kalsiyum (mg/dL)	8,64±1,29	8,51±0,74	0,5
Ferritin (ng/mL)	44,95±35,88	53,19±74,88	0,6
Demir (µgr/dL)	47,70±24,36	41,02±20,73	0,2
TAS(µmol Trolox Eq/L)	1,06±0,16	0,99±0,19	0,1
TOS(µmol H2O2 Eq/L)	8,83±4,52	7,90 ±5,31	0,4
OSİ (arbitrary unit)	811,45±348,45	775,46±454,27	0,7

VKİ: Vücut kitle indeksi; r-FSH: Rekombinan folikul stimulan hormon; u-FSH: Uriner folikul stimulan hormon; MII: Metafaz II; FO: Fertilizasyon oranı; SET: Single embriyo transfer; DET: Diembriyo transfer; EMK: Endometrial kalınlık; A: İleri hızlı hareketli sperm yüzdesi; B: İleri yavaş hareketli sperm yüzdesi; FSH: Folikul stimulan hormon; LH: Luteinizan hormon; E2: Estradiol; TSH: Tiroid stimulan hormon; PRL: Prolaktin; TAS: Total antioksidan status; TOS: Total oksidan status; OSİ: Oksidatif stres indeksi.

4.7. Araştırılan Parametrelerin Serum Değerleri ile Bazal Karakteristik Özellikler ve Embriyolojik Parametreler ile Korelasyonu

Hastaların serum vitamin B12, ferritin ve demir düzeyleri ile bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05). Serum folik asit düzeyleri ile yaş arasında pozitif bir korelasyon (r=0,3, p=0,07) mevcut, fakat diğer parametrelerle folik asit düzeyleri arasında herhangi bir ilişki mevcut değildi (p>0,05). Serum homosistein düzeyleri ile oosit sayısı arasında negatif bir korelasyon saptandı (r= -0,29, p=0,008). Homosistein ile embriyo sayıları arasında da negatif zayıf bir ilişki bulundu (r= -0,23, p=0,03). Serum D vitamini düzeyleri ile hastaların yaşı arasında pozitif zayıf bir ilişki mevcuttu (r=0,23, p=0,03). D vitamini, yaş dışındaki diğer parametrelerle anlamlı bir korelasyon göstermedi (p>0,05). Serum kalsiyum düzeyleri ile VKİ ve fertilizasyon oranı arasında pozitif zayıf bir ilişki saptandı (r=0,26, p=0,02). Kalsiyumun diğer parametrelerle arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı (p>0,05). Serum TAS düzeyleri ile VKİ arasında pozitif bir ilişki (r=0,29, p=0,008) olup diğer parametrelerle anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05). Serum TOS düzeyleri sadece embriyo sayıları ile zayıf pozitif

bir korelasyona sahipti (r=0,23, p=0,03). Serum OSİ de sadece embriyo sayıları ile zayıf pozitif bir korelasyona sahipti (r=0,27, p=0,01).

Serumda ölçülen parametrelerin bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler ile korelasyonu Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Araştırılan parametrelerin serum değerleri ile bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler ile korelasyonu.

		Yaş	VKİ	Oosit	MII	MII oranı	Anomalili oosit	Dejenere oosit	EZ	FO	Embryo
B12	**r**	0,12	-0,18	-0,14	-0,13	0,05	-0,06	-0,22	-0,04	0,05	-0,08
	p	0,27	0,10	0,18	0,22	0,61	0,56	0,05	0,67	0,62	0,45
Folik asit	**r**	0,3	0,01	-0,22	-0,21	0,18	-0,12	-0,07	-0,12	0,002	-0,12
	p	0,007	0,87	0,05	0,06	0,11	0,28	0,51	0,26	0,98	0,28
Homosistein	**r**	-0,1	-0,06	-0,29	-0,19	0,17	-0,15	-0,02	-0,18	-0,003	-0,23
	p	0,38	0,54	0,008	0,08	0,12	0,18	0,80	0,10	0,98	0,03
D vit	**r**	0,23	-0,06	-0,15	-0,14	-0,07	-0,15	-0,06	-0,09	0,07	-0,07
	p	0,03	0,58	0,16	0,19	0,49	0,18	0,59	0,41	0,53	0,54
Ca^{+2}	**r**	-0,04	0,26	-0,17	-0,16	-0,02	-0,21	-0,10	-0,09	0,26	0,05
	p	0,68	0,02	0,13	0,13	0,79	0,05	0,34	0,43	0,02	0,63
Ferritin	**r**	-0,04	-0,10	-0,59	-0,02	-0,06	-0,10	-0,01	-0,13	0,2	0,005
	p	0,72	0,92	0,60	0,83	0,59	0,38	0,89	0,22	0,07	0,96
Demir	**r**	-0,02	0,09	-0,06	-0,04	0,03	-0,12	0,09	-0,10	0,09	0,07
	p	0,84	0,39	0,57	0,68	0,74	0,28	0,39	0,37	0,39	0,54
TAS	**r**	-0,07	0,29	-0,16	-0,16	-0,01	-0,12	-0,20	-0,13	0,08	-0,13
	p	0,53	0,008	0,13	0,14	0,88	0,26	0,07	0,22	0,48	0,25
TOS	**r**	-0,13	0,14	0,02	0,07	0,13	-0,15	-0,13	-0,09	0,15	0,23
	p	0,25	0,21	0,84	0,52	0,26	0,18	0,24	0,39	0,18	0,03
OSİ	**r**	-0,12	0,11	0,04	0,09	0,13	-0,15	-0,11	-0,08	0,16	0,27
	p	0,26	0,31	0,72	0,41	0,25	0,18	0,31	0,47	0,16	0,01

4.8. Araştırılan Parametrelerin Folikuler Sıvı Değerleri ile Bazal Karakteristik Özellikler ve Embriyolojik Parametreler ile Korelasyonu

Hastaların folikuler sıvı vitamin B12 düzeyleri EZ olan oosit sayısı arasında zayıf negatif (r= -0,27, p=0,01) bir ilişki mevcut olup diğer parametrelerle herhangi bir ilişki saptanmadı (p>0,05). Folikuler sıvı folik asit düzeylerinin de EZ olan oosit sayısıyla zayıf negatif (r= -0,22, p=0,04) bir ilişkisi mevcut olup diğer parametrelerle herhangi bir ilişkisi saptanmadı (p>0,05). Homosistein, D vitamini, ferritin, demir ve düzeyleri ile bazal karakteristik özellikler, hormon değerleri ve embriyolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05). Folikuler sıvı kalsiyum düzeyleri ile fertilizasyon oranı arasında pozitif zayıf bir ilişki saptandı (r=0,23, p=0,03). Kalsiyumun diğer parametrelerle arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı (p>0,05). Folikuler sıvı TAS düzeyleri ile VKİ arasında zayıf pozitif bir ilişki (r=0,24, p=0,02) ve yaş ortalaması ile negatif bir ilişki (r= -0,35, p=0,001) olup diğer parametrelerle anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05). Folikuler sıvı TOS düzeylerinin VKİ (r=0,28, p=0,01) ve anomalili oosit sayıları (r=0,24, p=0,02) ile arasında pozitif bir korelasyon saptandı. Folikuler sıvı OSİ'nin de VKİ (r=0,24, p=0,02) ve anomalili oosit sayıları (r=0,29, p=0,008) ile arasında pozitif bir korelasyon saptandı.

Folikul sıvısında ölçülen parametrelerin bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler ile korelasyonu Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo10. Araştırılan parametrelerin folikuler sıvı değerleri ile bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler ile korelasyonu.

		Yaş	VKİ	Oosit	MII	MII oranı	Anomalili oosit	Dejenere oosit	EZ	FR	Embryo
B12	**r**	-0,18	-0,03	-0,09	-0,01	0,16	-0,09	-0,02	-0,27	0,007	0,04
	p	0,1	0,78	0,41	0,88	0,14	0,41	0,83	0,01	0,95	0,73
Folik asit	**r**	0,01	0,09	0,005	0,05	0,14	-0,06	0,06	-0,22	0,04	0,06
	p	0,93	0,41	0,96	0,63	0,22	0,59	0,58	0,04	0,68	0,54
Homosistein	**r**	-0,13	-0,06	-0,21	-0,18	-0,06	-0,16	0,17	-0,15	-0,01	-0,14
	p	0,22	0,59	0,05	0,10	0,59	0,13	0,12	0,16	0,87	0,21
D vit	**r**	-0,008	0,03	-0,10	-0,06	-0,05	-0,13	-0,003	-0,18	0,07	-0,001
	p	0,94	0,79	0,34	0,55	0,66	0,24	0,97	0,10	0,54	0,99
Kalsiyum	**r**	-0,06	0,08	-0,002	-0,03	-0,09	-0,04	0,08	-0,08	0,23	0,04
	p	0,56	0,43	0,98	0,76	0,39	0,68	0,48	0,44	0,03	0,67
Ferritin	**r**	-0,11	0,10	0,10	0,08	-0,01	0,09	-0,06	0,02	-0,15	-0,15
	p	0,3	0,34	0,37	0,45	0,91	0,42	0,54	0,85	0,17	0,18
Demir	**r**	-0,19	0,12	0,01	0,002	-0,08	-0,02	0,10	-0,09	0,10	0,02
	p	0,07	0,28	0,91	0,98	0,48	0,80	0,35	0,39	0,36	0,82
TAS	**r**	-0,35	0,24	0,11	0,09	-0,09	0,06	0,006	-0,20	0,16	0,08
	p	0,001	0,02	0,31	0,39	0,43	0,55	0,96	0,07	0,14	0,45
TOS	**r**	-0,14	0,28	0,12	0,04	-0,10	0,24	0,03	-0,05	0,08	0,01
	p	0,20	0,01	0,26	0,70	0,34	0,02	0,78	0,61	0,48	0,87
OSİ	**r**	-0,07	0,24	0,13	0,05	-0,09	0,29	0,05	-0,02	0,03	0,01
	p	0,52	0,02	0,21	0,62	0,38	0,008	0,64	0,86	0,75	0,87

VKİ: Vücut kitle indeksi; MII: Metafaz II; EZ:Empty Zona; FO: Fertilizasyon oranı; FSH: Folikul stimulan hormon; LH: Luteinizan hormon; E2: Estradiol; TSH: Tiroid stimulan hormon; PRL: Prolaktin; TAS: Total antioksidan status; TOS: Total oksidan status; OSİ: Oksidatif stres indeksi.

4.9. Araştırılan Parametrelerin Serum ve Folikuler Sıvı Değerlerinin Birbiriyle Korelasyonu

Serumda ve folikuler sıvıda ölçülen parametrelerin birbirleriyle bir ilişkisi olup olmadığına bakıldığında;

Serum vitamin B12 düzeyleri ile folikul sıvısı vitamin B12 düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görüldü (r=0,45, p=0,0001).

Serum folik asit düzeyleri ile folikul sıvısı folik asit düzeyleri arasında güçlü bir pozitif bir korelasyon bulundu (r=0,46, p<0,0001).

Serum homosistein düzeylerinin ise folikuler sıvı demiri ile zayıf pozitif (r= 0,22, p=0,04) ve folikuler sıvı homosisteini ile güçlü pozitif bir korelasyon gösterdiği saptandı (r= 0,52, p<0,0001).

Serum D vitamini ile folikul sıvısı D vitamini arasında güçlü bir pozitif bir korelasyon bulundu (r=0,63, p<0,0001).

Serum kalsiyum düzeylerinin folikuler sıvı parametreleriyle anlamlı bir ilişkisi saptanmadı (p>0,005).

Serum ferritini ile folikul sıvısı ferritin (r=0,33, p=0,003) ve folikul sıvısı demir (r=0,34, p=0,002) arasında pozitif bir korelasyon olduğu görüldü.

Serum demir düzeyleri folikuler sıvı ferritin (r=0,28, p=0,01), kalsiyum (r=0,23, p=0,04) ve demir (r=0,63, p<0,0001) düzeyleri ile pozitif bir ilişki gösterdi.

Serum TAS düzeyleri ise folikuler sıvı ferritini ile (r=0,23, p=0,03) zayıf; folikuler sıvı TAS düzeyleri ile güçlü (r=0,42, p<0,0001) bir pozitif korelasyon gösterdi.

Serum TOS (r= -0,22, p=0,04) ve serum OSİ (r= -0,22, p=0,04) düzeyleri sadece folikuler sıvı vitamin B12 düzeyleri ile zayıf negatif bir korelasyon gösterdi.

Araştırılan parametrelerin birbiriyle olan korelasyonları Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo11. Araştırılan parametrelerin serum ve folikuler sıvı değerlerinin birbiriyle korelasyonu.

		FB12	FDVİT	FFOL	FFERR	FCA	FDE	FTAS	FTOS	FOSİ	FHCY
SB12	**r**	0,45	-0,04	0,18	-0,04	0,03	-0,03	-0,08	-0,02	-0,06	-0,05
	p	<0,0001	0,69	0,09	0,68	0,77	0,74	0,48	0,84	0,59	0,66
SFOL	**r**	0,02	0,02	0,46	0,008	-0,04	-0,01	-0,13	-0,06	-0,02	-0,04
	p	0,85	0,86	<0,0001	0,94	0,72	0,92	0,22	0,59	0,84	0,69
SHCY	**r**	0,16	-0,01	0,04	0,16	0,01	0,22	0,10	-0,01	-0,03	0,52
	p	0,14	0,89	0,68	0,16	0,91	0,04	0,35	0,91	0,79	<0,0001
SD vit	**r**	-0,01	0,63	0,06	-0,14	0,03	-0,10	0,03	-0,06	-0,08	0,13
	p	0,91	<0,0001	0,55	0,19	0,79	0,33	0,77	0,56	0,47	0,24
SCA	**r**	-0,11	-0,13	0,06	0,02	0,09	0,03	-0,02	0,04	0,03	0,10
	p	0,31	0,22	0,60	0,83	0,39	0,73	0,81	0,71	0,78	0,36
SFerritin	**r**	-0,08	-0,11	0,18	0,33	0,16	0,34	0,15	0,005	-0,05	0,03
	p	0,48	0,32	0,10	0,003	0,14	0,002	0,16	0,96	0,63	0,73
SDE	**r**	-0,007	-0,03	0,11	0,28	0,23	0,63	0,18	0,20	0,16	-0,07
	p	0,95	0,75	0,32	0,01	0,04	<0,0001	0,11	0,07	0,14	0,52
STAS	**r**	0,03	0,11	-0,03	0,23	0,05	0,14	0,42	0,17	0,03	0,08
	p	0,76	0,30	0,74	0,03	0,60	0,20	<0,0001	0,12	0,78	0,46
STOS	**r**	-0,22	-0,15	0,003	-0,04	0,008	-0,09	-0,03	-0,007	-0,01	-0,18
	p	0,04	0,17	0,97	0,67	0,94	0,39	0,79	0,94	0,92	0,10
SOSİ	**r**	-0,22	-0,16	0,007	-0,08	0,01	-0,11	-0,07	-0,02	-0,009	-0,19
	p	0,04	0,15	0,94	0,45	0,88	0,33	0,48	0,85	0,94	0,07

TAS: Total antioksidan status; TOS: Total oksidan status; OSİ: Oksidatif stres indeksi; HCY: Homosistein.

5. TARTIŞMA

İnfertilite reproduktif çağdaki kadınların yaklaşık %15'ini etkileyen bir sağlık sorunudur. İnfertiliteye yol açan sebeplerin yaklaşık üçte biri kadın kaynaklı (özellikle ovulatuar nedenler-PKOS), üçte biri erkek kaynaklı ve kalan üçte biri ise her iki cinse bağlıdır. İnfertilite sıklığının gün geçtikçe artması nedeniyle bebek sahibi olmak için yardımcı üreme tekniklerine olan başvuru giderek ivme kazanmıştır. Dolayısıyla özellikle son yıllarda hem infertiliteye neden olan faktörlerin altında yatan etyopatogenetik mekanizmalar hem de İVF tedavisinde başarıyı etkileyen etmenler üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Biz de bu amaçla çalışmamızda 21-44 yaş arası PKOS (n=20), açıklanamayan infertilite (n=20), DOR (n=20) ve erkek (n=20) faktör nedeniyle İCSİ-ET siklusu planlanan 80 infertil kadının serum ve FS'da vitamin B12, folik asit, D vitamini, demir, ferritin, kalsiyum, TAS, TOS ve homosistein düzeylerini tayin ettik. Erkek faktör nedeniyle İVF tedavisine başvuran hastaları kontrol grubu olarak kabul ettik. Bu şekilde vücudumuzda birçok reaksiyonda önemli görevleri olan vitamin, mikroelement ve makroelementlerin ve vücudumuz oksidan ve antioksidan göstergelerinin infertilite etyolojisine ve sonrasında İVF tedavisinde başarıya etkisini değerlendirmeyi planladık.

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verilerine bakıldığında; hem kadın hem erkek partnerde yaş ortalaması DOR grubunda PKOS, açıklanamayan infertil ve erkek grubuna oranla anlamlı ölçüde yüksek bulunurken; erkek kaynaklı infertiliteye sahip olan grupta açıklanamayan gruba kıyasla kadın yaş ortalaması anlamlı olarak düşük bulundu. Dört grup arası VKİ, partner VKİ, infertilite süresi, siklus sayısı ve sigara-alkol kullanım oranları açısından herhangi bir fark saptanmadı. Artan VKİ' nin fertilite üzerine etkisinin araştırıldığı birçok çalışmada obezitenin hipotalamo-hipofizer-ovaryan aksın çalışmasını bozduğu ve özellikle PKOS hastalarında sık rastlanan obeziteye bağlı metabolik ve reproduktif bozuklukların şiddetinin arttığı vurgulanmaktadır (127). Aksine çalışmamızda PKOS grubunun VKİ diğer gruplar ile farklı bulunmamıştır. Çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde, yaşın over rezervi ile ters orantılı bir ilişkisi olduğu yapılan birçok çalışma ile de ortaya koyulmuştur (128, 129). İleri yaş ile oosit miktarı ve kalitesinde düşüşlerin overyan rezervde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (128). Bu sebeple özellikle 40 yaşın

üstündeki kadınlarda IVF' başarı şansı düşmekte olup genç kadınlarda IVF sonuçları çok daha iyi olmaktadır (130, 131). See Ling Loy ve ark. (2017) 26-44 yaş arası 1009 infertil kadın üzerinde yaptıkları çalışmada, over rezervinin önemli göstergeleri olan AFS ve AMH' nın ilerleyen her yaşla beraber ortalama olarak sırasıyla 0,79 (folikul) ve 0,38 ng/mL oranında azaldığını bulmuştur (129). Benzer şekilde yaş ile over folikul havuzu arasındaki negatif ilişki birçok çalışmada da kanıtlanmıştır (132-135). Bununla bağlantılı olarak 45 yaş üstü kadınların kendi oositlerini kullanarak yardımcı üreme tekniklerinden faydalanamayacağı ortaya konmuştur (136). Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada da 36-40 yaş arasındaki kadınların %84.6' sının ve ≥ 41yaşındaki kadınların hepsinin over rezervinin azalmış olduğu; yaş arttıkça matür oosit sayısı ve embriyo sayısının anlamlı düşüş gösterdiği ve artan yaşa paralel olarak da gebelik şansının azaldığı kanıtlanmıştır (137). Çalışmamızda DOR grubunda daha yüksek bulunan partner yaşı ileri yaştaki kadınların yine daha ileri yaşta erkeklerle evlenmesi olarak açıklanabilir. Erkek grubunda açıklanamayan gruba göre daha küçük kadın yaşı bulunması da erkek faktör nedenli infertilite yaşayan çiftlerin infertilite nedeniyle İVF tedavisine başvurularının daha erken dönemde olabilmesi hipoteziyle açıklanabilir.

Çalışmamızda bazal hormon değerlerine bakıldığında; DOR grubunun bazal FSH düzeyleri diğer üç gruba kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Benzer şekilde, yapılan çalışmalarda DOR, klinik değerlendirmeye dayalı olarak azalmış over fonksiyonuyla ilişkili azalmış fekundabilite durumu olarak tanımlanmış ve sıklıkla FSH>10 mIU/mL veya AMH <1 ng/mL olması ile gösterilmiştir (138). Çalışmalarda yüksek serum bazal FSH değeri İVF başarısızlığı ile ilişkili bulunmuştur (139). Yapılan 21 çalışmanın metaanalizinde ise bazal FSH düzeyinin zayıf overyan cevabı tahmin etmede bir tarama testi olduğunu ve sadece çok yüksek FSH değeri olan kadınlarda prediktif değeri olabileceğini vurgulamışlardır (140). Çalışmamıza katılan hastaların LH düzeylerine bakıldığında PKOS grubunda açıklanamayan infertil gruba göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Yapılan çalışmalarda da PKOS hastalarında LH hipersekresyonu olduğu ve buna bağlı olarak FSH duyarlılığının azalmasıyla granuloza hücrelerin prematur luteinizasyonu sonucu folikuler büyüme ve ovulasyonun olumsuz etkilendiği ortaya koyulmuştur (141-143). Bu durum PKOS hastalarında anovulatuar infertiliteyi açıklamaktadır.

Overyan stimulasyon özellikleri ve embriyolojik veriler açısından; çalışmamızda PKOS grubu hastalarına KOS için verilen ortalama gonadotropin dozu diğer üç gruba göre daha düşük olsa da gruplar arasındaki fark istatiksel anlamlı değildi. Çalışmamızın aksine yapılan çalışmalarda PKOS grubunda diğer gruplara kıyasla gonadotropin ihtiyacı daha az bulunmuştur (144). Çalışmamızda OPU' da toplanan toplam oosit, GV ve matur oosit (MII) sayısı ve anomalili ve EZ' li oosit miktarı PKOS grubunda diğer üç gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, DOR grubunda hem total oosit sayısı hem de MII sayısı diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşüktü. PKOS grubunda freezing işlemi yapılan hasta sayısının diğer gruplara göre daha çok bulmamızın nedeni bu grupta toplanan oosit sayısının ve matur oosit sayısının daha fazla olması ile açıklanabilir. Çalışmamızda diğer gruplara göre zayıf overyan cevap görülme oranı en yüksek DOR grubunda olup; PKOS grubunda zayıf overyan cevaba rastlanmadı. DOR tanısı için 2011'de ESHRE konsensusu tarafından Bologna kriterleri oluşturulmuştur. Bunlar: 1. İleri kadın yaşı (≥40) veya düşük over yanıtı için başka bir risk faktörü olması 2. Daha önce zayıf overyan cevap öyküsü (günlük >149 IU FSH stimulasyonuna rağmen <4 oosit toplanması ya da zayıf cevap nedeniyle siklus iptali olması) 3. Anormal over rezervi testi (AMH<0.5-1.1 ng/mL AFS<5-7). Bunlardan en az iki tanesinin varlığı durumunda tanı konulmaktadır (124). Bu kriterler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamıza benzer şekilde yapılan çalışmalarda da DOR tanısı overyan stimulasyona zayıf overyan cevap veren infertil hastalara klinik olarak konulmuştur (122, 145). Tannus ve ark.' nın İVF tedavisi alan hastalar üzerinde yaptığı çalışmada; PKOS grubunda tubal faktör infertilitesi olan gruba göre daha fazla sayıda oosit toplanmış (10,4'e karşı 16,6 oosit) ve embriyo kriyoprezervasyonu ile daha fazla sayıda siklus şansı olmuştur (144). Benzer şekilde PKOS hastalarıyla yapılan birçok çalışmada kontrollere kıyasla daha fazla sayıda gelişmekte olan folikul ve daha fazla sayıda oosit aspirasyonu olduğu bildirilmektedir (146-150). Çalışmamızda PKOS grubunda daha yüksek bulunan MI oosit ve EZ' li ve anomalili oosit sayısı, PKOS' ta fazla miktarda gelişen folikullerin farklı gelişim evrelerinde olmaları ve belki de gelişim sıralarında anomaliye uğrama risklerinin yüksek olmasından kaynaklanabilir. Çalışmamızda tüm hastalar arasında OHSS gelişme riski en yüksek PKOS grubunda olmasına rağmen gruplar arasında istatiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızın aksine yapılan çalışmalarda

gonadotropinlerle KOS tedavisine daha duyarlı ve abartılı cevap vermeleri nedeniyle PKOS hastalarında daha yüksek OHSS riski saptanmıştır (151). Örneklem sayısının az olması ve İVF tedavisinin giderek bireyselleştirilmesi ve freezing işlemi ile OHSS riskinin önemli ölçüde azaltılabilmesi gruplar arası OHSS riskinin benzer olmasının nedenleri olabilir.

İVF başarı göstergelerine bakıldığında; çalışmamızda DOR grubunda diğer üç gruba kıyasla anlamlı düzeyde düşük fertilizasyon ve dolayısıyla daha düşük embriyo sayısı bulduk. Gebelik, klinik gebelik ve eve bebek götürme oranları PKOS grubunda diğer gruplardan daha yüksek olsa da gruplar arasındaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi. Çalışmamızın aksine yapılan çalışmalarda PKOS gibi ovulatuar disfonksiyonu olan kadınlarda canlı doğum oranı en yüksek, DOR grubu kadınlarda ise canlı doğum oranı en düşük bulunmuştur (%40.4' e karşı %15) (152).

Birçok çalışmada da gösterildiği üzere bizim çalışmamızda da DOR; ileri yaş, azalmış over rezervi ve azalmış fekundabilite ile ilişkiliydi (128, 138). DOR grubunda bulunan düşük fertilizasyonun nedeni ilerleyen yaşla beraber azalan oosit kalitesi olabilir. PKOS grubu ile tubal faktör infertilitesi olan grupların karşılaştırıldığı bir çalışmada PKOS grubunda daha fazla embriyo oluşmuş ve embryo kriyoprezervasyonu ile daha fazla sayıda siklus şansı elde edilerek PKOS grubunda daha yüksek kümülatif canlı doğum oranları görülmüştür (%15,2'ye göre %26,3) (144).

Araştırdığımız parametrelerin serum ve FS seviyelerine bakıldığında; çalışmamızda incelediğimiz dört grup arasında serum ve FS ***vitamin B12*** düzeyleri açısından herhangi bir farklılık saptanmadı. Serum ***folat s***eviyesi ise PKOS ve erkek grubunda DOR grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulurken FS folat seviyeleri açısından gruplar arası fark yoktu. Çalışmamızda serum ve FS ***homosistein*** düzeyleri kontrol grubu ile DOR grubunda benzer bulunurken, kontrol grubu hariç en yüksek serum ve FS homosistein düzeyi DOR grubunda idi. İstatistiksel olarak anlamlı fark ise serum homosistein düzeyi açısından sadece DOR ve PKOS grubu arasında iken FS homosistein düzeyi ise hem DOR ve PKOS; hem de DOR ve açıklanamayan grup arasında anlamlı idi. Aksine, literatürde vitamin B12 ile infertilite ilişkisini araştıran çalışmalarda özellikle B12 eksikliğinin açıklanamayan infertilite ile ilişkisi

bulunmuştur (59, 153-155). Açıklanamayan infertilitesi olan hastalarda vitamin B12 eksikliğinin hematolojik parametrelere yansımadan yıllar önce doku düzeyinde etkilerinin başlaması ile infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir (59, 153-155). Buradan yola çıkarak, açıklanamayan infertilite durumlarında, tam kan incelemelerindeki hematolojik değerler normal olsa bile serum vitamin B12, metilmalonik asit, homosistein seviyesi araştırılması önerilmektedir (53). Etyoloji ilişkisinin çok net olmamasına karşın, DNA yapımının vitamin B12 aracılığı ile olması, dolayısıyla, vitamin B12 eksikliğinde meydana gelebilecek bozulmuş DNA' lı hücrelerin özellikle fertilizasyon ve implantasyon dönemini etkileyerek infertiliteye yol açabilmesi vitamin B12 ve infertilite arasındaki muhtemel mekanizmalardan birisidir (54, 55). Diğer bir mekanizma B12 vitamini eksikliğinin embriyo viabilitesi üzerine olan negatif etkisidir (56). Çalışmamızda PKOS grubunda kontrol grubu olarak aldığımız erkek grubuna göre serum ve FS homosistein seviyelerini daha düşük bulduk. Çalışmamızın aksine, Yılmaz ve ark.' nın yaptığı çalışmada ise PKOS grubunda açıklanamayan infertil ve erkek faktörü olan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek serum homosistein düzeyleri bulunurken, FS homosistein düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (76). 400 µg'dan daha yüksek dozlarda suplemental folik asit alımının infertilite sıklığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (67). Randomize kontrollu bir çalışmada; 3 ay boyunca 400 µg folik asit içeren mutivitamin takviyesi alan subfertil kadınlarda gebelik oranı %26 bulunurken, plasebo verilen kadınlarda gebelik oranı %10 olarak tespit edilmiştir ve folik asit takviyesi alan grupta gebe kalma oranı istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (156).

Çalışmamızda serum ve FS ***D vitamini*** düzeyleri gruplar arasında homojen olarak dağılmıştı. Benzer şekilde, son dönemlerde Gaskins ve ark.' nın diyet ve fertilite üzerine yaptıkları derlemede yeterli D vitamininin fertilite üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır (67). Yapılan bir çalışmada PKOS hastalarında serum D vitamini eksikliğinin sık görüldüğü ve bu durumun PKOS semptomlarını kötüleştirebileceğini belirtmişlerdir (157). Başka bir çalışmada ise İVF tedavisine başvuran DOR hastaları ve normal over rezervi olan hastaların FS vitamin D ve AMH düzeylerine bakılmış ve DOR grubunda D vitamini eksikliğinin daha fazla olduğunu bulmuşlardır. DOR hastalarında D vitamini suplementasyonunun AMH

düzeylerini yükselterek reproduktif potansiyelde düzelme sağlayabileceği ortaya koyulmuştur (158).

FS ve serum ***ferritin*** düzeyleri çalışmamızda gruplar arasında benzer bulunurken; FS ***demir*** düzeyi DOR grubunda açıklanamayan gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu. İnfertilite ve demir ilişkisini araştıran çalışmalarda artmış demir alımının ovulatuar infertilite riskini azalttığı bulunmuştur (79). Perikonsepsiyonel dönemde içinde demir ve folik asitin de bulunduğu multivitamin ve mineral suplementasyonunun infertilite tedavisi üzerinde pozitif etkisinin olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir (80). Serum demir ve ferritin düzeylerinin infertil hastaların %80' den fazlasında yeterli olduğu bulunmuştur (82).

Çalışmamızda ***oksidatif parametrelerin*** serum düzeyleri gruplar arasında benzer iken, folikuler TOS ve OSİ düzeyleri açıklanamayan grupta DOR grubu ve erkek grubuna göre daha yüksek bulundu. İnfertilite etyopatogenezinde OS' nin rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (99). Çalışmamıza benzer şekilde, açıklanamayan infertilitesi olan kadınların FS' da antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz düzeyinin azalmış olduğu rapor edilmiştir (100). Özkaya ve ark.' nın çalışmasında İVF tedavisine giden hastalarda fertil gruba göre lipid peroksidasyon düzeyleri artmış, serum vitamin A, C ve folikul sıvısı vitamin C ve glutatyon peroksidaz düzeyleri azalmıştır (104).

Çalışmamıza katılan hastaları gebe kalan ve kalmayan olarak iki gruba ayırdığımızda; gebe kalan grup ve kalmayan grup arasında ***demografik veriler,*** siklus sayısı, gonadotropin başlama dozu, embriyolojik parametreler, verilen embriyo sayısı, EMK, sperm parametreleri ve bazal hormon değerleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi. Çalışmalarda, toplam fertilite oranları 25-29 yaşta %4-8 azalırken bu oran 30-34 yaş arasında %15-19, 35-39 yaşta %26-46 ve 40-45 yaşta %95 şeklinde azalma gösterdiği bulunmuştur (159). Çalışmamızın aksine, 2012 yılında yapılan bir çalışmada embriyo transferi sonrası anne yaşına göre gebelik oranları; 35 yaşından genç kadınlarda %40.7, 35-37 yaş arası %31.3, 38-40 yaş arası %22.2, 41-42 yaş arası %11.8 ve > 42 yaş kadınlarda %3.9 olarak bulunmuştur (160). 2014 yılında yapılan bir metaanalizde EMK'ın İVF sonrası gebelik oluşumunu zayıf predikte edeceğini ve siklus iptali ya da tüm embriyoların dondurulması için bir kriter olamayacağı

vurgulanmıştır (161). Benzer şekilde çalışmamızda da EMK' ın gebelik ile ilişkisi olmadığı görülmüştür. Değişik yaş gruplarında yapılan çalışmalarda siklus başına >15 oosit elde edilmesinin gebelik ve canlı doğum oranlarını arttırdığı bulunmuştur (162-164). Aksine çalışmamızda gebe kalan ve kalmayan gruplar arasında oosit sayıları farklı bulunmamıştır. Artan VKİ'nin fertilite üzerine etkisinin araştırıldığı birçok çalışmada İVF tedavisi alan obez kadınlarda gebelik ve canlı doğum oranlarının düşük olduğu tespit edilmiştir (165-169). Obez kadınların %5-10 oranında kilo vermeleri halinde ovulatuar fonksiyonlarının düzelip gebelik şansının arttığı gösterilmiştir (170). Aksine çalışmamızda ise VKİ ile gebelik oranı arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda gebe kalan grupta serum ve FS ***vitamin B12 ve folat*** düzeyleri gebe kalmayan gruba göre bir miktar yüksek olsa da iki grup arasındaki aradaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi. İVF tedavisine başvuran hastalarda yapılan bir çalışmada, serum vitamin B12 düzeyi yüksek olan kadınlarda düşük olanlara göre implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (63). Çalışmamızda gruplar arasındaki farkın anlamlı olmaması örneklem sayısının az olması ile açıklanabilir. B12 vitamini eksikliğinin homosistein seviyelerini arttırarak erken gebelik kayıplarına yol açtığı düşünülmektedir (54, 55). Çalışmamızda da benzer şekilde aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmasa da gebe kalmayan grupta homosistein düzeyinin yüksek olması bu hipotezi desteklemektedir. DNA yapımının vitamin B12 aracılığı ile olması, dolayısıyla, vitamin B12 eksikliğinde meydana gelebilecek bozulmuş DNA' lı hücrelerin özellikle fertilizasyon ve implantasyon dönemini etkileyerek İVF' te başarı oranlarını azaltabileceği düşünülmektedir (54, 55). Çalışmalarda B12 vitamini eksikliğinin embriyo viabilitesi üzerine olan negatif etkisi de gösterilmiştir (56). Folik asitle ilgili yapılan çalışmalarda 400 µg'dan daha yüksek dozlarda suplemental folik asit alımının gebelik kaybı riskinde azalma ve infertilite tedavisinde yüksek başarı oranları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (67). İnfertil hastalarda folat desteğinin doğum oranlarını arttırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (64, 65, 68). Prekonsepsiyonel folik asit takviyesinin İVF' de başarı şansını arttığı yönündeki çalışmalardan biri de Hollanda'da yapılan folat ve vitamin B12 desteğinin 3. gün embriyo kalitesiyle yüksek oranda ilişkili olduğunu gösteren çalışmadır (65, 171). Gaskins ve ark.' nın yardımcı üreme tedavisi alan 100 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada; serum folat düzeyi

yüksek (>26,3 ng/mL) olan kadınların, serum folat düzeyi düşük (<16,6 ng/mL) olanlardan 1,62 kez; serum vitamin B12 düzeyi yüksek (>701 pg/mL) olan kadınların ise serum vitamin B12 düzeyi düşük (<439 pg/mL) olanlardan 2,04 kez daha fazla canlı doğum olasılığı olduğunu bulmuşlardır (63).

Çalışmamızda gebe kalmayan grupta serum ve FS ***homosistein*** düzeyleri gebe kalan gruba göre bir miktar yüksek olsa da iki grup arasındaki aradaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi. Çalışmamıza benzer şekilde, Yılmaz ve ark.' nın İVF tedavisine giden 36 PKOS'lu kadın üzerinde yaptıkları çalışmada, serum homosistein düzeyleri ile MII oosit ve embriyo sayısı arasında negatif etki bulunmasına rağmen serum homosistein düzeylerinin klinik gebelik oranına etkisi bulunamamıştır (76). Pacchiarotti ve ark. (2007) ise hiperhomosisteineminin İVF başarısına etkisini değerlendirmek amacıyla prospektif olarak hiperhomosisteinemisi olan toplam 48 infertil çifti incelemiş, hiperhomosisteinemi tedavisi alan grupta almayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek gebelik oranı, implantasyon hızı görülürken daha düşük abort izlenmiştir. Araştırmacılar, buradan yola çıkarak, hiperhomosisteineminin İVF başarısını negatif yönde etkileyebileceğini belirtmişlerdir (78). Jerzak ve ark. (2003) rekürren spontan abortu olan ve normal sağlıklı kadınlar arasında yaptıkları çalışmada FS' da total açlık homosistein konsantrasyonlarını tayin etmişler ve RSA' lı kadınların normal sağlıklı kadınlara göre anlamlı derecede daha yüksek serum homosistein konsantrasyonuna sahip olduklarını bulmuşlardır. İVF başarısızlığı olan kadınlarda, İVF tedavisi sonrası başarı elde edilen kadınlara göre serum ve FS homosistein düzeyini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Araştırmacılar, bu ön verilere göre yüksek homosistein düzeyinin spontan gebelik veya İVF' i takiben gebelik sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği sonucuna varmışlardır (77). Boxmeer ve ark. (2009) homosistein yolunun biyolojik belirteçlerinin İVF sonucu ile ilişkisini incelemiş ve FS'da optimal bir homosistein yolağının, daha iyi bir embriyo kalitesi ve gebelik şansı ile bağlantılı olduğu sonucuna varmışlardır (65).

Çalışmamızda serum ve FS ***Ca^{+2} ve D vitamini*** düzeylerini gebe kalan ve kalmayan grupta benzer olarak bulduk. Ca^{+2}' un fertilizasyonda ve embriyo gelişiminin tamamlanması üzerinde önemli olduğu gösterilmiştir (38-40). Ca^{+2} iyonunun fertilizasyondaki önemi, oositlerin içerisinde sinyal yolaklarını uyarmak, hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımını sağlamak ve bunun neticesinde oosit hücresini

aktive etmekten kaynaklandığı düşünülmektedir (41, 42). İVF' te embriyo kültür ortamına kalsiyum iyonofor verildiğinde verilmeyen gruba göre hücre içi Ca^{+2} ossilasyonunun daha fazla olması nedeniyle embriyo mitotik aktivitesi, implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranları daha fazla saptanmıştır (43). Tola ve ark.' ın çalışmasında, granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} düzeyleriyle oosit kalitesi ve fertilizasyon ile arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (44). Vitamin D' nin embriyo ve endometrium arasındaki sinyali düzenleyerek tüm plasental- desidual üniteyi etkilediği ve bu mekanizmayla asıl etkisini endometrium üzerine yaptığı bulunmuştur (52). Bu açıdan D vitaminin endometrial desidualizasyonu ve homeobox A10 (HOXA-10) denilen implantasyonda önemli olan genin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (47-50). Özkan ve ark.' nın yaptıkları çalışmalarda, FS vitamin D düzeyleri yüksek olan grupta, düşük olan gruba göre 4 kat fazla klinik gebelik elde edilmiş olması, araştırmacıların FS D vitamini düzeylerinin İVF' te siklus başarısının bağımsız bir prediktoru olduğu sonucuna varmalarına neden olmuştur (51). Yaş, VKİ, etnisite ve embriyo transfer sayısı ile birlikte düşünüldüğünde FS vitamin D düzeylerindeki her bir ng/mL artışın klinik gebelik elde etme olasılığını %7 arttırdığı bulunmuştur (51). Fatemi ve ark.' nın (2017) 105 PKOS' lu hasta üzerinde yaptıkları çalışmada hastaların 52'sine 8 hafta boyunca vitamin D_3 ve vitamin E replasmanı ve kalan kısmına plasebo verilmiş ve 2 grup arası İCSİ sonuçları kıyaslanmıştır. Oosit sayısı ve kalitesi, MII oosit yüzdesi, FO, embriyo sayısı ve kalitesi vitamin D_3 ve vitamin E replasmanı yapılan grupta kontrol grubuna göre bir miktar daha yüksek saptanmasına rağmen 2 grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır. Klinik gebelik ve implantasyon oranı ise tedavi grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş (172). Aleyasin ve ark.'nın (2011) 82 infertil kadın üzerinde yaptıkları çalışmada serum ve FS D vitamini düzeylerine bakılmış ve gebe kalan grupta serum D vitamini düzeyleri ortalama 8,13 ng/mL ve gebe kalmayan grupta ise 8,29 ng/mL bulunmuş. FS D vitamini ile gebelik oranı arasında anlamlı fark saptanmamıştır. FS 25OH D düzeyi D vitamininin vücut depolarını yansıtmaktadır. Çoğu denekte D vitamini eksikliği olmasına rağmen bu çalışmayla D vitaminin yardımcı üreme tedavisi sonuçlarında önemli bir rol oynamadığını ortaya koymuşlardır (173). Benzer şekilde serum ve FS vitamin D düzeylerinin araştırıldığı İVF tedavisi alan 221 infertil kadın üzerinde yapılan bir diğer çalışmada da; serum ve FS vitamin D düzeyleri

birbiriyle pozitif korele olup her ikisinin de gebelik oranları ile bir ilişkisi saptanmamıştır (174). Franasiak ve ark.'nın (2015) öploid blastokist embriyo transfer edilen kadınlar üzerinde yaptıkları çalışmada ise; ovulasyon tetiklendiği gün alınan serum vitamin D seviyeleri ile gebelik sonuçları arasında herhangi bir ilişki bulunmamış olup araştırmacılar serum D vitamini düzeylerinin blastokist implantasyonunu predikte edemeyeceğini göstermişlerdir (175).

Çalışmamızda İVF tedavisi sonrası gebe kalan ve kalmayan grup arasında serum ve folikuler ***ferritin ve demir*** düzeyleri açısından anlamlı bir farka rastlamadık. Çalışmamızda benzer ekilde, İVF tedavisine giden hastaların FS ve serumunda yapılan bir çalışmada, İVF tedavisi sonucu gebe kalan ve kalmayan hasta grubu arasında serum ve FS ferritin düzeyleri açısından fark saptanmamıştır (81). Demir konsantrasyonu ile ilgili bir başka çalışmada, demir düzeylerinin embriyo gelişim dinamikleri veya gebelik elde etmede herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (176).

Çalışmamızda, ***oksidatif parametreler*** açısından gebe kalan ve kalmayan grupta serumda ve FS' de anlamlı bir fark izlemedik. Oksidatif parametrelerin İVF başarısına etkisi pek çok çalışmanın başlıca konusu olmuştur. IVF tedavisini takiben FS ROT düzeyi ile gebelik oranı arasında pozitif bir korelasyon bildiren birkaç çalışma var iken (177, 178), diğer çalışmalarda korelasyon bulunmamış (101,179) veya ROT seviyeleri ile reproduktif fonksiyonlar arasında negatif bir korelasyon gösterilmiştir (180-182). Azalmış folikuler TAS düzeylerinin fertilizasyon düşüklüğü ile ilişkili olduğunu bulan çalışmalar mevcuttur (108-111). Pasqualotto ve ark.'nın (2004), İVF hastalarının FS' larında lipid peroksidasyon ve TAS düzeylerine baktıkları çalışmasında; lipid peroksidasyon ve TAS düzeyleriyle oosit maturitesi, fertilizasyon ve embriyo kalitesi arasında bir ilişki bulunmamış ve yaşa göre düzeltme yapıldığında gebelik oranı ile FS lipid peroksidasyon ve TAS düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş (177). Başka çalışmalarda da düşük konsantrasyonlardaki FS ROT' larının İVF başarısı tahmininde potansiyel bir belirteç olabileceği bulunmuş (106, 183). Bedaivy ve ark.(2012); İCSİ yapılan 138 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada; FS ROT ve TAS düzeylerini ölçmüşler ve sonrasında ROT-TAS skorunu hesaplamışlar. Sonuçta yüksek FS TAS, yüksek FS ROT-TAS skoru ve düşük FS ROT düzeylerinin İCSİ sonrası gebelik ile pozitif korele olduğunu bulmuşlar ve OS parametrelerinin folikul içindeki metabolik aktivitenin belirteçleri olabileceği

kanaatine varmışlardır (110). Oyawoye ve ark. (2013), 34 infertil kadın üzerinde yaptıkları çalışmada; hastaları erkek faktör, tubal faktör, açıklanamayan infertil, endometrozis ve endometriozise eşlik eden tubal faktör grubu olarak ayırmışlar. Erkek faktör grubunu kontrol grubu olarak planlamışlar ve tüm hastaların FS TAS düzeylerine bakmışlardır. Sonuçta azalmış FS TAS düzeylerinin tubal faktör ve açıklanamayan infertil gruplarda fertilizasyon yetersizliği ile ilişkili olduğunu ve erkek faktörü grupta böyle bir etkinin gözlemlenmediğini saptamışlar (184). Aynı çalışmada yine >37 yaş olan kadınlarda fertilizasyon yetersizliği ile düşük FS TAS arasında bir ilişki bulunmuş ve ≤37 yaşında olan kadınlarda böyle bir ilişkiye rastlanmamış (184). Yapılan bir çalışmada FS TAS düzeyi ile FO arasında negatif korelasyon bulunmuştur (172). Aydın ve ark. (2013) erkek faktör nedeniyle İVF tedavisi alan 70 primer infertil kadın üzerinde yaptıkları çalışmada; hastaların OPU öncesi ve sonrası ve ET öncesi ve sonrası olmak üzere KOS' un 4 fazında serum TAS ve TOS düzeyleri ölçülmüş ve bu OS belirteçlerini klinik gebelik sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Yüksek TAS düzeyleri ve OPU öncesi ve ET sonrası yüksek TOS düzeyleri olan hastaların klinik gebelik oranlarının yüksek olduğu bulunu ve klinik gebelik olasılığı için OPU öncesi OSİ' nin tek başına antioksidan konsantrasyonu kadar kıymetli olduğu sunucuna varmışlardır (185). Çalışmamızda serum ve FS antioksidan ve oksidan durumunun İVF' in klinik başarısı olan gebelik ile ilişkisi olmadığı saptadık. Multivitamin ve mineral takviyesinin İVF tedavisi sonuçlarına ve OS'e etkisini araştıran bir çalışmada İVF siklusu öncesinde multivitamin ve mineral takviyesi alan hastaların serum ve FS proteinlerinin oksidatif hasardan korunduğu, TAS düzeylerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Multivitamin ve mineral takviyesinin iyi kalite oosit sayısını önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (107). İVF'e giden hastalarda multivitamin ve mineral suplementasyonu alan grupta FS ve serumda lipid peroksidasyon düzeyleri azalmış, serum glutatyon peroksidaz, vitamin C ve E konsantrasyonları ve FS glutatyon peroksidaz ve vitamin C konsantrasyonları artmıştır (104). Kazemi ve ark. (2015), İVF tedavisi alan 219 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada ise; antioksidan vitamin (vitamin A, C, E) alımının FS TAS düzeylerine etkisi ile İVF başarısı (oosit sayısı, MII oosit, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesi) üzerine etkisini araştırmışlardır. Vitamin alım seviyeleri ile OS belirteçleri arasında önemli bir ilişki bulunmamış fakat 75 mg/gün'den daha fazla C vitamini alan kadınların FS TAS düzeyleri almayanlardan

yüksek bulunmuştur. MII oosit yüzdesi ve fertilizasyon oranı C vitamini alım düzeyiyle ilişkili olup; FS TAS düzeyi ile İVF sonuçları arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (186). Çalışmamızda gruplar arası anlamlı farkın olmaması örneklem sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir.

Araştırdığımız parametrelerin ***serum ve FS düzeylerinin bazal karakteristik özellikler ve embriyolojik parametreler ile korelasyonuna baktığımızda;***

Çalışmamızda serum ***folik asit*** düzeyleri yaş ile pozitif korele iken, serum ***homosistein*** düzeyleri oosit sayısı ve embriyo sayısı ile negatif korele olarak bulundu. Folikuler ***B12*** ve folik asit düzeyleri EZ'li oosit sayısı ile negatif korele bulundu. İnfertil hastalarda ***folat*** desteğinin total ve matur oosit sayısını ve kalitesini ve embriyo kalitesini arttırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir **(**64, 65, 68). FS' de ***homosistein*** konsantrasyonu ile oosit kalitesi ve maturasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu bulunmuştur (68**)**. Pacchiarotti ve ark. (2007) İVF tedavisine giden hiperhomosisteinemisi olan hastaları kapsayan prospektif çalışmalarında, hiperhomosisteinemi tedavisi alan grup ve almayan grup arasında transfer edilen embriyo sayısı ve kalitesi açısından farklılık tespit etmemişlerdir (78). Berker ve ark.'da (2009) PKOS'lu hastalarla yaptıkları çalışmada FS homosisteinin oosit maturasyonunda ve fertilizasyonda önemli bir rol oynayabileceğini doğrulayarak, FS homosistein konsantrasyonu ile fertilizasyon oranı, oosit ve embriyo kalitesi arasında negatif bir korelasyon bulmuşlardır (187).

Çalışmamızda, serum ***D vitamini*** düzeyleri yaş ile pozitif korele bulunurken, serum ***Ca^{+2}*** düzeyleri VKİ ve FO ile pozitif korele idi ve FS Ca^{+2} düzeyleri de FO ile pozitif korele idi. Fatemi ve ark.' nın (2017) PKOS' lu hastalar üzerinde yaptıkları çalışmalarında D_3 ve E vitamini replasmanının oosit sayısı ve kalitesi, MII oosit yüzdesi, FO, embriyo sayısı ve kalitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da pozitif etkisi gösterilmiştir (172). Çalışmamıza benzer şekilde, Tola ve ark.' ın yaptığı çalışmada, granuloza hücrelerindeki ***Ca^{+2}*** düzeyleriyle oosit kalitesi ve fertilizasyon arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (44). Ca^{+2}' un oosit aktivasyonu ve maturasyonu ve embriyo gelişimi üzerinde önemli etkilerinin olduğu gösterilmiştir (38-40).

Çalışmamızda serum ***TAS*** düzeyleri VKİ ile pozitif korele iken, serum ***TOS ve OSİ*** düzeyleri oluşan toplam embriyo sayısı ile pozitif korele idi. FS TAS düzeyleri ise yaş ile negatif korele ve VKİ ile pozitif korele idi. Folikuler TOS ve OSİ düzeylerine bakıldığında VKİ ve anomalili oosit sayısı ile pozitif korele olarak bulundu. Bu durum artan VKİ' nin özellikle folikuler OS' i arttırarak folikuler oosit maturasyonunda bozulmaya sebep olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde Nasiri ve ark. (2015) İVF tedavisi alan PKOS' lu ve PKOS dışı infertilitesi olan hastaların FS' larında OS'i araştırdıkları çalışmasında da artan VKİ'nin OS'i arttırdığını bulmuşlardır (188). Oyawoye ve ark. yaptıkları çalışmada yaş ile FS ***TAS*** düzeyleri arasında genel olarak bir bağlantı bulmamış fakat reproduktif sonuçlar göz önüne alındığında >37 yaş olan kadınlarda FO ile FS TAS arasında pozitif bir ilişki bulmuş ve ≤37 yaşında olan kadınlarda ise böyle bir ilişkiye rastlamamışlardır (184). Yaşın antioksidanlar üzerine etkisini araştıran birçok çalışma daha çok plazma düzeyleri üzerinde yoğunlaşmış ve ayrı çalışmalarda yaşla beraber serum antioksidan seviyelerinde artma ya da azalma ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (189, 190).

Araştırılan parametrelerin serum ve folikuler düzeylerinin ilişkisine bakıldığında; Ca^{+2}, TOS ve OSİ hariç diğer tüm parametrelerin FS ve serum düzeyleri birbiriyle pozitif korele idi. Serum ferritin düzeyleri FS demir ile serum demir düzeyleri FS ferritin ve FS Ca^{+2} düzeyleri ile pozitif korele iken; serum TAS düzeyleri FS ferritin ile ve serum homosistein düzeyleri de FS demir ile pozitif korele idi. FS B12 düzeyleri ise hem serum TOS düzeyleri hem de serum OSİ düzeyleri ile negatif korele idi. Çalışmamızda benzer şekilde, Aleyasin ve ark. yaptıkları çalışmalarında, FS D vitamini düzeyleri ile serum D vitamini düzeyleri arasında pozitif korelasyon bularak FS D vitamini düzeyinin vücut D vitamini depolarının yansıması olduğunu öne sürmüşlerdir (173). Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar serum ve FS vitamin, mikroelement ve makroelementlerinin antioksidan savunmasına olumlu katkıları olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak; araştırdığımız parametrelerin serum ve FS düzeylerinin İVF başarısına etkisi olmadığı; serum folat düşüklüğünün PKOS etyopatogenezinde, serum homosistein yüksekliğinin ve FS demir düşüklüğünün DOR etyopatogenezinde, FS TOS ve OSİ yüksekliğinin açıklanamayan infertilitede etkili olabileceği görülmektedir. Daha büyük örneklemli randomize prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

İn Vitro Fertilizasyona Giden Hastaların Serum ve Folikuler Sıvısında Vitamin, Mikroelement, Makroelement Düzeylerini ve Oksidatif ve Antioksidan Parametreleri Araştırmak

İnfertilite korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınamaması olarak tanımlanmakta ve reproduktif dönemdeki kadınların %10-15'ini etkilemektedir. Günümüzde sıklığı giderek artan infertilite nedeni ile İVF yöntemlerine başvuru artmaktadır. Bu durum İVF yöntemlerinde tedavi başarısını arttırmaya yönelik çalışmalara hız kazandırmaktadır.

Vücudumuzda bulunan vitamin ve mineraller, fertilite için gerekli olan folikulogenez, ovulasyon, embriyo gelişimi, implantasyon ve gebeliğin devamı gibi basamaklarda oldukça önemli roller üstlenmektedir. Vitamin ve mineral düzeyleri kan ve folikul sıvılarına yansımakta olup, çalışmadaki amacımız; infertilite nedeniyle İVF tedavisine giden hastalardan elde edilen serum ve folikul sıvısında vitamin B12, vitamin D, demir, Ca^{+2}, folik asit, ferritin, homosistein, TAS ve TOS düzeylerini ölçmek, infertiliteye sebep olan faktör ile araştırdığımız parametrelerin ilişkisini ortaya koymak, araştırılan parametreler ile İVF başarısı arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmaktır.

Çalışmamıza infertilite nedeniyle İCSİ-ET siklusu planlanan 80 kadın hasta dahil edildi ve hastalar infertilite etyolojisi olarak PKOS (n:20), açıklanamayan infertil (n:20), DOR (n:20) ve erkek faktör (n:20) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Tüm hastalara GnRH antagonist protokol ile KOS uygulandı. Folikuler gelişimleri TV-USG ile takip edilen hastaların iki veya daha fazla >17mm folikulu olduğunda rekombinant hCG ile ovulasyonu tetiklendi. hCG uygulamasından yaklaşık 36 saat sonra OPU işlemi uygulandı. OPU işlemi esnasında aspire edilen FS örnekleri ve aynı gün hastalardan alınan açlık venöz kan örnekleri 10 dakika 3000 rpm'de santrifuj edilip oluşan süpernatanlarından ayrılarak FS ve serumlar elde edildi. Tüm numuneler çalışacağı güne kadar -80°C'de saklandı. Hasta sayısı tamamlanınca FS ve serumlarda vitamin B12, folik asit, homosistein, vitamin D, Ca^{+2}, ferritin, demir, TAS ve TOS düzeyleri ölçüldü. OSİ' leri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar ile hastaların demografik verileri, bazal hormon değerleri, overyan stimulasyon özellikleri, embriyolojik verileri ve İVF başarısı göstergeleri arasındaki ilişki olup olmadığına bakıldı.

Sonuç olarak; araştırdığımız parametrelerin serum ve FS düzeylerinin İVF başarısına etkisi olmadığı; serum folat düşüklüğünün PKOS etyopatogenezinde, serum homosistein yüksekliğinin ve FS demir düşüklüğünün DOR etyopatogenezinde, FS TOS ve OSİ yüksekliğinin açıklanamayan infertilitede etkili olabileceği görülmektedir. Daha büyük örneklemli randomize prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: İnfertilite, İVF, mikroelement, makroelement, vitamin.

SUMMARY

Investigating In Vitro Fertilization Patients' Levels of Vitamin, Microelement, Macroelement and Oxidative and Antioxidant Parameters in Serum and Follicular Fluid.

Infertility, described as inability to conceive despite regular unprotected sex after a year, affects %10-15 of reproductive-aged women. Nowadays, due to the increased rates of infertility, admission to in vitro fertilization (IVF) methods has increased. Therefore, studies, which seek the answer of how to increase the success rates of IVF methods, proliferate.

Vitamins and minerals in the human body plays an important role in the steps, required for fertilization, such as folliculogenesis, ovulation, embryo development, implantation, and continuation of pregnancy. Vitamin and mineral levels in the body are reflected to blood and follicular fluid (FF) and the main goal of this study is investigating vitamin B12, vitamin D, iron (Fe), calcium (Ca+2), folic acid, ferritin, homocysteine, TAC (Total antioxidant capacity), and TOC (Total oxidant capacity) levels obtained from IVF patients through serums and follicular fluid and to study the relation between the levels of the mentioned substances and the IVF success.

In this study, 80 women, planned for ICSI-ET cycle due to infertility, were considered and according to the infertility etiology, the patients were classified into four groups, PCOS (n:20), unexplained infertility (n:20), DOR (n:20), and male factor (n:20). KOS were administered to all patients with GnRH antagonist protocol. Follicular development of the patients were monitored by TV-USG and their ovulation was triggered with recombinant hCG when they had two or more follicles > 17mm. OPU process was applied approximately 36 hours following the hCG application. FF samples aspired during OPU process and fasting venues blood samples drawn the same day from the patients were centrifuged for 10 minutes in 3000 rpm and FF and serums were obtained by isolating the supernatants. All samples were stored at -80°C until they are analyzed. After the completion of sample collection, vitamin B12, folic acid, homocysteine, vitamin D, calcium (Ca+2), ferritin, iron (Fe), TAC, and TOC levels were measured in the collected FFs and serums. Then, OSIs were calculated. Through analyzing the obtained results, we have investigated whether a relation exists between patients' demographic profiles, basal hormone levels, ovarian stimulation conditions, embryologic data and IVF success parameters.

In conclusion, it has been revealed that the serum and FF levels of the investigated parameters do not affect IVF success. The results suggest possible role of low serum folate on PCOS etiopathogenesis, elevated serum homocysteine and low FF iron (Fe) on DOR etiopathogenesis, elevated FF TOC and OSI on unexplained infertility. Randomized prospective studies with larger sample sizes are required.

Keywords: Infertility, IVF, microelement, macroelement, vitamin.

KAYNAKLAR

1. Soules,M.R. Prevention of infertility. Fertil Steril 1988;49:582-4.
2. Abma, Joyce C., et al. *Fertility, family planning, and women's health: new data from the 1995 National Survey of Family Growth*. Diane Publishing, 1998.
3. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine , Aging and infertility in women, Fertility and Sterility , Volume 86 , Issue 5 , S248 - S252
4. Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Öneroğlu LS. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ed. Ankara: Güneş Kitabevi 1996; 1025-30.
5. Bates GW, Garza DE, Garza MM. Clinical manifestations of hormonal changes in the menstrual cycle. Obstet Gynecol Clin North Am. 1990 Jun;17(2):299- 310.
6. Corson SL. Evaluation of the subfertile couple: the fine points. Int J Fertil Womens Med. 2001 Nov-Dec;46(6):309-14.
7. Miller PB, Soules MR. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. Obstet Gynecol. 1996 Jan;87(1):13-7.
8. Luciano AA, Peluso J, Koch EI, Maier D, Kuslis S, Davison E. Temporal relationship and reliability of the clinical, hormonal, and ultrasonographic indices of ovulation in infertile women. Obstet Gynecol. 1990 Mar;75(3 Pt 1):412-6.
9. Haney AF. Endometrial biopsy: a test whose time has come and gone. Fertil Steril. 2004 Nov;82(5):1295-6; discussion 301-2.
10. Gindoff PR, Jewelewicz R. Reproductive potential in the older woman. Fertil Steril. 1986 Dec;46(6):989-1001.
11. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril. 2003 Jan;79(1):63-8.
12. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril. 1998 Jun;69(6):1010-4.
13. Frattarelli, John L., et al. "Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles." *Fertility and sterility* 74.3 (2000): 518-524.
14. Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. Int J Gynaecol Obstet. 2005 Oct;91(1):53-7.
15. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. Fertil Steril. 1997 Jan;67(1):110-4.

16. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans FJ. The clomiphene citrate challenge test for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review. Fertil Steril. 2006 Oct;86(4):807-18.

17. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. Lancet. 1987 Sep 19;2(8560):645-7.

18. de Carvalho BR, Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sa MF. Ovarian reserve evaluation: state of the art. J Assist Reprod Genet. 2008 Jul;25(7):311-22.

19. Chang, Ming-Yang, et al. "Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies." *Fertility and sterility* 69.3 (1998): 505-510.

20. S. Kupesic and A. Kurjak; Predictors of IVF outcome by three-dimensional ultrasound; Hum. Reprod. (2002) 17 (4): 950-955.

21. Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, et al. A prospective study of predictive factors of ovarian response in 'standart' IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram. Human Reproduction 2003; 18(4): 781-787.

22. Shrestha SM, Costello MF, Sjoblom P, McNally G, Bennett M, Steigrad SJ, et al. Power Doppler ultrasound assessment of follicular vascularity in the early follicular phase and its relationship with outcome of in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet. 2006 Apr;23(4):161-9.

23. Kim SH, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Moon SY, Lee JY. Clinical significance of transvaginal color Doppler ultrasonography of the ovarian artery as a predictor of ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. J Assist Reprod Genet. 2002 Mar;19(3):103- 12.

24. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol. 2005 Apr 29;234(1-2):81-6.

25. Zebitay, Ali G., et al. "The role of ovarian reserve markers in prediction of clinical pregnancy." *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 37.4 (2017): 492-497.

26. Oei SG. The postcoital test: a controversial investigation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1998;77:123-4.

27. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Optimal evaluation of the infertile female, Fertil Steril 86(5Suppl):S264, 2006.

28. Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998; 83(129): 4177-88.

29. Ombelet, W., et al., *Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review.* Reprod Biomed Online, 2014. **28**(3): p. 300-9.

30. Barbieri RL, MD. H, In Strauss FJ, (eds) BR. Reproductive endocrinology. Pensylvania:Elsevier Inc, 5th ed, pp 839-87327. 2004:839-73.

31. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, et al. The LHRH antagonist Cetrorelix: a review. Human Reproduction Update 2000; 6(4):322-331.

32. Schlegel PN, SK. G. In vitro fertilization for male factor infertility. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; 82(3): 709-716. 1997.

33. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vdal C, et al. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetrorelix). Human Reproduction 2001;16(12), sayfa: 2533-2539.

34. Shapiro DB. An overview of GnRH antagonists in infertility treatments. Introduction. Fertility and Sterility 2003; 80 Suppl 1, sayfa: 1-7.

35. Fortune JE: Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol Reprod 1994, 50:225-232.

36. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A: Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early postpartum. Theriogenology 2004, 62:1131-1143.

37. Ross, A. C., et al. "Committee to review dietary reference intakes for vitamin D and calcium, food and nutrition board, Institute of Medicine. DRI dietary reference intakes for calcium and vitamin D." (2011).

38. Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Fissore, R., Madoux, S., Ozil, J. P. 2002. "Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number", Developmental biology, 250(2), 280-291.

39. Ozil, J. P., Bernadette, B., Szabolcs, T., Pan, H., Schultz, R. M. 2006. "Ca(2+) oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term", Developmental biology, 300(2), 534-544.

40. Bos-Mikich, A., Whittingham, D. G., Jones K. T. 1997. "Meiotic and mitotic Ca(2+) oscillations affect cell composition in resulting blastocysts", Developmental biology, 182(1), 172-179.

41. McDougall, A., Shearer, J., Whitaker, M. 2000. "The initiation and propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs", Biology of the Cell, 92(3-4), 205-214.

42. Csordás, G, Hajnóczky, G. 2009. "SR/ER–mitochondrial local communication: Calcium and ROS", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1787(11), 1352-1362.

43. Ebner, T., Oppelt, P., Wober, M., Staples, P., Mayer, R. B., Sonnleitner, U., Bulfon-Vogl, S., Gruber, I., Haid, A. E., Shebl, O. 2015. "Treatment with Ca2+ ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: a prospective multicenter study", Human Reproduction, 30(1), 97-102.

44. Tola, E. N., Mungan, M. T., Uguz, A. C., Naziroglu, M. 2013. "Intracellular Ca 2+ and antioxidant values induced positive effect on fertilisation ratio and oocyte quality of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilisation", Reproduction Fertility Development, 25(5), 746-752.

45. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. Nat Genet 1997;16(4):391–396.

46. Johnson LE, DeLuca HF. Vitamin D receptor null mutant mice fed high levels of calcium are fertile. J Nutr 2001;131(6):1787–1791.

47. Heaney, R. P. 2008. "Vitamin D in health and disease", Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 3(5), 1535-1541.

48. Stephanou, A., Ross, R., Handwerger, S. 1994. "Regulation of human placental lactogen expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3", Endocrinology, 135(6), 2651-2656.

49. Barrera, D. Avila, E., Hernandez, G., Halhali, A., Biruete, B., Larrea, F., Diaz, L. 2007. "Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol", The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 103(3), 529-532.

50. Daftary, G. S., Taylor, H. S. 2006. "Endocrine regulation of HOX genes", Endocrine reviews, 27(4), 331-355.

51. Ozkan, S., Jindal, S., Greenseid, K., Shu, J., Zeitlian, G., Hickmon, C., Pal, L. 2010. "Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization", Fertility and sterility, 94(4), 1314-1319.

52. Rudick, B. J., Ingles, S. A., Chung, K., Stanczyk, F. Z., Paulson, R. J. Bendikson, K. A. 2014. "Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donor-recipient cycles", Fertility and sterility, 101(2), 447-452.

53. Avşar, Ayşe Filiz Yavuz, Emre E. Taş, and Gülin Yeğin Akçay. "B-12 vitamini ve infertilite." *Ankara Medical Journal* 13.2 (2013).

54. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM,Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. Obstet Gynecol 2000; 95: 519-24.

55. 3-Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocysteine metabolic defects and risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. Placenta 1999; 20: 519-29.

56. Haggarty P, McCallum H, Andrews K, Duthie S, McNeill G, Templeton A, Haites N, Campbell D, Bhattacharya S, Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilization: prospective cohort study. Lancet 2006; 367:1513-19.

57. Mitchell LM, Robinson JJ, Watt RG, McEvoy TG, Ashworth CJ, Rooke JA, Dwyer CM. Effects of cobalt/vitamin B12 status in ewes on ovum development and lamb viability at birth. Reprod Fertil Dev. 2007;19(4):553-62.

58. Ronnenberg AG,Venners SA, Xu X, Chen C, Wang L, Guang W, Huang A, Wang X.Preconception B vitamin and homocysteine status, conception,and early pregnancy loss. Am J Epidemiol 2007;2-9.

59. Gulden KD, Pernicious anemia, vitiligo, and infertility. J Am Board Fam Pract. 1990;3(3):217-20.

60. Çelebi S, Nalcacı M, Küçükkaya R ve ark. Kobalamin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan infertilite: Üç olgu sunumu. XXVIII Ulusal Hematoloji Kongresi, İzmir: 2-4 Kasım 2000:178-202.

61. Asma S, Boğa C, Özdoğu H. Vitamin B 12 tedavisiyle gebelikleri gerçekleşen 2 infertil olgunun sunusu. XXX . Ulusal Hematoloji Kongresi, Özet kitabı, Sayfa 163, bildiri özet no 286, poster no 202, 2002.

62. Nelen WL,Bloom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a metaanalysis. Fertil Steril 2000; 74: 1196-99.

63. Gaskins, A. J., Chiu, Y. H., Williams, P. L., Ford, J. B., Toth, T. L., Hauser, R., Chavarro, J. E. 2015. "Association between serum folate and vitamin B-12 and outcomes of assisted reproductive technologies", The American journal of clinical nutrition, 102(4), 943-950.

64. Boxmeer JC, Brouns RM, Lindemans J, et al. Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. Fertil Steril. 2008;89(6):1766–1770.

65. Boxmeer JC, Macklon NS, Lindemans J, et al. IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. Hum Reprod. 2009;24(5):1059–1066.

66. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, et al. Use of multivitamins, intake of B vitamins, and risk of ovulatory infertility. Fertil Steril. 2008;89(3):668–676.

67. Gaskins AJ, Chavarro JE, Diet and Fertility: A Review, American Journal of Obstetrics and Gynecology (2017), doi: 10.1016/j.ajog.2017.08.010.

68. Szymański, W., Kazdepka-Ziemińska, A. 2003. "Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity", Ginekologia polska, 74(10), 1392-1396.

69. Ueland, P. M., Refsum, H., Stabler, S. P., Malinow, M. R., Andersson, A., Allen, R. H. (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin Chem 39,1764-1779.

70. Refsum, H., Smith, A. D., Ueland, P. M., Nexo, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C., Scott, J. M. (2004) Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem 50,3-32.

71. Upchurch, G. R., Jr., Welch, G. N., Fabian, A. J., Freedman, J. E., Johnson, J. L., Keaney, J. F., Jr., Loscalzo, J. (1997) Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem 272,17012-17017.

72. Heydrick, S. J., Weiss, N., Thomas, S. R., Cap, A. P., Pimentel, D. R., Loscalzo, J., Keaney, J. F., Jr. (2004) L-Homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce 12 endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. Free Radic Biol Med 36,632-640

73. Refsum, H., Ueland, P. M., Nygard, O., Vollset, S. E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 49,31-62.

74. Loscalzo, J. (2009) Homocysteine-mediated thrombosis and angiostasis in vascular pathobiology. J Clin Invest 119,3203-3205.

75. Kupferminc, Michael J., et al. "Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy." New England Journal of Medicine 340.1 (1999): 9-13.

76. Nafiye, Y., Sevtap, K., Muammer, D., Emre, O., Senol, K., Leyla, M. 2010. "The effect of serum and intrafollicular insulin resistance parameters and homocysteine levels of nonobese, nonhyperandrogenemic polycystic ovary syndrome patients on in vitro fertilization outcome", Fertility and sterility, 93(6), 1864-1869.

77. Jerzak, M., L. Putowski, and W. Baranowski. "Homocysteine level in ovarian follicular fluid or serum as a predictor of successful fertilization." Ginekologia polska 74.9 (2003): 949-952.

78. Pacchiarotti, Arianna, et al. "The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome." Journal of assisted reproduction and genetics 24.10 (2007): 459-462.

79. Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., Willet, W. C. 2006. "Iron intake and risk of ovulatory infertility", Obstetrics & Gynecology, 108(5), 1145-1152.

80. Buhling, K. J., Grajecki, D. 2013. "The effect of micronutrient supplements on female fertility", Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 25(3), 173-180.

81. Mantzavinos, T., Dalamanga, N., Hassiakos, D., Dimitriadou, F., Gregoriou, O., Zourlas, P. A. 1992. "Immunoglobulins IgG, IgA, IgM, complement C3, C4 and ferritin and transferrin levels in serum and follicular fluid in IVF patients", Clinical and experimental obstetrics & gynecology, 20(1), 32-36

82. La Vecchia, I. Paffoni, A., Castiglioni, M., Ferrari, S., Bortolus, R., Ferraris, F. C. Bettinardi, N., Somigliana, E., Parazzini, F. 2017. "Folate, homocysteine and selected vitamins and minerals status in infertile women", The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care, 22(1), 70-75.

83. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant, Food Chem Toxic. 1994; 32:671-683.

84. Dündar Y ve Aslan R. Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar. Cerrahi Tıp Bilim Dergisi. 1999;2:134-142.

85. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Pres 1999.

86. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem. 2007 Sep;18(9):567-79.

87. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres Türk Biyokimya Dergisi 2006; 31(2);51–6.

88. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. APMIS. 2007 Feb;115(2):81-103.

89. Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, ve ark. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. Düşünen Adam 2005; 18(3):129-35.

90. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. Dicle Tıp Dergisi, 2008; 35(3):211-5.

91. Halliwell B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. Med Biol. 1984;62(2):71-7.

92. Vural H, Demir CV, Yılmaz N, Eren İ. Alzheimer hastalığında total antioksidan kapasitenin araştırılması. TAD 2007; 5(2): 63-66.

93. Gürsoy Ş. Düzenli Spor Yapan Öğrenci Gruplarında Egzersizin Total antioksidan Kapasite ve Serum Lipit Profilleri Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Malatya: İnönü Üniversitesi, 2008.

94. Morera-Fumero AL, Díaz-Mesa E, Abreu-Gonzalez P, Fernandez-Lopez L,Guillen-Pino F. A three-month longitudinal study of changes in day/night serum total antioxidant capacity in paranoid schizophrenia. PLoS One. 2017 Dec 8;12(12):e0189348.

95. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 2004; 37: 277–85.

96. Erel, O., A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem, 2004a, 37(4), 277-285.

97. Rabus, M., Demirbag, R., Sezen, Y., Konukoglu, O., Yildiz, A., ve ark., Plasma and tissue oxidative stress index in patients with rheumatic and degenerative heart valve disease. Turk Kardiyol Dern Ars, 2008, 36(8), 536-540.

98. Aslan, M., Cosar, N., Celik, H., Aksoy, N., Dulger, A. C., ve ark., Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism. Endocrine, 2011, 40(2), 285-289.).

99. Sugino, N. 2005. "Reactive oxygen species in ovarian physiology", Reproductive medicine and biology, 4(1), 31-44.

100. Paszkowski, T., Traub, A., Robinson, S. Y., McMaster, D. 1995. "Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid", Clinica Chimica Acta, 236(2), 173-180.

101. Jozwic M, Wolczynski S, Szamatowich M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. Mol Hum Reprod 1999;5(5):409-13.

102. Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y, Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. Mol Hum Reprod 2000;6(1):19-25.

103. Yang, H. W., Hwang, K. J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K. W., Oh, K. S. 1998. "Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos", Human reproduction, 13(4), 998-1002.

104. Özkaya, M. O., Nazıroğlu, M. 2010. "Multivitamin and mineral supplementation modulates oxidative stress and antioxidant vitamin levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization", Fertility and sterility, 94(6), 2465-2466.

105. Briggs DA, Sharp DJ, Miller D, Gosden RG. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-nova expression by granulosa cells. Mol Hum Reprod 1999;5(12):1107-14.

106. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. Int J Fertil Womens Med 2000;45(5):314-20.

107. Luddi, A., Capaldo, A., Focarelli, R., Gori, M., Morgante, G., Piomboni, P., De Leo, V. 2016. "Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF", Reproductive Biology and Endocrinology, 14(1), 57.

108. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. K. 2005. "Role of oxidative stress in female reproduction", Reproductive biology and endocrinology, 3(1), 28.

109. Oyawoye, O., Abdel Gadir, A., Garner, A., Constantinovici, N., Perrett, C., Hardiman, P. 2003. "Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome", Human reproduction, 18(11), 2270-2274.

110. Bedaiwy, M. A., Elnashar, S. A., Goldberg, J. M., Sharma, R., Mascha, E. J., Arrigain, S., Agarwal, A., Falcone, T. 2012. "Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome", Gynecological Endocrinology, 28(1), 51-55.

111. Palini, S. Benedetti, S., Tagliamonte, M. C., De Stefani, S., Primiterra, M., Polli, V., Rocchi, P., Catalani, S., Battistelli, S., Canestrari, F., Bulletti, C. 2014. "Influence of ovarian stimulation for IVF/ICSI on the antioxidant defence system and relationship to outcome", Reproductive biomedicine online, 29(1), 65-71.

112. Alpay Z, Saed GM, Diamond MP. Female infertility and free radicals: potential role in adhesions and endometriosis. J Soc Gynecol Investig 2006;13(6):390-8.

113. Wang Y, Sharma RK, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. Fertil Steril 1997:68(5):826-30.

114. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. Fertil Steril 2006; 86: S111–S114.

115. Rotterdam E-S (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil and steril 81:19–25).

116. Wiksten-Almstromer M, Hirschberg AL, Hagenfeldt K. Prospective follow-up of menstrual disorders in adolescence and prognostic factors. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica. 2008;87(11):1162-8.

117. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. J Clin Endocrinol Metab 1961;21:1440–7

118. Fruzzetti F, Perini D, Lazzarini V, Parrini D, Genazzani AR. Hyperandrogenemia influences the prevalence of the metabolic syndrome abnormalities in adolescents with the polycystic ovary syndrome. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2009 May;25(5):335-43.

119. Lauritsen MP, Bentzen JG, Pinborg A, Loft A, Forman JL, Thuesen LL, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Mullerian hormone. Human reproduction. 2014 Apr;29(4):791-801.

120. Witchel SF, Oberfield S, Rosenfield RL, Codner E, Bonny A, Ibanez L, et al. The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome during Adolescence. Hormone research in paediatrics. 2015 Apr 01.

121. Cooper, T. G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., ... & Vogelsong, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update, 16(3), 231-245.

122. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. Fertil Steril. 2012;98(6):1407–15.

123. Ferraretti AP, Gianaroli L. The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision? Hum Reprod. 2014;29(9):1842–5.

124. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. Hum Reprod. 2011; 26(7):1616–24.

125. Sills ES, Alper MM, Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2009;146(1):30–6.

126. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 2005;38:1103-11).

127. Broughton, Darcy E., and Kelle H. Moley. "Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact." Fertility and sterility 107.4 (2017): 840-847.

128. Sharara FI, Scott JRT, Seifer DB. The detection of diminished ovar- ian reserve in infertile women. Am J Obstet Gynecol. 1998;179(3): 804–12.

129. Loy, See Ling, et al. "Age-related nomograms for antral follicle count and anti-Mullerian hormone for subfertile Chinese women in Singapore." PloS one 12.12 (2017): e0189830.

130. Baker, Valerie L., et al. "Multivariate analysis of factors affecting probability of pregnancy and live birth with in vitro fertilization: an analysis of the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System." Fertility and sterility 94.4 (2010): 1410-1416.

131. Malizia, Beth A., Michele R. Hacker, and Alan S. Penzias. "Cumulative live-birth rates after in vitro fertilization." New England Journal of Medicine 360.3 (2009): 236-243.

132. ASRM. Female age-related fertility decline: Committee Opinion No. 589. Fertil Steril. 2014; 101:633–4.

133. Baker, T. G. "A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries." Proc. R. Soc. Lond. B. Vol. 158. No. 972. The Royal Society, 1963.

134. Block, Erik. "Quantitative morphological investigations of the follicular system in women." Cells Tissues Organs 14.1-2 (1952): 108-123.

135. Faddy, M. J., et al. "Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause." Human reproduction 7.10 (1992): 1342-1346.

136. Cetinkaya, Mehmet B., et al. "Reproductive outcome of women 43 years and beyond undergoing ART treatment with their own oocytes in two Connecticut university programs." Journal of assisted reproduction and genetics 30.5 (2013): 673-678.

137. Sayadyan, A., and E. Totoyan. "Ovarian Reserve and Effectiveness of Ivf In Women of Various Age Groups." Georgian medical news 268-269 (2017): 67-72.

138. Centers for Disease Control and Prevention. Reporting of pregnan- cy success rates from assisted reproductive technology (ART) pro- grams. Department of Health and Human Services; 2015. Contract No. 2015–21108.

139. Toner, James P., et al. "Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age." Fertility and sterility 55.4 (1991): 784-791.

140. Broekmans, Frank JM, et al. "Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis." Fertility and sterility 79.5 (2003): 1091-1100.

141. Richards JS, Jonassen JA, Kersey K. Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. Endocrinology . 1980;107(3):641–648.

142. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Hum Reprod . 1986;1(2):81–87.

143. Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. Hum Reprod Update . 2011;17(1):17–33.

144. Tannus, Samer, et al. "Prevalence, clinical characteristics, and reproductive outcomes of polycystic ovary syndrome in older women referred for tertiary fertility care." Archives of gynecology and obstetrics (2017): 1-6.

145. Polyzos, Nikolaos P., and Paul Devroey. "A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel?." Fertility and sterility 96.5 (2011): 1058-1061.

146. Heijnen, E. M. E. W., et al. "A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome." Human reproduction update 12.1 (2005): 13-21.

147. Esinler, Ibrahim, et al. "Outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with polycystic ovary syndrome or isolated polycystic ovaries." Fertility and sterility 84.4 (2005): 932-937.

148. Sahu, Banchhita, et al. "Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome." Archives of gynecology and obstetrics 277.3 (2008): 239-244.

149. McCormick, Betsy, et al. "Effects of polycystic ovarian syndrome on in vitro fertilization–embryo transfer outcomes are influenced by body mass index." Fertility and sterility 90.6 (2008): 2304-2309.

150. Swanton, Alexander, et al. "IVF outcome in women with PCOS, PCO and normal ovarian morphology." European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 149.1 (2010): 68-71.

151. Cupisti, Susanne. "Komplikation bei Ovulationsinduktion. Das ovarielle Überstimulationssyndrom." Geburtshilfe und Frauenheilkunde 72.09 (2012): 798-801.

152. Centers for Disease Control and Prevention. Assisted reproductive technology reports and resources. http://www.cdc.gov/art/ARTReports.htm (Accessed on August 24, 2015).

153. Jackson, I. D., Doig, W., & Mcdonald, G. (1967). Pernicious anemia as a cause of infertility. *The Lancet*, *290*(7527), 1159-1160.

154. Marty, H. (1984). Pernicious anemia as cause of secondary sterility. Schweizerische medizinische Wochenschrift, 114(5), 178-179.

155. Sanfilippo, J. S., and Y. K. Liu. "Vitamin B12 deficiency and infertility: report of a case." International journal of fertility 36.1 (1991): 36-38.

156. Westphal, Lynn M., Mary L. Polan, and A. Sontag Trant. "Double-blind, placebo-controlled study of Fertilityblend: a nutritional supplement for improving fertility in women." Clinical and experimental obstetrics & gynecology 33.4 (2006): 205-208.

157. Thomson, Rebecca L., Simon Spedding, and Jonathan D. Buckley. "Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome." Clinical endocrinology 77.3 (2012): 343-350.

158. Li, Y., et al. "Vitamin d status in follicular fluid of young women with diminished ovarian reserve and the role in regulating anti-mullerian hormone expression." Fertility and Sterility 102.3 (2014): e152.

159. Maroulis GB. Effect of aging on fertility and pregnancy. Semin Rep- rod Med 1991; 9: 165-75. [CrossRef]

160. Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Summary Report 2012 https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx?ClinicPKID=0 (Accessed on August 24, 2015).

161. Kasius, Annemieke, et al. "Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis." Human reproduction update 20.4 (2014): 530-541.

162. Sunkara, Sesh Kamal, et al. "Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles." Human reproduction 26.7 (2011): 1768-1774.

163. Steward, Ryan G., et al. "Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome and live birth: an analysis of 256,381 in vitro fertilization cycles." Fertility and sterility 101.4 (2014): 967-973.

164. Van Loendersloot, L. L., et al. "Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis." Human reproduction update 16.6 (2010): 577-589.

165. Maheshwari, Abha, Lawrize Stofberg, and Siladitya Bhattacharya. "Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review." Human reproduction update 13.5 (2007): 433-444.

166. Luke, Barbara, et al. "Female obesity adversely affects assisted reproductive technology (ART) pregnancy and live birth rates." Human Reproduction 26.1 (2010): 245-252.

167. Bellver, José, et al. "Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors." Fertility and sterility 100.4 (2013): 1050-1058.

168. Petersen, Gitte Lindved, et al. "The influence of female and male body mass index on live births after assisted reproductive technology treatment: a nationwide register-based cohort study." Fertility and sterility 99.6 (2013): 1654-1662.

169. Provost, Meredith P., et al. "Pregnancy outcomes decline with increasing body mass index: analysis of 239,127 fresh autologous in vitro fertilization cycles from the 2008–2010 Society for Assisted Reproductive Technology registry." Fertility and sterility 105.3 (2016): 663-669.

170. Norman, Robert J., et al. "Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management." Human reproduction update 10.3 (2004): 267-280.

171. Ebisch, I. M. W., et al. "Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub) fertile couple." *Human reproduction* 21.7 (2006): 1725-1733.

172. Fatemi, Farnaz, et al. "Role of vitamin E and D 3 supplementation in Intra-Cytoplasmic Sperm Injection outcomes of women with polycystic ovarian syndrome: A double blinded randomized placebo-controlled trial." Clinical Nutrition ESPEN 18 (2017): 23-30.

173. Aleyasin, Ashraf, et al. "Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology." European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 159.1 (2011): 132-137.

174. Firouzabadi, Razieh Dehghani, et al. "Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program." Archives of gynecology and obstetrics 289.1 (2014): 201-206.

175. Franasiak, Jason M., et al. "Vitamin D levels do not affect IVF outcomes following the transfer of euploid blastocysts." American journal of obstetrics and gynecology 212.3 (2015): 315-e1.

176. Wdowiak, Artur, Edyta Wdowiak, and Iwona Bojar. "Evaluation of trace metals in follicular fluid in ICSI-treated patients." Annals of Agricultural and Environmental Medicine (2017).

177. Pasqualotto, Eleonora B., et al. "Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures." Fertility and sterility 81.4 (2004): 973-976.

178. Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, et al. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. Fertil Steril 2008;89:912–21

179. Oral O, Kutlu T, Aksoy E, et al. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. J Assist Reprod Genet 2006;23:81–5

180. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid embryo quality marker in IVF? Hum Reprod 2006;21:2403–7

181. Yalçınkaya E, Çakıroğlu Y, Doğer E, et al. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. J Turkish-German Gynecol Assoc 2013;14:136–41

182. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, et al. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. Fertil Steril 2004;82:1171–6

183. Demir, B., et al. "Follicular fluid total oxidant status is a determining factor for IVF success in poor responders." Fertility and Sterility 100.3 (2013): S426.

184. Oyawoye, Oluseye A., et al. "The interaction between follicular fluid total antioxidant capacity, infertility and early reproductive outcomes during in vitro fertilization." Redox Report 14.5 (2009): 205-213.

185. Aydin, Yunus, et al. "Relationship between oxidative stress and clinical pregnancy in assisted reproductive technology treatment cycles." Journal of assisted reproduction and genetics 30.6 (2013): 765-772.

186. Kazemi, Ashraf, Fatemeh Ramezanzadeh, and Mohammad Hosein Nasr-Esfahani. "The relations between dietary antioxidant vitamins intake and oxidative stress in follicular fluid and ART outcomes." Iranian journal of reproductive medicine 13.9 (2015): 533.

187. Berker, Bülent, et al. "Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction." Human reproduction 24.9 (2009): 2293-2302.

188. Nasiri, Nahid, et al. "Abdominal obesity can induce both systemic and follicular fluid oxidative stress independent from polycystic ovary syndrome." European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 184 (2015): 112-116.

189. Ziobro, A. N. N. A., and G. R. Z. E. G. O. R. Z. Bartosz. "A comparison of the total antioxidant capacity of some human body fluids." Cellular and Molecular Biology Letters 8.2 (2003): 415-420.

190. Aejmelaeus, Riitta T., et al. "Age-related changes in the peroxyl radical scavenging capacity of human plasma." Free Radical Biology and Medicine 23.1 (1997): 69-75.