

OVÜLASYON İNDÜKSİYONU YAPILAN HASTALARDA FOLLİKÜLER GELİŞİM DÖNEMİNDE SERUM MALONDİALDEHİD VE NİTRİK OKSİT SEVİYELERİ

Mekin SEZİK¹, Okan ÖZKAYA¹, Ümmühan D. TOROS²,
Mukaddes ÇOLAKOĞULLARI³, Hakan KAYA^{4*}

ÖZET:

Amaç: İnfertilite nedeniyle, intrauterin inseminasyon siklusunda ovülasyon indüksiyonu alan hastalarda lipid peroksidasyon durumu ve nitrik oksit düzey değişikliklerinin prospektif olarak araştırılması.

Çalışmanın Yapıldığı Yer: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği.

Materyal ve Metod: Ovülasyon indüksiyonu yapılan 8 kadından alınan 48 kan örneği çalışmaya dahil edildi. Tüm kadınlara step-up protokolü ile kontrollü ovülasyon indüksiyonu uygulandı. Siklusun 1, 5, 7, 9, 11 ve 13. günlerinde hastalardan alınan kan örneklerinden östradiol, malondialdehid ve nitrik oksit çalışıldı. Östradiol, malondialdehid ve nitrik oksit düzeylerinin ilk günden itibaren olan değişiklikleri Friedman nonparametrik testi ile araştırıldı. $P<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, vücut kitle indeksi ve infertilite süreleri arasında fark yoktu. Siklus başlangıcından itibaren östradiol düzeyi anlamlı olarak ($p<0.0001$) artarken malondialdehid düzeyinde anlamlı değişiklik yoktu ($p=0.8$). Ortalama nitrik oksit düzeyinde ise anlamlı olmayan ($p=0.2$) azalma eğilimi saptandı.

Sonuç: Ovülasyon indüksiyonu sırasında lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal hasar varlığının araştırılması, östrojenin bu durumlardaki rolünün belirlenmesi için geniş serili, oksidan ve antioksidan sistemin beraber değerlendirildiği çalışmalara gereksinim vardır. (Türk Fertil. Der. 2005; 13:116-120).

Anahtar Kelimeler: Ovülasyon İndüksiyonu, Östradiol, Malondialdehid, Nitrik Oksit

SERUM MALONDIALDEHYDE AND NITRIC OXIDE VALUES DURING OVULATION INDUCTION FOR FOLLICULAR MATURATION

SUMMARY:

Objective: To prospectively evaluate changes in lipid peroxidation status and nitric oxide values during ovulation induction following intrauterine insemination for infertility treatment.

Institution: Süleyman Demirel University, School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology

Material and Methods: Forty-eight blood samples from 8 women undergoing ovulation induction treatment were included. All women received step-up controlled ovulation induction. Estradiol, malondialdehyde, and nitric oxide levels were determined on cycle days 1,5,7,9,11, and 13. Friedman nonparametric tests were used to evaluate the change in values over time. $P<0.05$ was considered significant.

Results: Age, body mass index, and infertility duration of the patients were comparable with no significant differences. Mean estradiol values increased significantly ($p<0.0001$) throughout the menstrual cycle, whereas mean malondialdehyde concentrations did not significantly ($p=0.8$) change over time. Although not significant ($p=0.2$), mean nitric oxide values had a tendency to decrease throughout the cycle.

Conclusion: Comprehensive investigations evaluating oxidant-antioxidant systems with lipid peroxidation and free radical damage during ovulation induction should be encouraged. (Turkish J. Fertil., 2005; 13:116-120).

Keywords: ovulation induction, estradiol, malondialdehyde, nitric oxide.

1 Yrd. Doç. Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hast. ve Doğum Anabilim Dalı, Isparta.

2 Asistan Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hast. ve Doğum Anabilim Dalı, Isparta.

3 Uzman Dr., Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.

4 Doç. Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hast. ve Doğum Anabilim Dalı, Isparta.

GİRİŞ:

Günümüzde infertilite tedavisinde ovülasyon indüksiyonu en sık kullanılan tedavi yaklaşımıdır. Yaş artışı ile özellikle menopoz döneminde kadınların koroner arter hastalıklarına yakalanma riski ve buna bağlı maternal morbidite ve mortalite yükselmektedir (1,2). Serbest radikaller birçok fizyolojik veya patolojik durumda üretilen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan herhangi bir atom veya molekülerdir (3). Serbest radikaller birçok enzimatik ve nonenzimatik reaksiyon ile oluşabilirken lipid, karbonhidrat, protein gibi birçok makromolekül üzerine etki göstermektedirler (4). Serbest radikal oluşumu ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonuna ve sonuçta aldehidik ürün olan malondialdehid (MDA) oluşumuna neden olmaktadır (5). Yani MDA lipid peroksidasyonunu gösteren bir belirteçtir. Oksidan ve antioksidan dengenin oksidan lehine dönmesi oksidatif stres olarak tanımlanmakta ve bu da lipid peroksidasyonu sırasında serbest radikal oluşumunu artırmaktadır (3).

Nitrik oksit birçok sistemde, özellikle vasküler geçirgenlik, tonüs ve pıhtılaşma üzerine önemli rol oynamaktadır. Ayrıca; nitrik oksit (NO) hidroksi radikal, süperoksit anyon ve hidrojen peroksit gibi oksidatif stres sonrasında salınabilen bir serbest radikal olarak da değerlendirilmektedir. Bu moleküllerin artışı veya antioksidan sistemin yetersizliği durumunda lipid peroksidasyonunda artış, hücre işlev bozukluğu ve hücre ölümü olmaktadır (6). Vücutta oksidan sistemi dengelemek için glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler de görev almaktadır (6). NO, apoptozis için önemli bir düzenleyici olmakla beraber kadın üreme fonksiyonları için de önemli bir modulatördür. Follikülogenezi, oosit matürasyonunu, fertilizasyonu ve implantasyonu NO etkileyebilmektedir (7).

Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) serbest oksijen radikalleri tarafından arterial intima bölgesinde oksitlenir. Birçok in vitro çalışmada östrojenin antioksidan görev yapıp LDL oksidasyonunu engellediği saptanmıştır (2,8). Bu çalışmada ovülasyon indüksiyonu yapılan infertil hastalarda kısa süre içerisinde artan östrojene bağlı olarak lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeyinde ve bir serbest radikal olan

NO düzeyinde anlamlı bir değişiklik olup olmadığı araştırıldı.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamıza infertilite nedeniyle kliniğimize başvuran, ovülasyon indüksiyonu alan toplam 8 kadından alınan 48 kan örneği dahil edildi. Tüm kadınlara step-up protokolü ile kontrollü ovülasyon indüksiyonu uygulandı (goserelin asetat 3.6 mg 1x1 sc ve rekombinant FSH ampül). Siklusun 1, 5, 7, 9, 11 ve 13. günlerinde hastalardan antekübit al venden östradiol, MDA ve NO çalışılması için kan alındı. Çalışmadaki hastaların hepsi 40 yaş altında bilinen bir sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç veya E vitamini dahil vitamin preparatı kullanmayan, obez (BMI > 25 kg/m²) olmayan, sigara ve alkol kullanmayan kadınlardı.

Serum MDA incelemesi Kamal ve arkadaşlarının (9) protokolü ile yapılmıştır. Özet olarak, 10 dakika 1500 devirde santrifüjü takiben elde edilen 0.25 ml serum, %20'lik 2.5 ml triklorasetik asit ve %67'lik 1 ml tiobarbitirik asit ile karıştırılmıştır ve bu karışım 30 dakika çok sıcak suda inkübe edilmiştir. Kaynamadan sonra karışıma 4 ml butanol eklenmesini takiben soğutulmuştur. Bu da 3000 devirde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen ürünün spektrofotometrik olarak absorbansı 535 nanometrede (Shimadzu UV-1202, Japan) ölçülmüştür. Sonuçlar nmol/ml olarak verilmiştir. 1,1,3,3-tetraoksipropene MDA standartlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Serum nitrat incelemesi Schmidt ve arkadaşları (10) ile Moshage ve arkadaşları (11) tarafından tanımlanmakla birlikte nitrat, nitrat redüktaz tarafından enzimatik konversiyon sonrası nitrit olarak ölçülmüştür. Kısaca 100 BL serum 4 kat distile su ile seyreltilmiştir. Aspergillus spp. dan NADPH, FAD, nitrat redüktaz son ürüne 50 mmol/l, 5 mmol/l, 200 U/l sırasıyla eklenmiştir. Örnekler sırası ile 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiş ve tavşan kasından elde edilen tavşan laktat dehidrogenazdan 7460 U/L ve 10 mmol/l Na pirüvat karıştırılmıştır. Örnekler ayrıca oksitlenmiş NADPH da 37 °C'de 20 dakika inkübe edilmiş ve 15 gr/l son konsantrasyona ulaşmak için 1/20'lik çinko sülfat solüsyonu eklenerek deproteinize edilmiştir. Oda sıcaklığında 10,000 devirde 5 dakika santrifüj sonrası elde edilen 100 BL ürün "mikrotiter plate well" içine

yerleştirilmiştir. Gries solüsyonundan üzerine 100 BL eklenmiştir (1 gr/L sülfanilamid, 25 gr/L fosforik asit ve 0.1 g/L N-1-naphthylethylenediamine). Oda sıcaklığında 10 dakika renk gelişiminden sonra "mikroplate" okuyucu (FlashScan S12, Analytikjena, Almanya) kullanılarak absorbans 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Distile suda hazırlanan potasyum nitrath çözelti ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinden hesaplama yapıldı.

İstatistiksel analizde, Windows SPSS 8.0 programı kullanıldı. Hastalardan elde edilen 1, 5, 7, 9, 11 ve 13. günlerdeki kan örneklerinden elde edilen östradiol (E_2), MDA ve NO değerleri ortalama $\pm$ standart sapma ($\text{Ort} \pm \text{SD}$) olarak belirlendi. Östradiol, MDA ve NO düzeylerinin ilk günden itibaren olan değişiklikleri Friedman nonparametrik testi ile karşılaştırıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

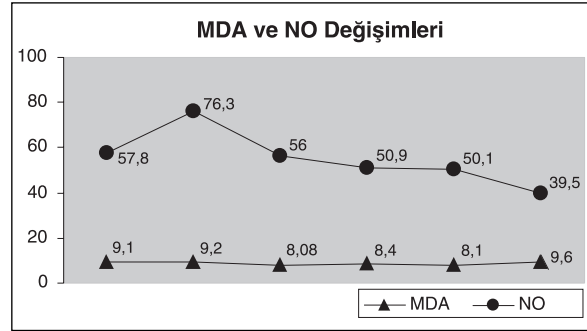
Çalışmaya katılan hastaların demografik özellikleri tablo I'de gösterilmiştir. Hastaların yaş, vücut kitle indeksi ve infertilite süreleri arasında fark yoktu.

Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri

Yaş (yıl)	30.1 $\pm$ 4.9
Vücut kitle indeksi (kg/m^2)	26.2 $\pm$ 3.4
İnfertilite süresi	9.01 $\pm$ 4.4

Siklusun 1, 5, 7, 9, 11 ve 13. günlerinde alınan kanlardan çalışılan E_2 , MDA ve NO değerleri tablo II'de gösterilmiştir.

Siklus başlangıcından itibaren ortalama E_2 değerleri artarak ilk gün ile karşılaştırıldığında diğer günlerde anlamlı olarak daha yüksekti. Bununla beraber MDA düzeylerinde anlamlı değişiklik yok iken ortalama



ma NO düzeyleri siklusun ilk günlerindeki artıştan sonra, ilerleyen günlerde düşüş eğilimi gösteriyordu; fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Siklus başlangıcından itibaren MDA ve NO düzeylerindeki değişim Şekil 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Ateroskleroz yaş ile beraber artmakta olup, özellikle hipoöstrojenik hastalarda LDL ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyini ilgilendiren değişiklikler aterosklerotik lezyon oluşumunda önemli rol oynamaktadır (2). LDL serbest radikaller tarafından oksidize edilir ve bu LDL çok hızlı bir şekilde makrofajlara alınır. Biriken makrofajlar ateroskleroz oluşumu için önemli rol oynamaktadırlar (2). Sonuçta LDL oksidasyonu ateroskleroz gelişiminde en önemli faktörlerden biridir (1). Lipit peroksidasyonu oluşmasında oksijen serbest radikallerinin artışı önemli rol oynamakta ve sonuçta MDA oluşmaktadır (5). Literatürde yapılan birçok çalışmada östrojenin antioksidan olduğu ve LDL'nin oksidasyonunu engelleyerek antioksidan rol oynayarak ateroskleroza karşı koruyucu olduğu belirtilmektedir (2). Biz çalışmamızda ovülasyon indüksiyonu sırasında kısa dönem içerisinde E_2 artışı ile lipit peroksidasyonu göstergesi olan MDA ve NO seviyelerinde bir değişiklik olup olmadığını

Tablo II. Siklusun belirli günlerindeki E_2 , MDA ve NO değerleri

	1	5	7	9	11	13	P
E_2 (pg/ml)	64 $\pm$ 22	615 $\pm$ 283	950 $\pm$ 563	1451 $\pm$ 989	1972 $\pm$ 1087	2234 $\pm$ 910	<0.0001
MDA (nmol/mL)	9.1 $\pm$ 2.1	9.2 $\pm$ 1.7	8.08 $\pm$ 3.2	8.4 $\pm$ 1.03	8.1 $\pm$ 1.4	9.6 $\pm$ 2.5	0.8
NO (Bmol/L)	57.8 $\pm$ 22.1	76.3 $\pm$ 23.1	56.08 $\pm$ 15.9	50.9 $\pm$ 21.9	50.1 $\pm$ 20.2	39.5 $\pm$ 27.3	0.2

araştırdık. Çalışmamızda hastalarda anlamlı östrojen artışı olmasına rağmen, MDA seviyesinde anlamlı değişiklik saptanmadı. Bununla beraber anlamlı olmasa da NO seviyelerinde siklusun ilerleyen günlerinde azalma eğilim saptadık.

Toplam 386 ovülasyon indüksiyonu siklusunda tarafımızdan yapılan diğer bir çalışmada farklı östrojen seviyelerindeki lipit peroksidasyon durumu araştırıldı. Özellikle E₂ seviyesi <50 pg/ml ve >300 pg/ml üzerinde lipit peroksidasyonunda artış olabileceği bulundu. Literatüre uygun olarak düşük E₂ seviyelerinde lipit peroksidasyon artışı beklenirken, yüksek E₂ seviyelerindeki artış ilginç bir sonuçtur (12). Mevcut çalışmamızda ise kısa dönemde östrojen artışı olduğu durumda belirgin bir lipit peroksidasyonu değişikliği saptamadık. Bunun nedeni vaka sayımızın azlığı olabilir.

Literatürde E₂'nin antioksidan etkisi ile LDL oksidasyonunu engellediğini ve kan lipit profili üzerine olumlu etkilerinin olduğunu belirten çok sayıda çalışma vardır. Postmenopozal toplam 23 hastanın değerlendirildiği bir yayında, östrojen tedavisi ile plazma kolesterolünde ve LDL partiküllerinde azalma, HDL partiküllerinde artış olduğu bulunmuştur (2).

NO serbest radikal olarak da değerlendirilir. NO, lipit peroksidasyonu ve kadın reproduktif işlevlerinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda follikülogenezde, oosit matürasyonunda, fertilizasyonda ve implantasyonda önemli olduğu belirtilmektedir (7). NO' in kadın reproduktif sistemine etkilerini araştıran bir çalışmada, artmış folliküler NO düzeyi ile embriyo fregmentasyonunda artış olduğu, implantasyon bozukluğu, tubal ve peritoneal faktöre bağlı infertilite ile NO yükselmesinin ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Sonuçta NO' in düşük embriyo kalitesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (7). Bizim çalışmamız süresince hastaların folliküler gelişimi yeterli ve bunun göstergesi olan E₂'nin siklusun ilerleyen günlerinde artışı anlamlı idi. Ama NO seviyelerinde anlamlı değişiklik yoktu.

Literatürdeki çalışmalarda hipoöstrojenik durumlarda belirgin lipit peroksidasyon artışı saptanırken, bazı çalışmalarda yüksek E₂ seviyelerinde de lipit peroksidasyonunda artış bulunmuştur. Mevcut çalışmamızda amacımız kısa süre içerisinde östrojen artışı

olan durumlarda veya ovülasyon indüksiyonu sırasında hastalarda lipit peroksidasyon durumunu değerlendirmektir. Çalışmada bu dönemde belirgin bir lipit peroksidasyonu değişikliği saptamadık. Bununla birlikte NO düzeylerinde anlamlı olmasa da düşüş eğilimi saptandı. Bu eğilim artan östrojen etkisiyle olabilir veya E₂ bu yolla da lipit peroksidasyonu üzerine etkide bulunuyor olabilir. Ovülasyon indüksiyonu sırasında lipit peroksidasyonunun ve serbest radikal hasar varlığının araştırılması, östrojenin bu durumlardaki rolünün belirlenmesi için geniş serili, oksidan ve antioksidan sistemin beraber değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Kaya H, Ozkaya O, Sezik M, Arslanoglu E, Yilmaztepe A, Ulukaya E. Effects of raloxifene on serum malondialdehyde, erythrocyte superoxide dismutase, and erythrocyte glutathione peroxidase levels in healthy postmenopausal women. *Maturitas* 2005; 50(3): 182-8.
2. Wakatsuki A, Ikenoue N, Sagara Y. Effects of estrogen on susceptibility to oxidation of low-density and high-density lipoprotein in postmenopausal women. *Maturitas* 1998; 28(3): 229-34.
3. Kaya H, Delibaş N, Çapar M, Tahan V, Serteser M, Özkaya MO. Gebelikte ve postpartum dönemde serbest radikal oluşumu ve antioksidan enzim düzeyleri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 1996; 3(4): 67-70.
4. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, Husain SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59(2): 163-70.
5. Kaya H, Oral B, Dittrich R, Ozkaya O. Lipid peroxidation in umbilical arterial blood at birth: the effects of breech delivery. *BJOG* 2000; 107(8): 982-6.
6. Evereklioglu C, Er H, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otlu B, Ozerol E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol* 2003; 106(2): 129-36.
7. Lee TH, Wu MY, Chen MJ, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2004; 82(1): 126-31.
8. Bekesi G, Kakucs R, Varbiro S, et al. In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids* 2000; 65(12):889-94.
9. Kamal AA, Goma A, el Khafif M, Hammad AS. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts. *Environ Res* 1989; 49(2): 173-80.

10. Schmidt HH, Warner TD, Nakane M, Forstermann U, Murad F. Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* 1992; 41(4): 615-24.

11. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation.

Clin Chem 1995; 41(6): 892-6.

12. Kaya H, Sezik M, Ozkaya O, Dittrich R, Siebzehnruhl E, Wildt L. Lipid peroxidation at various estradiol concentrations in human circulation during ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Horm Metab Res* 2004; 36(10): 693-5.