



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**DENEYSEL OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON
SENDROMU MODELİNDE YAPISAL VE VASKÜLER
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE KERSETİNİN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

İSMAİL TÜRKOĞLU

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EKİM 2021



**DENEYSEL OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON SENDROMU MODELİNDE YAPISAL VE
VASKÜLER DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE KERSETİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

İsmail TÜRKOĞLU

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İsmail TÜRKOĞLU

06 / 10 / 2021

DENEYSEL OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON SENDROMU MODELİNDE YAPISAL VE
VASKÜLER DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE KERSETİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

İsmail TÜRKOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2021

ÖZET

Ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS), yardımcı üreme teknikleri sırasında ortaya çıkabilen ciddi bir iatrojenik komplikasyondur. OHSS'ye özgü bir tedavi mevcut değildir. Durumun arkasındaki patofizyolojiyi aydınlatmak ve böylece kalıcı bir tedavi için daha fazla araştırma gereklidir. Bu çalışmada OHSS modeli oluşturulmuş sıçanlarda, Kersetinin ovaryum morfolojisine ve ilişkili olduğu VEGF/VEGFR-2, IL-6 üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 28 adet 21-22 günlük immatür dişi Wistar Albino sıçan, her grupta 7 adet olacak şekilde rastgele 4 gruba (Kontrol, KOH, OHSS ve OHSS+Kersetin) ayrıldı. Ovaryum dokusunun histo-morfolojik olarak incelenmesi için Hematoksilen-Eozin, Periyodik asit Schiff; VEGFA ve VEGFR-2 proteinlerinin ekspresyonunun değerlendirilmesi için immünohistokimyasal boyama; periton sıvısındaki IL-6, VEGFA ve serumdaki E₂ değerlerinin belirlenmesi için ELISA analizleri gerçekleştirildi. Gruplar arasında vücut ağırlığı, ovaryum ağırlık ve çapları, peritoneal sıvısındaki vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), IL-6 değerleri, serum E₂ değerleri ve VEGFA, VEGFR-2 immün ekspresyonu karşılaştırıldı. Ovaryum ağırlıkları ve çapları, periton sıvısı VEGF ve IL-6 değerleri ve VEGFA, VEGFR-2 ekspresyonu, Kersetin ile tedavi edilen sıçanlarda, tedavi edilmeyen OHSS grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük bulundu. Ayrıca ovaryumdaki yapılar değerlendirildiğinde Kersetin uygulamasının korpus luteum ve kistik yapıların sayısını OHSS'li grup ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalttığı, atretik follikül sayısını ise arttırdığı saptandı. Kersetinin OHSS bulgularını azaltan etkilere sahip olduğu belirlendi. Kersetin kullanımının OHSS'nin hem önlenmesinde hem de kontrolünde etkili olabileceği ortaya konulmuştur.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : OHSS, ovaryum, kersetin, vegf, vegfr-2, IL-6
Sayfa Adedi : 145
Danışman : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

INVESTIGATION OF EFFECT OF QUERCETIN ON STRUCTURAL AND VASCULAR CHANGES IN
EXPERIMENTAL OVARIAN HYPERSTIMULATION SYNDROME MODEL

(PH. D. Thesis)

İsmail TÜRKOĞLU

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

October 2021

ABSTRACT

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is a serious iatrogenic complication that can occur during assisted reproductive techniques. There is no specific treatment for OHSS. More research is needed to elucidate the pathophysiology behind the condition and to find a permanent treatment for it. In this study, it was aimed to investigate the effects of quercetin on ovarian morphology and related VEGF/VEGFR-2 expression and IL-6 level rat model of OHSS. 28 immature female Wistar Albino rats, 21-22 days old, were randomly divided into 4 groups (Control, KOH, OHSS and OHSS+Quercetin), 7 in each group. Hematoxylin-Eosin, Periodic acid Schiff staining for histo-morphological examination of ovarian tissue and immunohistochemical staining for evaluation of VEGFA and VEGFR-2 expression, ELISA analyzes to determine the concentration of IL-6, VEGFA in the peritoneal fluid and E₂ in the serum were performed. Body weight, ovarian weight and diameters, vascular endothelial growth factor (VEGF) and IL-6 levels of peritoneal fluid, serum E₂ levels, and ovarian expression of VEGFA and VEGFR-2 were compared between the groups. Ovarian weights and diameters, peritoneal fluid levels of VEGFA and IL-6 and ovarian VEGFA, VEGFR-2 expression were found to be significantly lower in quercetin-treated rats than in the untreated OHSS group. In addition, when the structures in the ovary were evaluated, it was found that quercetin administration significantly decreased the number of corpus luteum and cystic structures compared to the group with OHSS, and increased the number of atretic follicles. It was determined that quercetin has effects that reduce OHSS findings. It has been demonstrated that the use of quercetin can be effective both in the prevention and control of OHSS.

Science Code : 1033
Key Words : OHSS, ovary, quercetin, vegf, vegfr-2, IL-6
Page Number : 145
Supervisor : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin planlanması, çalışmaların yürütülmesi ve tamamlanmasında büyük bir özveri ile bana destek olan, asistanlığım boyunca her zaman yanımda olan, yol gösteren, bilimsel ve manevi anlamda beni her zaman destekleyen değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na,

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, akademik gelişmemde katkıları olan Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Çiğdem ELMAS hocama, bölümümüzün değerli hocaları Prof. Dr. Gülnur Take KAPLANOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN' a, bölümümüzün eski hocalarından Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a, doktora tezime katkılarından dolayı Anatomi Anabilim Dalımızın değerli hocalarından Prof. Dr. V. Tuncay PEKER'e ve tezimin planlanması ve deney çalışmalarımda bana destek olan değerli hocam Doç. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL'e,

Asistanlığım ve Doktora eğitimim boyunca bana destek ve yardımcı olan Anabilim Dalımızda görev alan, tez çalışmalarım boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan, yol gösteren sevgili Araş. Gör. Özen AKARCA DİZAKAR'a, Araş. Gör. Müşerref Şeyma CEYHAN'a, yine bölümümüz eski doktora öğrencilerinden Dr. Ayşe KÖYLÜ ve bölümümüz tüm araştırma görevlilerine, dönem arkadaşlarıma ve son olarak tanıştığım günden beri bilgisini ve tecrübesini benden eksik etmeyen, tez çalışmalarım hep yanımda olan ve beni sürekli motive eden çok değerli arkadaşım Dr. Ecz. Zübeyir ELMAZOĞLU'na teşekkür ediyorum.

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan sevgili Babam, Annem, Kız kardeşim ve Erkek Kardeşime sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Ovaryum.....	7
2.1.1. Ovaryum embriyolojisi	7
2.1.2. Ovaryum anatomisi	8
2.1.3. Ovaryum histolojisi	10
2.1.4. Follikülogenezis	11
2.1.5. Ovulasyon	16
2.1.6. Korpus Luteum	17
2.1.7. Folliküler atrezi	18
2.1.8. Ovaryan siklusun hormonal düzenlenmesi (menstrual siklus).....	19
2.2. İnfertilite	20
2.2.1. İnfertilite tanımı ve prevalansı	20
2.2.2. İnfertilite tedavi yöntemleri.....	21
2.3. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyonu (KOH).....	21

	Sayfa
2.3.1. Kontrollü ovaruan hiperstimülasyon protokol seçimi	22
2.3.2. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunda kullanılan ajanlar	22
2.3.3. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolleri.....	26
2.3.4. Kemirgenlerde süperovulasyon.....	27
2.3.5. KOH monitorizasyonu ve monitorizasyonun amaçları	28
2.4. Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS).....	28
2.4.1. OHSS'nin tanımı ve insidansı	28
2.4.2. OHSS'nin sınıflandırması.....	29
2.4.3. OHSS'nin patofizyolojisi	32
2.4.4. Sitokinler	34
2.4.5. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF).....	35
2.4.6. OHSS risk faktörleri	40
2.4.7. OHSS'nin önlenmesi	40
2.4.8. OHSS'nin tedavisi.....	41
2.5. Kersetin	42
2.5.1. Fitokimyasalların sınıflandırılması	42
2.5.2. Kersetinin moleküler yapısı ve genel özellikleri	43
2.5.3. Kersetinin antioksidan özellikleri.....	45
2.5.4. Kersetinin anti-inflamatuar etkileri	46
2.5.5. Kersetinin anti-anjiyojenik, anti-tümör etkileri	47
2.5.6. Kersetinin ovaryuma etkileri	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	51
3.1. Kullanılan Makine, Teçhizatlar ve Sarf malzemeleri	51
3.1.1. Makine ve teçhizatlar	51
3.1.2. Kullanılan kit, kimyasal ve sarf malzemeleri.....	52

	Sayfa
3.2. OHSS Sıçan Modelinin Planı, Yapılışı ve Örneklerin Toplanması	53
3.2.1. OHSS deney planı.....	53
3.2.2. Hayvan deneyinin yapılışı	54
3.2.3. Örneklerin toplanması.....	55
3.3. Deney Yöntemleri	56
3.3.1. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi.....	56
3.3.2. Periyodik asit shiff (PAS) boyaması	57
3.3.3. İmmünohistokimyasal (IHC) boyama	58
3.3.4. ELISA analizleri	59
3.4. Histolojik Değerlendirme	61
3.4.1. Kesit alma ve boyama işlemleri	61
3.4.2. Ovaryum folliküllerin ve diğer yapıların değerlendirilmesi	62
3.4.3. Histolojik bulguların 3D modellemesi.....	64
3.5. İstatistiksel Yöntem.....	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. Hayvan ve Ovaryum Dokusu Ağırlık Bulguları.....	65
4.1.1. Hayvan ağırlıkları	65
4.1.2. Ovaryum dokusu ağırlıkları.....	66
4.2. Ovaryum Dokusu Çap Ölçüm Bulguları.....	68
4.3. Makroskopik Bulgular	71
4.4. Histolojik Bulgular	71
4.4.1. Kontrol (Grup 1) grubu	71
4.4.2. Kontrollü over hiperstimülasyon (Grup 2) grubu	72
4.4.3. OHSS (Grup 3) grubu	73
4.4.4. OHSS+Kersetin (Grup 4) grubu	74

Sayfa

4.4.5. Ovaryum folliküllerinin ve diğer yapılarının sayım sonuçları	85
4.5. İmmünohistokimya Değerlendirme Sonuçları	91
4.5.1. VEGFA immünoreaktivitesinin değerlendirilmesi	91
4.5.2. VEGFR-2 immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi	92
4.6. Histolojik Bulguların Üç Boyutlu Modellenmesi	101
4.7. ELISA Bulguları	102
4.7.1. Serum Estradiol (E2) ölçüm sonuçları.....	102
4.7.2. Periton sıvındaki IL-6 ve VEGFA ölçüm sonuçları	103
5. TARTIŞMA.....	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR	123
EKLER	141
EK-1. Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi.....	142
EK-2. Etik Kurul Sertifikası	144
ÖZGEÇMİŞ	145

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. OHSS'nin sınıflandırılması.....	30
Çizelge 2.2. Ciddi ve kritik OHSS'nin karşılaştırılması	31
Çizelge 2.3. Rizk ve Aboulghar'a göre OHSS sınıflaması	31
Çizelge 2.4. OHSS risk faktörleri.....	40
Çizelge 2.5. Kersetinin etkilediği moleküler mekanizmalar	47
Çizelge 3.1. Kullanılan makine ve teçhizatların listesi.....	51
Çizelge 3.2. Kullanılan sarf malzemeleri	52
Çizelge 3.3. OHSS sıçan modeli deney planı	54
Çizelge 3.4. Kullanılan otomatik takip prosedürü	56
Çizelge 4.1. Gruplara ait ağırlıkların ve ağırlık değişimlerinin ortalama ve standart hata değerleri, n=7	65
Çizelge 4.2. Her grubun ilk ve son ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılma sonuçları, n=7	65
Çizelge 4.3. Gruplara ait sıçanların ağırlık değişimlerinin ikili karşılaştırma istatistik tablosu, n=7	66
Çizelge 4.4. Gruplara ait ovaryum ağırlıklarının ortalamaları $\pm$ standart hata, n=7	67
Çizelge 4.5. Gruplara ait ovaryum ağırlıklarının değerlerinin istatistiksel çoklu karşılaştırma test sonuçları, n=7	67
Çizelge 4.6. Gruplara ait ovaryum dokusu çap ölçüm sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7).....	69
Çizelge 4.7. Gruplara ait ovaryum çap değerlerinin istatistiksel çoklu karşılaştırma test sonuçları, n=7	70
Çizelge 4.8. Gruplara ait korpus luteum, kistik yapılar, atretik ve antral follikül sayımı yüzde ortalama sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)	90
Çizelge 4.9. Gruplara ait primordiyal, primer erken ve primer geç follikül sayımı yüzde ortalama sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)	91

Çizelge**Sayfa**

Çizelge 4.10. Gruplara ait E2, IL-6 ve VEGFA için ELISA analizi sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7).....	105
---	-----

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. OHSS'nin patofizyolojisi.....	32
Şekil 2.2. Fitokimyasalların sınıflandırılması	43
Şekil 2.3. Kersetinin moleküler formülü	44
Şekil 2.4. Kersetinin özellikleri	44
Şekil 2.5. Kersetinin moleküler mekanizmaları.....	49
Şekil 3.1. Deney şeması.....	53
Şekil 4.1. Gruplara ait sıçan ağırlıklarının karşılaştırılması (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7).....	66
Şekil 4.2. Gruplara ait ovaryum ağırlık ölçümleri (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7).....	68
Şekil 4.3. Gruplara ait ovaryum $\varnothing$ ölçümleri (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7).....	70
Şekil 4.4. Gruplara ait en büyük kesitten geçen korpus luteum sayıları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7).....	85
Şekil 4.5. Gruplara ait korpus luteum sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)	86
Şekil 4.6. Gruplara ait kistik yapıların sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)	87
Şekil 4.7. Gruplara ait atretik follikül sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)	88
Şekil 4.8. Gruplara ait antral follikül sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)	89
Şekil 4.9. Gruplara ait E2 ELISA analiz sonucu (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7. ** p<0,01, ns: anlamsız, KOH grubuna göre; ++ p<0,01, OHSS grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi)	103
Şekil 4.10. Gruplara ait IL-6 ELISA analiz sonucu (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7, ***p<0,001, ns: anlamsız (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi)	104

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.11. Gruplara ait VEGFA ELISA analiz sonucu (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7, ***p<0,001, ns: anlamsız (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi)	105
---	-----

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Ovaryumdaki folliküllerin değerlendirmesinde kullanılan örnek yapılar. (A) primordiyal (PRE) ve primer unilaminar (PU) follikül örnekleri PAS, 40x, (B) primer unilaminar (PU) follikül örneği PAS, 40x (C) primer multilaminar follikül örneği (PM), (D) antral follikül örnekleri (AntF), (E) Graaf follikül örneği	63
Resim 3.2. Ovaryum dokusuna ait kistik yapı örnekleri, kistik yapı (KY), oosit kalıntıları (→), granüloza hücre tabakası (►) lüteinize hücreler (LH), korpus luteum (KL) (A) H&E, 40x; (B, C) H&E, 100x	63
Resim 4.1. Ovaryum çap ölçümünün yapılışı, H&E, 40x	69
Resim 4.2. Gruplara ait ovaryum dokularının makroskopik görünüşleri	71
Resim 4.3. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, primordiyal follikül (→), multilaminar primer follikül (⇨), gelişmekte olan folliküller (►), antral follikül (*), atretik follikül (◆), kan damarı (▼), H&E, 40x.....	75
Resim 4.4. Kontrol grubuna ait ovaryumdaki germinal epitel (→) altında yerleşim gösteren primordiyal (▼) ve unilaminar primer folliküller (>), epitelin altındaki sıkı bağ dokusu yapısındaki t. albuginea (◆), antral follikül (*), kan damarı (◆), mitotik figürler (►) H&E, 100x	76
Resim 4.5. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu (A) gelişen çeşitli folliküler yapılar, antral follikül (*), Graaf follikül (GF), atretik follikül (◆), H&E, 40x, (B) kontrol grubuna ait Graaf follikül yapılarının görüntüsü, Graaf follikül (GF), oosit (→), korona radiata hücre tabakası (▲), granüloza hücre tabakası →), PAS, 100x	77
Resim 4.6. KOH grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, antral follikül (*), atretik follikül (◆), kistik yapılar (★), korpus luteum (✚), gelişmekte olan follikül yapıları (►), Graaf follikülü (GF) H&E, 40x	78
Resim 4.7. KOH grubuna ait ovaryumdaki tek katlı kübik epitel yapısındaki germinal epitel altında yerleşim gösteren primordiyal ve unilaminar primer folliküller, epitelin altındaki sıkı bağ dokusu yapısındaki t. albuginea (◆), kan damarı (◆), mitotik figürler (➡) H&E, 100x	79

Resim

Sayfa

- Resim 4.8. OHSS grubuna ait ovaryum dokusunu çevreleyen tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitel (◆), gelişim farklı aşamalarındaki primordiyal (▼), unilaminar primer (▶) ve multi-laminar primer folliküller (*) ve korpus luteum (+) yapılarını oluşturan büyük soluk poligonal görünümlü granüloza lütein hücreleri (→) ve teka lutein hücreleri (➡), t. albuginea (❖) H&E, 200x..... 80
- Resim 4.9. A-OHSS grubuna ait ovaryum dokusunun çok fazla sayıda kistik follikülün ve korpus luteumun olduğu genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), hemorajik alan (◆), oosit kalıntıları (→), H&E, 40x B- OHSS grubundaki kistik yapıların büyük büyültmedeki genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), oosit kalıntıları (→), follikül hücre tabakası (▶), hemorajik alan (HA), H&E, 100x..... 81
- Resim 4.10. A- OHSS grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), hemorajik alan (HA), kan damarı (KD), H&E, 40x. B- OHSS grubuna ait ovaryum dokusunda çok fazla sayıda kistik yapılar (★), korpus luteum (+), hemorajik alan (◆), oosit kalıntıları (→), H&E, 40x 82
- Resim 4.11. A,B- OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), antral follikül (*), gelişmekte olan folliküller (▶), oosit kalıntıları (→), hemorajik alan (HA), kan damarı (KD), H&E, 40x 83
- Resim 4.12. OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum dokusunu çevreleyen tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitel (◆), gelişimin farklı aşamalarındaki primordiyal (▼), unilaminar primer (▶) ve multi-laminar primer folliküller (*) ve korpus luteum (+) yapılarını oluşturan granüloza lütein hücreleri (→), t. albuginea (❖), H&E, 200x..... 84
- Resim 4.13. A-B Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda folliküllere ait granüloza hücrelerinde zayıf, teka hücreleri ve stromadaki hücrelerde orta derecede VEGFA immünoreaktivitesi görülmekte 100x, 200x, C- negatif kontrol 100x, DAB-Hematoksilen 93
- Resim 4.14. A-E, KOH grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, kontrol grubuna göre artmış VEGFA immünoreaktivitesi, kan damarlarında kuvvetli immüno reaktivite dikkati çekmekte A- çeşitli evrelerdeki folliküller, korpus luteum ve kistik yapı, 40x, B- antral folliküller ve kistik yapı, 100x, C- farklı evrelerdeki folliküller ve kistik yapılar, kan damarları 100x D- multilaminar primer follikül, 200x, E- antral follikül, 200x, F- negatif kontrol, 4x, DAB-Hematoksilen 94

Resim**Sayfa**

- Resim 4.15. OHSS grubuna ait ovaryum kesitlerinde kontrol ve KOH grubuna göre artmış, kuvvetli VEGFA immünreaktivitesi izlenmekte, A, B- genel görüntü, 40x, C-çeşitli evrelerdeki folliküller ve korpus luteum yapıları, 100x, D- kistik yapı ve gelişim aşamasındaki folliküller, 100x, E- olgun follikül, 200x, F- negatif kontrol, 40x, DAB-Hematoksilen..... 95
- Resim 4.16. OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, korpus luteum granüloza hücrelerinde zayıf VEGFA immünoreaktivite dikkati çekmekte, A- çeşitli evrelerdeki folliküller ve stroma 40x, B- olgun follikül ve korpus luteum yapıları 100x, C- çeşitli folliküller ve korpus luteum yapıları, D- korpus luteum, 200x, E- olgun follikül, 200x F- negatif kontrol 40x, DAB-Hematoksilen 96
- Resim 4.17. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda gelişimin değişik aşamalarındaki granüloza, teka hücrelerinde ve arterlerde VEGFR-2 immünreaktivitesi gözlenmekte 97
- Resim 4.18. KOH grubuna ait ovaryum dokusunda değişik gelişim aşamalarındaki folliküllerini teka hücrelerinde, korpus luteumdaki granüloza lutein, teka lutein hücrelerinde orta derecede kan damarlarında kuvvetli VEGFR-2 immün reaktivitesi görülmekte 98
- Resim 4.19. OHSS grubuna ait ovaryum dokusunda korpus luteumdaki, granüloza lutein, teka lutein hücrelerinde kan damarlarında kuvvetli VEGFR-2 immünoreaktivitesi görülmekte, A, B- kistik yapı ve korpus luteum yapıları ve folliküller ve stroma, 40x, C- korpus luteum, 200x, D, E- korpus luteum ve çeşitli folliküller yapıları, 100x, F- negatif kontrol, 100x, DAB-Hematoksilen 99
- Resim 4.20. OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum kesitlerinde, OHSS grubuna göre teka- lutein, granüloza-lütein hücrelerinde, kan damarlarında azalmış VEGFR-2 immünoreaktivitesi görülmekte, A- çeşitli evrelerdeki folliküller, korpus luteum yapıları, 100x, B- olgun follikül ve korpus luteum yapıları C- korpus luteum, 100x, D- follikül ve kan damarı, 200x E- olgun follikül ve kan damarı, 200x, F- negatif kontrol, 40x, DAB-Hematoksilen 100
- Resim 4.21. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunun üç boyutlu modellemesi, medulla (M), tunika albuginea (T), germinal epitel (G), korteks (C), primordiyal epitel (pf), uni-laminar primer follikül (pu), multi-laminar primer follikül (pm), antral follikül (s), arteria ovarica (a), vena ovarica (b)..... 101
- Resim 4.22. OHSS grubuna ait ovaryum dokusunun üç boyutlu modellemesi, medulla (M), hemorajik alan (ha), tunika albuginea (T), germinal epitel (G), korpus luteum (CL), korteks (C), kistik yapı (*), hemorajik kist (Λ), arteria ovarica (a), vena ovarica (v) 102

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
cm	Santimetre
g	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
mg	Miligram
mm	Milimetre
Na	Sodyum
OH	Hidroksil

Kısaltmalar

Açıklamalar

AKT	Protein Kinaz B
BCA	Bikinkoninik asit
CAT	Katalaz
COX-2	Siklooksijenaz-2
E_2	17-estradiol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
ERK	Ekstraselüler düzenlenmiş kinaz
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon

Kısaltmalar**Açıklamalar**

GnRH-a	GnRH agonistleri
GnRH-ant	GnRH antagonistleri
GSH	Glutasyon
GSH-PX	Glutasyon Peroksidaz
H&E	Hemotoksilen eozin
hCG	İnsan koryonik gonadotropini
hMG	Üriner insan menopozal gonadotropini
HUVEC	İnsan umbilikal ven endotel hücresi
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü I
IL-6	İnterlökin-6
IVF	İn-vitro fertilizasyon
İ.P.	İntraperitoneal
KOH	Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon
LDL	Düşük yoğunluklu lipoproteini
LH	Luteinize edici hormon
LOX	Lipoksijenaz
MIF	Müllerian inhibe edici faktör
mRNA	Mesajcı RNA
NF-κB	Nükleer Faktör kappa beta
OHSS	Ovaryan hiperstimülasyon sendromu
OMİ	Oosit maturasyon inhibitörü
OPU	Oosit toplama
OU	Ovaryum uyarımı
PAS	Periyodik asit Schiff
PCOS	Polikistik Over Sendromu
PIGF	Plasental büyüme faktörü
PMSG	Gebe kısrak serum gonadotropini
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör tirozin kinaz
S.C.	Subkutan

Kısaltmalar**Açıklamalar****SOD**

Süperoksit Dismutaz

TDF

Testis belirleyici faktör

TNF- α

Tümör nekroz faktörü-alfa

TSP-1

Trombospondin-1

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR-1

VEGF reseptörü 1

VEGFR-2

VEGF reseptörü 2

VPF

Vasküler geçirgenlik faktörü

YÜT

Yardımcı üreme teknolojileri

1. GİRİŞ

Son dekatlarda infertilite tedavisinde daha sıklıkla başvuru alan üremeye yardımcı tedavi yöntemleri ile elde edilen gebelikler gelişmiş ülkelerdeki tüm gebeliklerin yüzde birinden fazlasını oluşturmaktadır [1, 2]. Üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinden biri olan in vitro fertilizasyonun başarısında önemli bir süreç olan kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) güvenli bir yöntem olmakla birlikte aralarında ovaryan hiperstimülasyon sendromunun da olduğu birçok ciddi klinik duruma neden olabilmektedir [3, 4].

Folikül gelişimini ve ovulasyonu uyarmak için eksojen gonadotropin uygulamasının bir komplikasyonu olarak kabul edilen OHSS, “İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği” (ESHRE) son raporuna göre, Avrupa ülkelerinde %0,18-1,40 sıklıkta görülmektedir [5, 6]. OHSS gelişimi için risk faktörleri arasında genç yaş, düşük vücut ağırlığı, polikistik over sendromu varlığı, yüksek östradiol düzeyleri, hızlı artan östradiol seviyesi, bazal anti-müllerian hormon konsantrasyonunun yüksek düzeyde olması, stimule olan follikül sayısı ve bu folliküllerin çapı, toplanan oosit sayısı, luteal destek için insan koryonik gonadotropin (hCG) kullanımı ve gebelik gibi faktörler ve süreçler bulunmaktadır [7]. Klinik ve laboratuvar bulgularına göre sınıflandırıldığında hafif olgular, tedavi sikluslarının %23-33’ünde; orta şiddetli olanlar, %3-6’sında, şiddetli formlar ise %0,3-5’inde izlenmiştir [7, 8]. OHSS’de klinik tablo, karında rahatsızlık hissi, hafif düzeyde bulantı, kusma, ishal ve karında distansiyon gibi hafif semptom ve bulgulardan, hastanın hastaneye yatışını gerektiren derin ven trombozu, pulmoner emboli, akut solunum sıkıntısı sendromu, akut böbrek yetmezliği gibi hayatı tehlikesi olan durumlara kadar değişiklik göstermektedir. [9-11].

OHSS’nin şiddetli klinik formunun altında yatan fizyopatolojik mekanizma halen net olarak bilinmemekle birlikte [11], akut hemodinamik anormalliklere ve intravasküler sıvının üçüncü boşluklara yoğun bir şekilde geçişine neden olan çeşitli kan damarlarındaki geçirgenlik artışı klinik bulgulardan sorumlu görülmektedir [12-15]. Bu vasküler geçirgenlik sürecinde ovaryan renin–angiotensin sistemi, prostaglandinler, histamin, sitokinler, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)/vasküler geçirgenlik faktörü (VPF), pigment epitel-kaynaklı faktör (PEDF) gibi faktörlerin rol aldığı öne sürülmüştür [12-14, 16, 17].

Bağıışıklık sistemi ile overler arasındaki etkileşim, gonad fizyolojisinde gelecek için umut veren ve OHSS'nin yeni olası aracılarını öne süren bir alan olarak ilgi çekmektedir [18, 19]. Bu nedenle, genel ovaryum fonksiyonu ve ovaryumdaki süreçler daha spesifik olarak çeşitli sitokinler tarafından düzenlenebilir [18, 19]. Bu mediatörler arasından özellikle interlökinler, intra-ovaryan yolların olası düzenleyicileri olarak birçok araştırmada çalışılmıştır [12, 18, 19]. Hiperstimule overlerde folliküller sıvıdan ve bunu çevreleyen over dokusundan salınan faktörler kana karışır ve bu maddeler peritoneal membranlardaki damarları stimule ederek sıvı kaçacağına neden olur [20]. IL-2, IL-6 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) artmış vasküler permeabilitede rol oynayan mediatörlerdir [21].

Vasküler endotelial büyüme faktörü, OHSS gelişmesine yol açan en önemli faktör olarak görünmektedir. Histamin ile karşılaştırıldığında VEGF'nin endotel geçirgenliğini 50.000 kat daha arttırdığı gösterilmiştir [12]. hCG'ye bir yanıt olarak aşırı derecede salgılanan over kaynaklı VEGF, endotel hücreleri üzerindeki VEGFR-2 reseptörüne bağlanarak vasküler geçirgenliğin artmasına ve böylece OHSS belirtilerine yol açar [22]. VEGF'nin vasküler geçirgenliği arttırarak asit oluşumuna neden olduğu artışındaki önemi, uyarılmış dişi sıçanlarda gösterilmiştir. Ovulasyon indüksiyonu yapılmış sıçanlarda VEGF ve VEGFR-2'nin aşırı eksprese edildiği ve vasküler geçirgenlikte bir artışa neden olarak asit oluşumuna neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur [23].

VEGF'nin KOH hastalarında hCG tarafından artırıldığına dair dolaylı kanıtlar [24, 25], göz önüne alındığında, bazı deneyler insanlarda KOH'a benzer gonadotropinler kullanılarak ovaryum genişlemesi ve asitleri indüklemiş ve ovaryum VEGF, VEGFR-2 mRNA ve protein seviyelerinin hCG uygulamasından önce bile arttığını göstermiştir [26, 27]. Bu etkiler, ovaryuma özgüdür ve çevresindeki dokulara özgü değildir. Aslında, KOH ooforektomize edilmiş hayvanlarda asiti indüklememiştir [27]. OHSS'li kadınlarda granüloza-lutein hücreleri [24] tarafından aşırı eksprese edilen VEGF, hCG'nin neden olduğu kapiller geçirgenlik artışı sonucunda folliküler sıvıya salınır [24, 28]. hCG kültüre granüloza-luteal hücrelerinde VEGF ekspresyonunu indükler, bu durum OHSS gelişen kadınlarda, sendrom geliştirmeyen kadınlardan daha yüksektir [29]. Bunlarla birlikte, plazma [30] ve asit [31] VEGF düzeylerinin OHSS'nin klinik görünümüleri ile korele olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hCG uygulamasının, granüloza-lutein hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyonunu arttırdığı ayrıca bu

artışın OHSS riski taşıyan hastalarda olduğu da gösterilmiştir [30]. Endotel hücre-hücre bağlantıları, VEGF etkinliğindeki hedeflerdendir. Artan VEGF seviyeleri ile artan kaderin artışı ve artmış vasküler geçirgenliğin morfolojik onayını temsil eden endotel hücrelerinin şekilsel düzenlenimlerindeki değişiklikleri ortaya konulmuştur. Artan VEGF seviyelerinde kaderin ekspresyonundaki artış ve endotel hücrelerin şekilsel düzenlemelerindeki değişiklikler artmış vasküler geçirgenliğin morfolojik kanıtı olarak tanımlanmıştır [32].

VEGF ve IL-6, her iki potansiyel aracının da monositler, endotel hücreleri ve granüloza hücreleri tarafından üretilip salındığı rapor edilmiştir. Vasküler geçirgenliğin arttırılması, temel olarak VEGF ve IL-6 üretiminden kaynaklanan belirgin bir olasılıktır [25]. IL-6 çok işlevli bir sitokindir ve ayrıca önemli bir enflamasyon düzenleyicisidir. Aynı zamanda, IL-6, VEGF ekspresyonunun indüklenmesi yoluyla aracılık eden immünomodülatör ve anjiyojenik etkilere sahiptir. IL-6'nın birkaç hücre hattında VEGF ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir [33].

OHSS'yi önlemeye ve tedavi etmeye yönelik birçok etkili ajan bulunmasına rağmen, özgün bir tedavisi mevcut değildir [12, 34]. Ayrıca OHSS gelişimini önlemek için geliştirilen KOH uygulaması öncesi ve sonrası tüm modifikasyonlara rağmen, yine de OHSS gelişimi engellenememektedir [12]. Bu nedenle en kesin yöntem OHSS'nin hiç oluşmamasını sağlamakla birlikte [12] tedavide temel dayanağı destekleyici tedaviler oluşturmaktadır [13]. Mevcut tedaviler, oosit olgunlaşmasını tetiklemek için hCG kullanımından kaçınılmasını, embriyo transferinin ertelenmesini ve hastanın durumunun sıkı takibinden ibarettir [7, 34, 35]. Bunlara ek olarak, KOH da ortaya çıkan OHSS olgularının raporlanma oranı hala oldukça düşüktür [6, 7]. Durumun arkasındaki patofizyolojiyi aydınlatmak ve böylece kalıcı bir tedavi için daha fazla araştırma gereklidir [13]. OHSS'nin sıçan modelleri, faydalı girişimsel stratejiler geliştirmek için değerli olabilir [34]. 21. yüzyıldaki en büyük modern tıp çalışmalarından biri gerçekten herhangi bir OHSS komplikasyonu olmadan doğurganlığın sağlanmasıdır [12].

Günümüzde, bitki ekstreleri, dişi üreme bozukluklarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [36, 37]. Flavonoidler, geniş farmakolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi çeken bitki bazlı bileşiklerdir [38]. Kersetin (3,5,7,3',4'- pentahidroksflavon), özellikle

domates, soğan, brokoli, marul, üzüm, elma ve yaban mersini olmak üzere meyve ve sebzelerde bulunan bir flavonoiddir [39, 40]. Kersetin, ortalama 25-50 mg/gün miktar ile en yaygın tüketilen diyet flavonoidlerinden biridir [41]. Ayrıca, Kersetin fitoöstrojen olarak bilinen bir dizi bitki bazlı steroid yapıda olmayan bileşik grubunun bir üyesidir [40].

Kersetin, antioksidan potansiyele [42], kardiyovasküler koruma etkisine, anti-inflamatuvar, antikanser aktiviteye [43-45], anti-diyabetik [46] etkilere ve menopoz sonrası kadınlarda kemik kaybının tekrardan kazanılması gibi özelliklere sahiptir [47]. Düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) oksidasyondan [48], lipid peroksidasyonundan [49] korur ve hücrelerde redoks dengesizliklerini önler [50]. Kersetin, GSH, SOD, CAT, GSH-PX ve Glutatyon redüktaz aktivitelerini artırarak serbest radikal üretimi üzerinde güçlü bir temizleme etkisine sahiptir [51]. Victor ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Kersetin uygulamasının, antioksidan ve anti-apoptotik etkileriyle Wistar sıçanlarının uterus ve ovaryum dokularında kadmiyum klorür ($CdCl_2$) kaynaklı toksisite üzerinde önleyici etkiler oluşturduğu bulunmuştur [52]. Yakın zamanda Kersetin'in antioksidan enzimler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için yapılan bir başka çalışmada ise, Kersetin'in PCOS sıçan modelinde SOD, CAT ve GPX'in aktivitesini anlamlı şekilde arttırdığı ve ayrıca Letrozolün over morfolojisi üzerindeki etkilerini tersine çevirdiği ortaya koyulmuştur [53]. Bunlara ek olarak Kersetin hem platelet agregasyonu hem de adezyonunun inhibisyonunu sağlarken vasküler endotel hücrelerini H_2O_2 hasarından sahip olduğu antioksidan özellikleri yolu ile korur [54].

Kersetin ayrıca, hücre steroidojenik aktivitesini düzenler ve hormonal endeksleri düzeltmeye yardımcı olur, bu sayede ovaryum fonksiyonlarını da modüle eder [55]. Naseer ve arkadaşları, ısı stresi yaşatılan tavşanlarda, Kersetin takviyesinin folliküler gelişimi önemli ölçüde geliştirdiğini, granüloza hücrelerinin apoptozisini en aza indirdiğini bulmuşlardır [56]. Bazı *in vitro* çalışmalarda Kersetinin ovaryum hücreleri üzerindeki olası rolü de araştırılmıştır. Kersetinin domuz veya tavuk ovaryum folliküllerinden elde edilen kültüre granüloza hücrelerinde, T-2 toksinine veya kadmiyuma bağlı oksidatif hasarı ve apoptozu önlediği bildirilmiştir [57, 58]. Ayrıca, Chen ve ark. Kersetinin yaşlanan sıçanlarda ovaryum folliküller rezervini etkileyerek olumlu etkiler oluşturduğunu öne sürmüşlerdir [59].

Kersetin, OHSS patogenezinde de önemli bir yer tutan enflamasyonu engelleme yeteneğine de sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda, kersetin'in (10-25 μ M), LPS ile uyarılmış BV-2 mikrogliya hücrelerinde NO ve TNF- α üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiği bildirilmiştir [60]. Başka bir araştırmada ise Kersetin (10 μ M), aşağı doğru düzenlenmiş COX-2 ve NF- κ B ekspresyonunu ve okratoksinle uyarılmış HepG2 (insan hepatoma) hücrelerinde NO üretimini azalttığı rapor edilmiştir [61]. Diğer araştırmalarda ise Kersetinin IL-1 β , IL-6, IFN- γ inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bunlara ek olarak kersetinin, OHSS patofizyolojisinin temelinde olan anjiyogenezdeki bazı basamakları modüle etme kabiliyeti olduğu bildirilmiştir [62]. Pratheeshkumar ve arkadaşları kersetinin antianjiyogenik aktivitesini farklı modeller kullanarak incelemişlerdir. Kersetinin, anjiyogenezde, endotel hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve tüp oluşumu dahil olmak üzere birkaç önemli adımı engellediğini göstermişlerdir. Bu etkilere VEGF'nin neden olduğu VEGFR-2 fosforilasyonunun baskılanmasının yanı sıra aşağı-akım kinazlarının AKT, mTOR ve ribozomal protein S6 kinazının HUVEC'lerde fosforilasyonunun inhibisyonu da eşlik ettiği rapor edilmiştir [63]. Daha sonraki araştırmalarda; Kersetinin, HUVEC de VEGFR-2 mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği ve hem HUVEC'lerde hem de zebra balığı embriyolarında ERK'nin fosforilasyonunu azalttığı bulunmuştur [64]. Bunlara ek olarak, Kersetin, hem p38MAPK hem de ERK 1/2 'in fosforilasyonunu da inhibe etmiştir. Araştırma sonucunda Kersetin antianjiyogenik aktivitesini VEGFR2 aracılı aşağı akış sinyallesinin modülasyonu yoluyla gerçekleştirmiş olabileceği ileri sürülmüştür [65]. Ayrıca, Kersetinin, AKT sinyalini modüle ettiği ve lenfomalı farelerde anjiyogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir [66].

Kersetin yukarıdaki etkileri ile OHSS'nin temel patofizyolojik mekanizmalarındaki hem inhibisyon hem de regülasyon özelliklerinde dolayı henüz özgün bir tedavisi olmayan bu sendromun hem önlenmesi hem de tedavisi için potansiyel taşımaktadır. Ayrıca literatür araştırmaları sonucunda OHSS sıçan deney modelinde Kersetinin kullanıldığı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Literatür bulgular ışığı altında, önerilen bu çalışmada, ovaryan hiperstimülasyon sendromu modeli oluşturulan ratlarda Kersetinin OHSS üzerine ve ilişkili olduğu VEGF/VEGFR-2, IL-6 üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

2.1.1. Ovaryum embriyolojisi

Embriyonun genotipi'nin 46, XX veya 46, XY olması fertilizasyon sırasında gerçekleşir [67].

1. - 6. haftalar arasında genetik olarak dişi veya erkek özellikte olan embriyolar fenotip açısından birbirinden ayırt edilemezler [67, 68]. Yedinci hafta itibari ile embriyo cinsel fenotip özelliklerine göre değişmeye başlar [67]. Bu değişim süreci SRY geni tarafından kontrol edilmektedir. SRY geni, cinsiyet belirleyici bölge Y protein'in (testis belirleyici faktör olarak da adlandırılır [TDF]) kodlarını taşır. Embriyoda TDF proteinin ifadenmesi gerçekleştiğinde, gonad testis olarak farklılaşır. Testosteron ve Müllerian inhibe edici faktör (MIF) yokluğunda ise, embriyo dişi fenotip olarak farklılaşmaya başlar [67]. 12. hafta itibari ile dış genital özellikler, erkek veya dişi fenotip olarak ayırt edilecek biçime gelir ve bu farklılaşma süreci 20. haftada tamamlanır [67].

Intermediate (ara) mezoderm dorsal vücut duvarı boyunca ürogenital kabartıyı oluşturur. Daha sonra çöлом epitelinin ve altında bulunan ürogenital kabartı mezoderminin çoğalması sonucunda bir çift gonadal kabartı meydana gelir [67]. Gonadal kabartılardan gelişen primer cinsiyet kordonları (primer seks kordonları) primordiyal germ hücrelerini içerir [67]. Fakat gelişimin 6. haftasına kadar genital sırtlarda herhangi bir germ hücresi yoktur [68].

Epiblasttan türeyen primordiyal germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederek 3. haftada vitellüs kesesinin allontois'e yakın olan duvarındaki endoderm hücreleri arasına yerleşir [68]. Dördüncü haftada hücreler sonbağırsağın mezenterinden ilerleyerek 5. hafta başında gonadlara 6. haftada ise genital sırtlara ulaşırlar [67, 68]. Eğer bu göç kesintiye uğrarsa gonadlar gelişemez [68]. Primordiyal germ hücrelerinin genital katlantılara (primitif gonadlar) girmesinden kısa bir süre önce ve girişleri sırasında, genital katlantıların epiteli çoğalıp, mezenşime ilerleyen primitif cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz hücre kordonlarını oluşturur. Erkek ve dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey

epiteline olan bağlantısını bir süre daha sürdürür. Bu evredeki gonadlara farklanmamış gonad adı verilir [68]. Dişi gonadlarda, primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümeleri şeklinde düzenlenim gösterirler. Primitif germ hücresi gruplarını içeren hücre kümesi oluşumları, daha çok overin medullar bölgesinde konumlanmışlardır. Bu hücre kümelerinin bir süre sonra kaybolması ile yerini vasküler yapıdaki stroma (ovarian medulla) doldurur [68]. Dişi gonadın yüzeyindeki epitel çoğalmaya devam ederek 7. haftada kortikal kordonlar denilen ikinci nesil kordonları oluştururlar [68]. Dördüncü aydan itibaren bu kordonlar izole hücre kümelerine ayrılarak çoğalmaya devam ederler. Bu hücre kümeleri her oogoniumun etrafını folliküler hücreler olarak adlandırılan bir epitel hücresi katmanıyla çevrelerler. İşte bu folliküler hücreler oogoniumunlar ile birlikte primer follikülü oluştururlar [68, 69]. Bu gelişim evrelerinde dişi gonadın medullar kordonları geriler ve kortikal kordonların ikinci nesli oluşur [68].

Ovaryumların inışı

Ovaryumlar ilk oluştuklarında abdomen bölgesindedir, fakat daha sonra pelvis bölgesinden uzakta olan üst abdominal bölgenin oransız gelişmesi sonucunda pelvise doğru inerler. Bu yer değiştirme sürecinde Gubernakulum etkili faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir [67].

2.1.2. Ovaryum anatomisi

Ovaryumlar sağ-sol bir çift olarak kadındaki temel üreme organlarıdır. Temel işlevleri gametleri ve dişiye özgü seks hormonları (progesteron ve östrojen) üretmek olan ovaryumlar erkekteki testislerin karşılığıdır. Ovaryumlar doğurmamış yani nullipar kadınlarda, pelvis minor'un dış-yan duvarlarındaki fossa ovarica'larda bulunurlar. Fossa ovarica'nın bulunduğu bölgenin sınırları ise lig. latum uteri' nin arkasında olarak yukarıda a. ve v. iliaca externa; arkada a. ve v. iliaca interna ve üreter; önde oblitere umbilikal arter'dir. Tabanında ise a. ve v. obturatoria ve n. obturatorius bulunmaktadır. Doğurmuş kadınlarda bulundukları bölge sabit değildir. Ovaryumlar, hamilelik sırasında uterusun büyümesi sonucunda karın boşluğuna geçerken, doğum sonrası uterus'un küçülmesi nedeniyle tekrardan pelvis boşluğuna geri dönerler. Fakat öncesindeki bulundukları

konumları aynı değildir. Çoğunlukla rektouterin çıkmazda, rectum'un iki yanında yer alan ve "Claudius çukuru" olarak [72] adlandırılan bölgeye konumlanırlar [70-72]. Her bir ovaryum makroskopik olarak pembemsi gri renklidir ve badem şeklinde olup, 3 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve 3 -5 gr ağırlığa sahiptir. Dış yüzeyleri düzenli ovulasyonun başlamadığı kızlarda ve menopoza giren kadınlarda düz iken, puberteden sonraki dönemde ovulasyon nedeniyle solid nodüler bir görünüm alır. Her bir ovaryum Facies medialis ve facies lateralis adlı iki yüze, extremitas tubaria ve extremitas uterina adlı iki uca, margo liber ve margo mesovaricus adlı iki kenara sahiptir [70-72].

Ovaryumun ön kenarı olan margo mesovaricus düz bir yapıda olup, yönü oblitere a. umbilicalis'e dönüktür ve kısa bir peritoneal plika olan mesovarium ile lig. latum uteri'ye bağlanır. Mesovarium'un alt-medial kenarı (extremitas uterina) ile cornu uteri arasında lig. ovarii proprium (lig. uteroovaricum, chorda utero-ovarica) uzanır. Mesovarium'un iki yaprağı arasında, hilum ovarii'ye ulaşan arter, ven ve lenfatikler ile sinirler bulunmaktadır. Ovaryum, infundibulopelvik bağ olarak da adlandırılan lig. suspensorium ovarii ile pelvik duvara bağlanır. Ligamentum suspensorium ovarii bir periton plikasıdır. Bu yapı ovaryum'un üst ucu ve buna yakın ön kenar ile a. ve v. iliaca'ların yakınında bulunan pelvis dış-yan duvarı arasında uzanır. Ovarium'un damar-sinir yapıları bu bağ içinde yerleşmiştir. Bu bağ içinde yer alan v. ovarica, plexus pampiniformis olarak da adlandırılmaktadır. Ovarium torsiyonu, genellikle mesovarium veya lig. suspensorium ovarii'nin uzun olması nedeniyle meydana gelir. Bunun sonucunda gelişen ovarium iskemisi, abdominal ağrı oluşturur. Mesovarium çift katlı peritonundan oluşur ve ovaryum'un ön kenarını lig. latum uteri'nin arka yaprağına bağlar. Ligamentum ovarii proprium, Guberneculum'un bir artığıdır ve ovaryumu cornu uteri'ye bağlar. Ayrıca ligamentum ovarii proprium, lig. latum uteri'nin iki yaprağı arasında uzanır ve 3 cm uzunlukta ve 3 mm kalınlıktadır. Fimbria ovarica ise fimbriae tubae uterinae içinde en uzun olanına verilen addır. Infundibulum tuba uterinae'den ovaryuma uzanır [70-72].

Ovaryumun damar ve sinirleri

Ovaryum'un ana arteri L2 seviyesinde aorta abdominalis'ten ayrılan a. ovarica'dır. Bu arter lig. suspensorium ovari ve mesovarium içinden geçerek ovaryum'a ulaşır. İkinci olarak a.

uterina'nın bir dalı olan r. ovaricus, da ovaryumun kan desteğine katılır. Arteria ovarica'nın herhangi bir tıkanma durumunda, a. ovarica dalları ile anastomoz yapan r. ovaricus ovaryum'u beslemeye çalışır [70-72]. Bu anastomoz yapısına ait bölgeden kaynaklanan ve diğerlerine göre daha büyük olan bu damarlar mezovaryumdan geçip, hilum ovarii'yi kanlandırırlar. Ovaryumun medullasına geçtiklerinde dallanıp, yüksek düzeyde sarmal hale geldiklerinden dolayı, bu büyük arterlere spiral arterler adı verilmektedir [73]. Ovaryumdan çıkan venler önce plexus pampiniformis'i meydana getirdikten sonra, v. ovarica'yı oluştururlar. Vena ovarica, sağ tarafta v. cava inferior'a, sol tarafta ise v. renalis sinistra'ya direne olur. Ovaryumlarından çıkan lenf damarları a. renalis paralel olarak ilerleyip, nodi lumbales (nodi aortici lateralis ve nodi preaortici)'e akar [70-72].

Ovaryumu innerve eden plexus ovaricus, n. vagus ile gelen parasempatikler ve T10-T12 seviyesinden gelen simpatik liflerden oluşur. Ayrıca ovaryumun yansıyan ağrısı, göbeğin hemen altında bulunan T10-T11 dermatomlarında, yani alt abdominal ve pubik bölgede hissedilir. Bunlara ek olarak otonom innervasyonun ovaryumlar üzerindeki etkileri bilinmemektedir [70-72].

2.1.3. Ovaryum histolojisi

Ovaryumlar dıştan periton ile örtülü olmasına rağmen bu periton puberteyle beraber yassı epitele dönüşür [73]. Germinal epitel olarak adlandırılan bu hücresel katman mezovaryumu çevreleyen mezotelyum ile süreklilik göstermektedir. Yani ovaryum mezotelyum yerine germinal epitel ile çevrelenmektedir [74]. Bu tabakanın altında ise kollagen lif miktarı yüksek olan tunica albuginea olarak adlandırılan bir tabaka yer alır. Ovaryumun esas dokusu ise bu tabakanın altında bulunur. Bu doku dışta cortex ovarii ve içte medulla ovarii olarak isimlendirilen iki kısımdan oluşmaktadır [73].

Cortex ovarii (Korteks) de çeşitli seviyelerde gelişim halinde olan ovaryum follikülleri ve bunların arasını dolduran bağ dokusu yer alırken, medulla ovarii' de (Medulla) ise gevşek bağ dokusu ve bunun içinde bulunan damarlar ve sinirler bulunmaktadır [73]. Medulla ile korteksin sınırları birbirinden kesin bir şekilde ayrılmaz [74].

Her biri tek bir oosite sahip olan çeşitli boyutlardaki ovaryum follikülleri korteksin stromasının içine dağınık bir biçimde yerleşmişlerdir. Oogonium denilen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesi olayı olan oogenezin ilk evreleri fetal dönemde meydana gelir [68, 74]. Bu evrede yüksek miktarda gerçekleşen mitotik bölünmeler sayesinde oogonyumların sayısı artar [73]. Doğumla bu ana kadar meydana gelmiş olan oositler birinci mayozun bölünme evresinde arreste uğrayarak puberteye kadar bu şekilde kalırlar ve gelişimleri duraklar [68, 74].

Puberteden önce ovaryumun korteks bölgesindeki sayısı yaklaşık 400.000 olan folliküller herhangi bir gelişme göstermezler ve primer follikül olarak kalırlar. Puberte ile folliküller küçük gruplar halinde döngüsel bir büyüme ve olgunlaşma sergilerler [68, 74]. Puberte sonrası çeşitli gelişim evrelerinden sonra Graaf follikülü olarak adlandırılan son evreye geçerler [73]. Graaf follikülü olgunlaştıktan sonra içerisinde bulunan ovum, ovulasyon denilen olay ile dışarı atılır ve bu son evredeki follikülün yerini korpus luteum alır. Görevi progesteron üretimi olan bu yapı fertilizasyon olayı gerçekleşir ise gebeliğin ilk 6 ayı boyunca fonksiyonunu sürdürür. Bundan sonraki süreçte plasenta bu görevi üstlenir. Eğer fertilizasyon olmaz ise korpus luteum 14 gün gibi kısa bir süre içinde kaybolur ve korpus albicans'a dönüşür. Bir kadın doğurganlık periyodu içinde ortalama olarak 400 kez ovulasyon yapabilmektedir [73].

2.1.4. Follikülogenezis

Primordiyal follikülden ovulasyona katılacak olan tersiyer follikülün oluşumuna kadar olan tüm değişimleri içeren gelişim dönemidir [69]. Ovaryum follikülleri gelişmekte olan oositler için mikro-çevreyi sağlamakla görevlidirler [74]. Follikülün sahip olduğu boyut özellikleri oositin gelişim evresini gösterir ve histolojik olarak 3 temel tip ovaryum follikülünden bahsedilebilir [74].

1. Primordiyal folliküller
2. Büyümekte olan folliküller: Primer ve Sekonder (antral) follikül olarak alt gruplara ayrılır.
3. Olgun follikül ya da Graaf folliküller

Siklus geçiren bir ovaryumda her gelişim evresinde olan follikül bulunmasına rağmen primordiyal folliküller baskın olanlarıdır [74].

Primordiyal folliküller

İlk olarak fetal yaşamın üçüncü ayında görünmeye başlayan primordiyal folliküllerin erken gelişimi gonadotropin uyarımına bağlı değildir [74]. Tam gelişmiş bir ovaryumda bu folliküller korteks stromasında tunika albugineanın hemen altına konumlanmışlardır. Yassı follikül hücreleri primer oositi tek bir katman şeklinde sararken, bazal lamina ise bu follikül hücrelerinin dış yüzeyini çevreler. Bu follikülün sahip olduğu oositler yaklaşık 30 mikron çapındadır. Oosit nükleusu ise büyük, eksantrik yerleşimlidir ve ince dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nükleolus içerebilir [74]. Ooplazma olarak da bilinen oositin sitoplazması Golgi membran ve veziküllerinden, mitokondriyon, endoplazma retikulumu ve lizozomlardan oluşan Balbiani cisimciği ile anüler lameller içerir [69, 74]. Puberte ile folliküllerin bundan sonraki gelişimi oositin büyümesi, maturasyonu, folliküler epitel hücrelerinin çoğalması ve follikülü çevreleyen stromadaki değişiklikler ile sürdürülür [69].

Primer folliküller

Primordiyal folliküllerin yassı şekilli olan hücreleri değişerek, önce kübik bir süre sonra prizmatik hücreler haline gelirler. Follikül hücreleri tek katlı kübik şekil aldığı anda artık bu folliküller primer follikül olarak kabul edilirler [69].

Olgun olmayan oosit gelişirken etrafına glikoprotein ve glikozaminoglikan türünde moleküller salgılayarak, bu bölge kuvvetli PAS pozitif özellik gösterir ve zona pellusida olarak adlandırılır [69]. Bu bölgenin yapımına folliküler hücrelerin de katkısı vardır. Fakat zona pellusida, oosit yaklaşık 50-80 mikron çapa ulaşmadan görünmez. Oluşan bu tabaka fertilizasyon olayında çok önemli görevleri olan sperm için reseptörler içerir. Hem oosit hem de follikül epitel hücreleri mikrovillusa sahiptirler ve bu uzantılar zona pellusida hizasında birbirleri ile perivitellin aralık denilen bölgede oluklu bağlantılar (gap junction) ile temas halindedir. Bu sayede follikül hücreleri büyüyen oosite besin desteği sağlarlar çünkü follikül büyüdükçe kalınlaşan epitel yüzünden oosit stromadan uzaklaştığı için

beslenmesi zorlaşmaktadır [69]. Bu gelişmeler, yaşanırken follikül hücreleri oositin bölünmesini durdurmak için oosit maturasyonunu inhibe edici faktörü de sentezleyip salgırlar. Bununla birlikte oosit de follikül epitelinin gelişimini uyarıcı faktörler (BMP gibi) üretir ve salgırlar. Sonrasında oositi saran hücrelerin sayısı artar ve çok katlı bir epitel haline gelen bu hücre tabakasına artık stratum granülozum adı verilir [69].

Tek katlı prizmatik veya çok katlı prizmatik epitel morfolojisine sahip değişik büyüklüklerdeki folliküller primer follikül olarak değerlendirilir. Eğer bir follikül tek katlı epitel içerirse unilaminar primer follikül, çok katlı bir epitel katmanı (stratum granülozum) içerirse multilaminar primer follikül olarak isimlendirilir [69, 74]. Stratum granülozum hücreleri birbirleri ile çok sayıda bulunan oluklu bağlantılar ile iletişim halindedirler. Granüloza hücreleri, follikül uyarıcı hormon (FSH) reseptörlerine sahiptir ve bu sayede FSH bu reseptörlere bağlanarak az da olsa bu hücrelerden östrojen salınımını uyarır. Bu uyarı follikülün ileri gelişimi için önem arz eder [69].

Ayrıca bağ dokusunda da bazı değişimler olur. Stroma, follikül etrafındaki teka follikülü denilen bir sıkı doku meydana getirir. Bu teka hücrelerinde sentezlenen anjiyogenez uyarıcı faktörler follikül çevresindeki vaskülarizasyonu arttırarak büyüyen oosit ve sayısı giderek artan follikül hücrelerinin beslenmesini destekler [69]. Teka follikülü ile stratum granülozum arasında camsı membran olarak adlandırılan bir bazal membran bulunur. Sonraki süreçte teka follikülü teka interna denilen bir iç ve teka eksterna denilen bir dış tabakayı oluşturur. Teka interna kan damarları yönünden zengin iken teka eksterna, kollagen lif ve düz kas hücreleri yönünden zengindir [69]. Teka interna tabakası steroid salgısı yapabilen hücrelere, fibroblastlara ve bunların yanında kolajen liflere ve küçük kan damarlarına sahiptir. Buradaki hücreler Luteinize edici hormon (LH) reseptörlerine sahiptirler ve LH uyarımı ile östrojenlerin öncül molekülleri olan androjenler (androstenedione) sentezlerler [69]. Üretilen bu androjenler granüloza hücrelerine gönderilirler ve sonrasında FSH etkisi altında sentezlenen aromataz enzimi vasıtasıyla östrojenlere dönüştürülürler. Sonrasında salgılanan bu östrojenler teka tabakasına döner ve buradaki vasküler yol ile bütün vücuda dağılır. Östrojenlerin granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerini arttırıcı özelliği vardır [69].

Sekonder folliküller (Antral Follikül)

Multilaminar primer follikülde bulunan stratum granülozumun hücre tabakası 8-12 katlı bir hale gelince bu hücreler çevresinde şeffaf özellikte bir sıvı ile dolu olan düzensiz yapıda boşluklar belirir [69]. Başlangıçta bu sıvı granüloza hücreleri tarafında üretilirken sonraki evrelerde plazma kaynaklıdır. Bu özellikleri taşıyan follikül bundan sonra sekonder follikül ismini alır. Bu sıvı dolu olan boşluklar zamanla birbirleri ile kaynaşarak antrum denen tek büyük bir boşluğu meydana getireceklerdir. Antrumun follikül sıvısı, su tutma özelliği olan hyalüronik asitten zengin olduğu için follikül çapının giderek artmasını sağlar. Bu dönemde oositin çapı 250 µm civarında ölçülmektedir [69, 74].

Tersiyer follikül (Graaf follikülü)

Follikül büyürken follikülün içindeki sıvı da antrumun genişliği de artmaya devam eder. Bu süreçte bir grup granüloza hücrelerince sarılmış olan oosit, follikülün bir kenarına itilir [69]. Oosit ve etrafındaki granüloza hücreleri follikül lümenine doğru uzanan kumulus ooforus olarak adlandırılan bir tümsek meydana getirirler. Bu sırada oositi saran granüloza hücrelerine ise korona radyata denir. Granüloza hücrelerinden oluşan çok katlı bir hücre tabakası da antrum boşluğunu sarar. Bu tabakaya da membrana granüloza adı verilir [69]. Hem korona radyata hücreleri hem de oosit, plazma membranlarındaki mikrovilluslar arasında bulunan oluklu bağlantılar ile iletişim halindedir. Granüloza hücreleri tarafından sentezlenen hyalüronik asit ve proteoglikanlardan zengin olan Call-Exner cisimleri belirir. Bu materyal, hücreler arası ortamda Periyodik Asit-Schiff (PAS) pozitif boyanma özelliği gösterir [69].

Folliküllerin büyümesinin kontrolü ve etkileyen faktörler

Oosit ve folliküllerin büyümesi için çeşitli faktörlere ihtiyaç vardır. Bu faktörlerin en önemlileri FSH, büyüme faktörleri olan; epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) gibi büyüme faktörleri ve kalsiyum iyonlarıdır. [69, 74]. Ayrıca, follikül büyüklüklerinin kontrolü granüloza hücreleri tarafından üretilerek antrum sıvısına bırakılan oosit maturasyon inhibitörü (OMİ) gibi inhibitör faktörleri ile de sağlanmaktadır [69].

Bunlarla birlikte, follikülerin gelişiminde anjiyogenezin de etkin rol oynadığı bilinmektedir [69]. Granüloza tabakası ovulasyon anına kadar avaskülerdir, çünkü teka interna ve eksterna tabakalarında iki kapiller ağ bulunmasına rağmen, bu damarlar bazal membranı geçemezler [69, 74]. Ovule olan folliküller diğer antral folliküllere göre daha yaygın bir vasküler ağ içerdiklerinden dolayı, daha fazla miktarda gonadotropine etkin kaldıkları aydınlatılmıştır. Kısaca, hangi follikülün ovulasyona gideceğinin belirlenmesinde vaskülarizasyon seviyesi de önem taşımaktadır [69].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) folliküllerin vaskülarizasyonunu kontrol eden en önemli moleküldür. Bu faktör endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu kuvvetle uyarırken, vasküler geçirgenliği arttırıcı özellik gösterir. Ovaryumda VEGF'nin ana kaynağı granüloza hücreleri olup, ayrıca teka hücre tabakasında bulunan damarların endotel hücrelerinde de üretilmektedir. Follikül gelişirken bu molekülün follikül sıvısındaki konsantrasyonu artar [69]. Hangi follikülün ovulasyona katılacağına belirlenmesindeki en önemli faktör follikül sıvısındaki VEGF seviyesidir. Bu etmene ek olarak, ovaryumda bulunan bir diğer kuvvetli endotel hücre mitojeni ise fibroblast büyüme faktörü-2 dir. Özellikle gelişmiş folliküllerde miktarı yüksek olan bu faktör başlıca teka hücre tabakasındaki perisitlerde ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır [69].

Tersiyer folliküllerin içinde erken dönemde primer oosit bulunurken, ovulasyona yakın dönemde bu folliküllerin içinde sekonder oosit bulunur [69, 74]. Primordiyal folliküllerde yer alan primer oositler birinci mayotik bölünmelerine embriyoda başlamalarına rağmen bu süreç mayotik profazın diploten evresinde arreste uğrar. Birinci mayotik profaz ovulasyondan hemen öncesine kadar tamamlanmadığı için primer oositler birinci mayotik profazda 12-50 yıl beklerler [74]. Folliküldeki gelişim sürdükçe oosit de gelişerek ovulasyondan hemen önceki birinci mayoz bölünmesini (redüksiyon bölünmesi) tamamlar [69]. Primer oositin her kardeş hücresi aynı miktarda kromatin materyaline sahip olmasına rağmen, kardeş hücrelerden biri daha fazla miktarda sitoplazma alır ve sekonder oosit haline gelir. Sekonder oositin çapı ortalama 150 mikron metreye ulaşır. Birinci polar cisim (birinci kutup cismi) denilen diğer kardeş hücre ise çok az miktarda sitoplazma alır [74].

Ovulasyona 6-12 saat kala, 2. mayoz bölünmesine girmesine rağmen bu bölünme de tamamlanmaz ve ovulasyondan 3 saat önce metafaz evresinde duraklar [69, 74]. Bu bölünme ise, sadece sekonder oosit bir spermatozoon tarafından penetre edildiğinde tamamlanır. Bu olayın gerçekleşmesini takiben sekonder oosit ikinci mayoz bölünmesini tamamlar ve 23 kromozom setine sahip maternal pronükleuslu olgun bir ovum meydana gelir. Bu bölünme sonucu ortaya çıkan diğer hücre ikinci polar cisim olarak adlandırılmaktadır [74].

Bu döngüye katılan folliküllerin ilk gelişmeye başlamaları ise FSH kontrolü altındadır. [69]. Bu süreçte teka tabakasında da değişimler görülmektedir. Teka interna hücreleri sitoplazmalarında lipid depolayarak steroid üretebilen hücrelere dönüşürler. LH uyarımı ile bu hücrelerden salgılanan androjenler daha sonra östrojenlere çevrilirler. Androjenlerin bir kısmı granülsüz endoplazma retikulumunda FSH uyarımı yolu ile granüloza hücrelerinin çoğalmasını stimüle eden östrojenlere dönüştürülür [69].

2.1.5. Ovulasyon

Sekonder oositin Graaf follikülünden karın boşluğuna atıldığı süreçtir [69, 74]. Bu olay 28 günlük döngünün yaklaşık 14. gününde gerçekleşmektedir [74]. Her döngü başında FSH ile uyarılan 15-20 primer follikülden sadece bir veya ikisi gelişimini tamamlar. Bu nedenle her menstrual siklusta bir veya iki adet oosit olgun hale gelerek karın boşluğuna atılır [69]. Atılan bu hücre sekonder oosit olup, sonrasında tuba uterinaların uçlarında bulunan fimbriyaların vasıtasıyla buradan alınarak uterusu doğru taşınır. Ovaryum yüzeyinden ayrılmasını takiben 24 saat canlılık özelliklerini koruyan oosit, bu dönemde fertilizasyona uğramaz ise dejenere olarak kaybolur [69]. Ovulasyon, hormonların kontrolü altında gerçekleşen bir süreçtir ve her siklusta ovulasyon öncesinde ve sonrasında farklı hormonlar etkilidir [69, 74]. FSH, servikal mukusun spermin ilerlemesini sağlayacak şekilde değişmesine, endometriumun proliferatif döneme girmesine ve ovulasyonda asıl etkili olan LH'nin döngünün ortalarında artan miktarlarda salgılanmasına neden olur [69]. LH, oositin 1. mayoz bölünmesini sonlandırıp 2. mayoza girmesine, folliküler stromal hücrelerin progesteron sentezlemesi yönünden uyarılmasına (luteinizasyon) ve sonuçta follikülün çatlayarak ovulasyona gitmesine yol açar [69].

Ovulasyondan hemen önce Graaf follikül ovaryum yüzeyine doğru bir çıkıntı oluşturur. Bu süreçte makula pellusida veya stigma olarak adlandırılan bu küçük alanın kanlanması bozulur. En sonunda stigma inceliyor yırtılarak ovulasyon gerçekleşmiş olur [69]. Bu süreçte oosit ile, zona pellusida ve çevresindeki korona radiata hücreleri ovaryum yüzeyinden atılmış olur. [69].

Ovulasyondan sonra teka internada bulunan kapillerlerin rüptüre olması nedeniyle follikül boşluğunda gerçekleşen kanama sonrası korpus hemorajikum ortaya çıkar. Büzüşen follikül duvarı kıvrımlar yapar. Bu sırada bağ dokusu hücreleri follikülü işgal eder ve sonrasında granüloza ve teka interna hücreleri morfolojik değişimler geçirirler. [69]. Bu hücreler, steroid üreten hücrelerin sitoplazmalarında gösterdiği yaygın granülsüz endoplazma retikulumu, bol mitokondriyon ve lipid damlalarının bulunması özelliklerini kazanırlar. Hücrelerin arasında teka internadan köken alan çok sayıda kan ve lenf kapillerleri bulunur. Tipik endokrin doku özelliklerine sahip olan bu yapıya korpus luteum denir [69].

Ovulasyonda etkili olan faktörler [69]

- Follikül sıvısının hacim ve basıncında yaşanan artış,
- Follikül duvarının, matriks metalloproteinazların enzimatik aktivitesi ile parçalanması,
- Oosit-kumulus kompleksi ile membrana granülozum arasında glukozaminoglikan birikimi (özellikle hyaluronik asit),
- Prostaglandinlerin teka internada yer alan düz kaslarda meydana getirdiği kontraksiyon etkisi.

2.1.6. Korpus Luteum

Korpus luteum, granüloza tabakasından gelen granüloza lutein hücreleri ve teka interna tabakasından gelen teka lutein hücreleri olmak üzere iki tip hücre grubu içerir ve endokrin özelliğe sahip bir yapıdır [69, 74].

Granüloza lutein hücreleri veziküler nükleusu olan ve soluk boyanma özelliğine sahip geniş (yaklaşık 30 µm çapında) hücrelerdir. Sitoplazmalarında ise bol miktarda lipid

damlaları vardır ve bu hücreler progesteron üretmeye başlarlar [69, 74]. Korpus luteumda bulunan diğer grup olan teka hücreleri ise granüloza hücrelerinden daha küçük yapıda olup, heterokromatik görünümlü nükleusa sahiptirler. Bu hücreler ovulasyondan önce salgıladıkları gibi östrojen salgılamaya devam ederler [69].

Korpus luteumdan salgılanan bu hormonların uterus duvarının gebeliğe hazır hale getirilmesinde çok önemli işlevleri vardır. Eğer ovule olan oosit herhangi bir sperm ile döllenmez ise korpus luteum oositin atılmasından ortalama olarak dokuz gün sonra dejenere olur. Bu yapıya menstruasyon korpus luteumu adı verilir. Hücreleri küçülüp vaskülarizasyonu azalan korpus luteumda dejenerasyon oluşur ve hücreler apoptoz ile ölmeye başlar. Bu süreçler ilerlerken genişleyen bağ dokusunda hiyalinizasyon gözlenmeye başlar ve korpus luteum giderek beyaz bir skar yapısı olan korpus albicans haline gelir. Eğer ovüle olan oosit bu dönemde fertilizasyona uğrar ise sinsitrotrofoblastlarca salgılanan hCG sayesinde korpus luteum varlığını devam ettirerek daha da gelişir ve gebelik korpus luteumunu meydana getirmektedir. Bu luteal hücreler, plasenta 2. ay itibari ile hormon üretmeye başlasa da, 4. ayın sonuna kadar da progesteron üretmeyi sürdürürler. Bu zamandan sonra bu görevi tamamen plasenta üstlenmektedir. Bu sürenin sonunda gebelik korpus luteumu da yerini korpus albicans'a bırakmaktadır. Fakat oluşan bu yapı menstruasyon korpus luteumundan köken alan korpus albicans'tan daha büyüktür [69, 74].

2.1.7. Folliküler atrezi

Ovaryumda gerçekleşen folliküller atrezi, embriyonik dönemden itibaren başlayarak düzenli bir şekilde devam eden bir süreçtir [74]. Puberte sonrası ovaryumdan alınan herhangi bir kesitte atreziye uğrayan farklı evrelerdeki folliküller izlenebilmektedir. Follikül hücrelerinin çekirdeklerinin piknotik hale gelmesi ve sitoplazmalarının dağılması bu süreçte ilk gözlemlenen değişikliklerdir. İlerleyen süreçte makrofaj ve diğer bağ dokusu hücreleri tarafından follikül invazyona uğratılmaktadır. Sonrasında ise oosit dejenere olur ve arkasında belirgin bir zona pellusida yapısı bırakır. Bu süreçte follikül içe katlanabilir ya da kollabe olabilir ama kalınlığı ve boyanma özelliklerini genelde kaybetmez. Eğer kesit alanında bulunduğu takdirde şeklini yitirmiş zona pellusida yapıları, atretik follikülün

belirlenmesinde güvenilir veriler sunmaktadır. Olgunlaşma sürecinin sonuna yaklaşmış olan büyük folliküllerdeki atrezi olayında teka interna hücreleri ovaryum korteksinde kümeler oluşturan epiteloïd hücreler halinde kalırlar. Bu hücreler hep birlikte interstisyel bezler olarak tanımlanırlar ve steroid yapıdaki hormonları salgılama işlevini sürdürürler [74, 75].

2.1.8. Ovaryan siklusun hormonal düzenlenmesi (menstrual siklus)

Her menstrual siklusda ovaryum iki fazlı döngüsel değişimler geçirir. Bu fazlar, folliküler faz ve luteal faz olarak ikiye ayrılır. Ovulasyon bu iki fazın arasında meydana gelir [74].

Folliküler Faz

Folliküler faz, FSH ve LH kontrolü altında sayıları 10 ile 20 arasında olan az sayıda primer follikülün gelişmesiyle başlar. Menstrual döngünün 5-7. günlerinde dominant folliküllerin seçimi yapılır. FSH, döngünün 8-10. günlerinde follikül büyümesini kontrol eden ana hormondur. FSH, başlıca östrojenler gibi steroid yapıda olan hormonları follikül lümenine salgılayacak olan granüloza ve teka hücrelerini uyarır. Bu süreçte dominant folliküldeki östrojen üretimi ile hipofiz bezinden FSH salınması arasında bir geri bildirim vardır ve buradaki östrojen üretimi arttıkça hipofizdeki FSH üretimi de baskılanır [74]. Süreç devam ederken, üretilen östrojen follikül lümeninde birikir ki en sonunda ulaşılacak düzey ile gelişimin ve büyümenin sürmesi için folliküllerin FSH'a olan bağımlılığı ortadan kalkar. Ovulasyondan önceki geç folliküler evrede LH'nin tesiriyle progesteron seviyeleri artmaya başlar. Kanda bulunan östrojen konsantrasyonu ile adenohipofizin artık daha fazla FSH üretmesi baskılanır. Ovulasyonu indükleyen değişim, FSH'daki küçük artışların eşlik ettiği ani LH yükselişidir. Ovulasyon, LH seviyesinin ani yükselmesinin başladığı andan itibaren ortalama 34-36 saat sonra veya LH'nin en yüksek seviyeye gelmesinden ortalama 10-12 saat sonra meydana gelir [74].

Luteal Faz

Ovulasyonun hemen ardından, rüptüre follikülün granüloza ve teka hücrelerinin geçirdiği hızlı morfolojik değişiklikleri ile korpus luteumu meydana getirmesi luteal fazı başlatır.

Oluşan korpus luteum yüksek miktarlarda progesteron ve östrojen salgılar. Oositin bir spermatozoon tarafından penetre edilmesi halinde bu iki hormonun, özellikle de progesteronun aktivitesiyle, endometriyumun implantasyona hazırlanması amacıyla gerekli olan sekretuar evreye girilir [74]. Menstrual döngü boyunca korpus luteumun gelişiminin ve sürekliliğinin LH'nın kontrolünde olduğu düşünülmektedir. Fertilizasyon olmadığı takdirde, hormon seviyelerinin azalması nedeniyle korpus luteum birkaç gün içinde dejenere olur. Fertilizasyonun gerçekleşmesi durumunda, korpus luteum muhafaza edilir ve östrojenleri ve progesteronu üretme görevini sürdürür. İlk zamanlarda sinsityotrofoblastlarca salınan hCG hormonu, ilerleyen süreçte plasenta tarafından üretilir. HCG, korpus luteumu uyarır ve gebelik boyunca bu yapının sürekliliğinden sorumludur [74].

2.2. İnfertilite

2.2.1. İnfertilite tanımı ve prevalansı

İnfertilitenin tanımı 2013 yılında Amerikan Üreme Tıbbı Derneği tarafından güncellenerek yayınlanmıştır [76]. Buna göre; infertilite, 12 ay veya daha fazla zaman boyunca korunmasız cinsel ilişki veya terapötik donör inseminasyonu sonrasında başarılı bir gebeliğin sağlanamaması ile tanımlanan bir hastalıktır [76].

İnfertilite prevalansı kadınlarda yaklaşık %13 iken erkeklerde %10'dur. Bunlara ek olarak kadınlar arasında infertilite prevalansı yaşla birlikte artar [77]. Bir çalışmada, 32 ve 38 yaşında, kadınların %12 ve %21'i infertilite olarak raporlanmıştır [78]. Kadınların doğurganlık potansiyeli 35 yaşından sonra azaldığı için, çoğu otorite infertilite değerlendirmesinin, 35-40 yaş arası kadınlarda 6 ay, 40 yaşın üzerindeki kadınlarda ise 3 ay sonra başlatılmasını önermektedir [79, 80]. Bu üreme güçlüğü'nün birincil nedeni yaşlanma ile fertilizasyon oranlarındaki azalmadır. 30 ile 34 yaşlar arasındaki fertilizasyondaki azalma %15-19 olarak tespit edilmişken, 35-39 yaş aralığında ise bu düşüş oranı %26-46 kadar yükselmektedir. Ayrıca, 40 ile 45 yaş skalasında %95 e varan bir düşüş oranı gözlenmektedir [81].

2.2.2. İnfertilite tedavi yöntemleri

İnfertilitenin tedavi edilmesi amacıyla kullanılan tedavi yöntem ve teknikleri başlıca Klomifen sitrat ile ovulasyon indüksiyonu, gonadotropin uygulaması ile ovulasyon indüksiyonu ile bunlarla beraber uygulanan intrauterin inseminasyon ve yardımcı üreme teknikleridir [82].

Yardımcı üreme teknolojileri (YÜT)

Yardımcı üreme teknolojileri (YÜT), oositlerin vücut dışında doğrudan manipülasyonunu içeren tüm teknikleri içermektedir [83]; Gamet intrafallop transferi (GIFT), zigot intrafallop transferi (ZIFT), in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik enjeksiyon (ICSI) başlıca yardımcı üreme teknikleridir [82].

In vitro fertilizasyon

In vitro fertilizasyon, YÜT'nin ilk ve hala en yaygın kullanılan türüdür ve diğer ilgili teknikler de YÜT'nin kapsamında bulunmaktadır. Modern YÜT'nin başarısı, infertilitenin hem değerlendirilmesinde hem de tedavisinde tam anlamıyla devrim yaratmıştır [83]. IVF, eksojen gonadotropinler ile kontrollü over hiperstimülasyonu ile başlayan ve ardından transvajinal ultrasonografi rehberliğinde ovaryumlardan oositlerin alınması, laboratuvarda döllenme ve embriyoların uterusu transservikal transferini içeren bir süreçtir [83].

2.3. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyonu (KOH)

1980'lerin başında kontrollü ovarian hiperstimülasyon (KOH) tekniğinin geliştirilmesi doğal bir döngüden elde edilenden daha fazla sayıda uygun oosit elde edilmesine olanak vermesi, her ne kadar geleneksel inseminasyonu kendi başına etkilemese de, bu sayede tüm IVF sürecini daha verimli kılmıştır. Herhangi bir infertilite tedavisinde uygulanan ovaryan stimülasyon tekniği, daha yüksek gebelik şansı sağlarken, çoklu gebelik ve ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gibi büyük yan etkilere de neden olabilmektedir [84]. Stimülasyon ajanlarının türü ve dozu, stimülasyon rejimleri ve diğer ajanlarla birlikte uygulanması, gebelik oranları, canlı doğum oranları ve komplikasyon

oranları açısından sonuçları etkilemektedir [84]. Zaman içerisinde hastaların over rezervlerine ve stimülasyona alınacak cevapların farklılığına göre bazı protokoller geliştirilmeye çalışılmıştır. Hastaya özgü oluşturulan KOH protokollerinde en yüksek gebelik oranları ile en az istenmeyen yan etkiler amaçlanmaktadır [85].

2.3.1. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokol seçimi

Uygulanacak KOH protokolünün seçimi; hastanın yaşına, tedavi öncesi yapılan ultrasonografi sonucuna, hormonal test sonuçlarına ve daha önce IVF denemesi olmuş ise alınan cevaba göre yapılır. Böylece hastaya en uygun olan tedavi protokolü oluşturulmaya çalışılır. Otoritelerce kabul gören yaklaşım daha önce başarısız sonuç alınan protokolün değiştirilmesidir [85]. Alışlagelmiş IVF protokollerinde, döngü üzerinde daha kolay kontrol sağlamak amacıyla kadına özgü hormonlar baskılanır. Bu süreçte gonadotropinler ve bunlardan başka agonistler ve antagonistler de kullanılmaktadır [85].

2.3.2. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunda kullanılan ajanlar

Gonadotropinler

Gonadotropinler terimi, FSH ve LH içeren ilaçlar için kullanılmaktadır [86]. 20. yüzyılın ilk yarısından itibaren bu preparatlar infertilite tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır [85]. Ovaryumları uyarmak için kullanılan ilk preparatlar, gebe kısırak serumundan, domuz ve insan hipofiz ekstrelerinden saflaştırılarak elde edilmiştir. Ascheim ve Zondek ilk olarak 1927 yılında, adenohipofizden salgılanan gonadotropik faktör ile aynı etkiye sahip olan bir proteini gebe kadınların idrarından izole ederek "gonadotropin" ya da "prolan" olarak adlandırmışlardır [85].

İnsan menopozal gonadotropini (hMG)

Gebe kadınların idrarından izole edilen gonadotropinlerin keşfinden sonra Zondek 1930 senesinde postmenopozal kadınların idrarlarında da gonadotropinlerin bulunduğunu ortaya çıkarmıştır [85]. İnsan menopozal gonadotropini (hMG), menotropin de denmektedir, ilk olarak anovulatuvar infertil olan hastalarda ovulasyon indüksiyonu için

kullanılmıştır. IVF tedavilerinin başladığı 1980'lerin başında multifoliküler ovarian gelişiminin uyarılmasında önemli bir yeri vardır [85, 87].

İnsan koryonik gonadotropini (hCG)

Ascheim ve Zondek tarafından 1923 yılındaki yaptıkları gözlem sonucunda hCG varlığı keşfedilmiştir. Bu çalışmada gebe kadınların idrarının, olgunlaşmamış farelere enjekte edildiği ve sonucunda bu idrar örneğinin hem folliküler olgunlaşmayı hem de overin stromal luteinizasyonunu indükleyen gonad uyarıcı bir madde içerdiği ortaya çıkarılmıştır [87]. Sonrasında, in vitro olarak hCG'nin plasental doku tarafından salgılandığı, sinsitiyotrofoblast'a lokalize olduğu ve dev sinsitiyotrofoblast hücrelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir [87]. Bu çalışmanın sonrasında plasental orijinli olanlar için "koryonik gonadotropin" terimi kullanılmaya başlanmıştır [85]. hCG'nin keşfinden sonra, KOH protokollerindeki ovulasyonun uyarılmasında hCG uygulaması üzerinden durulmuştur [88].

Eğer preovulatuvar folliküller oluştuğunda, hCG kullanılırsa granüloza hücrelerinde luteinizasyon, östrojen yerine progesteron üretimi, mayoz bölünmenin başlaması, oosit olgunlaşması ve 36-40 saat sonra follikül rüptürü gerçekleşmektedir. Fakat bu olayların gerçekleşmesi uygun boyutta follikül varlığına ve granüloza ve teka hücrelerindeki LH reseptörlerinin LH'ye olan isteklerinin de uygun olmasına bağlıdır. hCG'nin sahip olduğu moleküler yapının LH'ninkine benzerliğinden dolayı geç folliküler fazda gerçekleşen LH yükselmesine benzer şekilde hCG kullanılmaktadır. LH gibi hCG de ortalama 30 kDa ağırlığa sahip, glikoprotein yapısında olup, hemen hemen benzer alfa alt-ünitelere sahip, yüksek sistein içerikli bir moleküldür. Bunlara ek olarak hem hCG hem de LH'nin, luteinizasyonu uyarmak ve lutein hücrelerini desteklemek gibi işlevleri vardır. İkisi arasındaki temel farklılıklar, beta alt-ünitelerinin farkı, salgılanmalarının düzenlenmesi ve hCG'nin farmakokinetik klirensindeki değişikliklerdir [85].

Gebe kısırak serum gonadotropini (PMSG)

Cole ve Hart tarafından hMG keşfi ile aynı sene içinde, gebe kısırakların serumundan gonadotropinlerin izole edilmesi başarılmış ve hayvanlarda PMSG'nin güçlü gonadotropik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [85].

Gebe kısırak serum gonadotropini, gebe kısırakların koryonunda bulunur ve gebe kısırakların kanlarından laboratuvar ve klinik çalışmalarda kullanılmak üzere sterilize edilerek toz haline getirilebilecek şekilde büyük miktarlarda elde edilebilmektedir [87]. At familyasında, PMSG sadece LH benzeri aktiviteye sahiptir ve ata ilişkin koryonik gonadotropin (eCG) olarak bilinir. Diğer türlerde, PMSG hem FSH hem de LH aktivitesine sahiptir ve folliküllerin gelişimini, ovulasyonu ve korpus luteum oluşumunu uyarmaktadır [87].

Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları

Gonadotropin salgılatıcı hormon

Gonadotropin salgısının kontrolü, başlangıçta LH salgılayan hormon olarak bilinen gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) hipotalamik salınımı ile gerçekleştirilir. GnRH, medial bazal hipotalamusta, esas olarak arkuat nükleusun içinde ve ventral hipotalamusun preoptik bölgesinde yer alan gevşek bağlı bir grup nörondan üretilir ve salınır. Hücrelerin gövdesinde sentezlenip, aksonlar boyunca sinapslara taşınır ve pulsatil bir şekilde hipofiz bezinin portal sisteminin kompleks kapiller ağına salınır. GnRH ilk olarak 1971'de sonrasında Nobel Ödülü'nü kazanan Andrew Schally ve Roger Guillemin tarafından bağımsız bir şekilde izole ve karakterize edilerek, sentezlenmiştir [89].

GnRH, birkaç diğer beyin peptitleri gibi, 56-amino asit dizisine içeren GnRH ile ilişkili peptit olan çok daha büyük bir öncü peptitin bir parçası olarak sentezlenen bir dekaeptittir. GnRH'nin yapısı, insanlar dâhil tüm memeliler için ortaktır ve etkisi hem erkeklerde hem kadınlarda benzerdir. GnRH adenohipofizde yerleşmiş gonadotropik hücrelerin membranındaki kendine ait transmembran reseptörüne bağlanarak reseptörün

dimerizasyonuna neden olur. Ardından FSH ve LH'nin yapım ve salgılanmasını başlatan hücre-içi yolağı aktive eder [85].

GnRH yarı ömrünün oldukça kısa oluşu ve enzimatik yıkım ile hızla inaktif olmasından dolayı daha uzun süre GnRH reseptörlerini uyarabilecek yeni ajanların arayışına girilmiştir. Bunun içinde de GnRH'nin aminoasit dizisinde yeni düzenlemeler ile daha uzun yarı ömre ve daha yüksek reseptör affinitesine sahip yeni preparatlar üretilmiştir [85].

GnRH agonistleri (GnRH-a)

GnRH agonisti (GnRH-a) deri altı enjeksiyonuyla verilen sentetik bir hormondur. Bir GnRH-a uygulanması başlangıçta hipofiz bezinden FSH ve LH'nin salınmasına neden olur. Bununla birlikte, devam eden uygulama ile hipofiz gonadotropoları tarafından FSH ve LH'nin salınmasını en aza indiren ve oluşacak olan bir LH dalgalanmasını önleyen GnRH reseptörlerinin aşağı regülasyonu oluşur. GnRH agonistleri, IVF tedavisi gören kadınlara gonadotropinlerle uygulanır. Asıl yararı, bir GnRH agonisti ile ön etkileşmenin bir LH dalgalanmasını önlemesidir. Bu ajanlara örnek olarak; Löprolid, Buserelin, Goserelin ve Histrelin verilebilir [86].

GnRH antagonistleri (GnRH-ant)

GnRH antagonistleri, GnRH reseptörlerine geri dönüşümlü olarak bağlanır. Böylece FSH ve LH'nin salınmasını önler. FSH ile GnRH antagonistlerinin kullanımının en büyük yararı, LH dalgalanmasının bastırılmasıdır. GnRH agonistlerinin aksine, GnRH antagonistleri bir LH dalgalanmasının önlenmesinde acil bir etkiye sahiptir ve tedavi döngüsü sırasında daha az enjeksiyon gerektirir. Bu ajanlara örnek olarak; Ramorclic, Cetrorelix, Ganirelix verilebilir [86].

Diğer kullanılan ajanlar

Yukarıda bahsedilen ajanlara ek olarak ovaryan stimulasyon uygulamalarında; Klomifen sitrat, Aromataz İnhibitörleri (Letrozol), oral kontraseptifler, Tamoksifen, büyüme hormonu, testosteron ve metformin de kullanılmaktadır [73, 85].

2.3.3. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolleri

Pratikte IVF'de çoklu sayıda oositin elde edilmesi sayesinde gelişecek embriyolardan seçim yapma şansının fazla olması gebelik oranının arttırılabilmesi için önemlidir. Hipotalamo-hipofizer aks da doğal olarak var olan pozitif ve negatif geri-besleme mekanizmaları monofoliküler bir ovaryan siklusunun oluşmasını sağlar. Bununla birlikte estradiol seviyesi eşik düzeyi geçerse, hipofizden LH tetiklenmesi ile oluşan LH dalgası spontan bir ovulasyona neden olmaktadır. Sadece gonadotropinler ile ovaryum stimülasyonlarının yapıldığı zamanlarda döngülerin ortalama %20'sinde bu etkenlerden dolayı prematür LH dalgalanması gerçekleşmekte ve bu da sürdürülen döngülerin iptaline neden olmaktadır [90].

GnRH'nin uyardığı gonadotropin salgılanma rejimi geç folliküler dönemde yaklaşık 71 dakikada bir olmakta iken, geç luteal dönemde 216 dakikada bir gerçekleşmektedir. Eğer hipofiz saatte 3 'ten fazla veya sürekli GnRH' la stimüle edilirse, bu bezdeki reseptörler duyarsızlaşarak normal FSH ve LH sekresyon rejimi bozulur. Bu fizyolojik sürecin bulunmasından ve GnRH'nin da kimyasal yapısının aydınlatılmasından sonra geliştirilen GnRH agonist analoglarının 1980'li yıllarda IVF uygulamalarında kullanılmaya başlanması ile hipofiz bezinin duyarsızlaşmasına ve baskılanmasına olanak tanınmıştır [90].

GnRH agonistleri, hipofizden FSH ve LH gonadotropinlerinin kan dolaşımına salgılanmasını sağlar ve bu etkiye "flare-up etkisi" denir. Ortalama değişmeyen bir dozda verilen agonist analogları 5 ile 7 günlük süreden sonra, hipofiz bezindeki GnRH reseptörlerinin hücre membranından sitoplazmaya çekilmesine sebep olarak hipofizin duyarsızlaşmasına yol açarlar [91]. Bu durumda da dolaşımdaki Estradiol seviyesi, hipofiz bezinde pozitif geri-besleme mekanizmasını aktive edemez ve oluşabilecek bir erken LH yükselmesi engellenmiş olur. Bu gelişmeler sayesinde uygulanan gonadotropin miktarı arttırılabilmekte, ayrıca döngü süreleri daha da uzatılabilmektedir. Sonuç olarak; uygulanan stimülasyon artık kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) olarak tanımlanabilir [90].

GnRH agonist (GnRH-a) protokolleri

GnRH agonistleriyle, uzun ve kısa olarak ortak iki protokol geliştirilmiştir. Zamanla bu protokollerde ufak düzenlemeler sonucu varyasyonlar da ortaya çıkmıştır. Her iki protokolda de aynı ajanlar uygulanırken, doz ve uygulanma dönemleri değişmektedir. GnRH-a'lerinin uygulamasına erken folliküler fazda veya önceki siklusun luteal fazı ortasında başlanabilir. Hangi GnRH-a protokolünün daha iyi sonuç vereceği yönündeki araştırmalar halen sürmektedir [85].

Şu ana kadar ki geliştirilen agonist baskılamalı protokoller [85];

- Kısa Agonist Protokolleri: Kısa (co-flare up protokol), Mikrodoz flare-up, Ultrakısa protokolleri
- Uzun Agonist Protokolleri: Uzun luteal, Uzun folliküler, Depo-uzun, Oral kontraseptif + Luteal long protokolleri.

GnRH antagonist (GnRH-ant) protokolleri

GnRH antagonistleri hipofizer GnRH yolağını doğrudan baskılayabilmektedir ve bunu yaparken de başlangıç agonistik etki (flare-up etkisi) oluşturmaz [85, 90]. GnRH-ant protokollerinin kullanılmasındaki asıl amaç, el verdiği sürece normal bir döngünün taklit edilmeye çalışılmasıdır. Spontan menstruel döngü kullanılarak folliküler stimülasyon sırasında endojen kaynaklı gonadotropinler de en etkin biçimde değerlendirilmekte ve beklenen LH yükselmesinden hemen önce uygulanacak GNRH-ant ile hipofiz baskılanması sağlanmaktadır. Günümüzde fix tek doz ve multipl doz olmak üzere 2 tip protokol tercih edilmektedir. [85, 90].

2.3.4. Kemirgenlerde süperovulasyon

Ardışık PMSG ve hCG enjeksiyonlarını içeren rejimler ilk önce Runner tarafından olgunlaşmamış farelerde östrus, ovulasyon ve koitusu indüklemek için kullanılmıştır. Fowler ve Edwards 1957 de, PMSG enjeksiyonunu takiben 48 saat sonra hCG uygulanan yetişkin fareler kullanarak, östrus'a girilmesi, profaz I'den metafaz II'deki ilk polar

cisimciğin salınmasına kadar art arda gelen mayotik aşamalar boyunca ilerlenmesi ve ovulasyon ve implantasyon için gerekli olan süreleri gözlemleyip tanımlamışlardır [87].

2.3.5. KOH monitorizasyonu ve monitorizasyonun amaçları

Ovaryan stimülasyon uygulamasındaki amaç, çok sayıda follikül gelişimi ile uygun sayıda olgun oosit ve kaliteli embriyo sağlanmasının yanında stimülasyonun komplikasyonlarından, özellikle ciddi ve ölümcül olabilen OHSS den kaçınmaktır. Bunun için tedavi uygun biçimde monitorizasyon gerektirmektedir [92]. KOH öncesinde başlatılmalıdır. Tedaviden önce kötü veya aşırı yanıt verecek olgular tespit edilerek, hastaya özgün tedavi uygulanıp hastaya özgü doz seçimi yapılmalıdır. Ovaryum cevabının tahmin edilip ve en uygun tedavi protokolünün seçilebilmesi için over rezervi değerlendirilmelidir. Uzun protokol uygulamasındaki başlangıç safhasında yeterli hipofizer inhibisyonun varlığı tespit edilmelidir. Uygulanan ovaryan stimülasyon ilaçlarının etkileri değerlendirilerek dozların bu verilere dayanarak hesaplanmalıdır. Ovulasyonun uyarılması için en uygun tarihe karar verilerek OHSS'nin ortaya çıkmasının engellenmesi amaçlanır [92].

2.4. Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)

2.4.1. OHSS'nin tanımı ve insidansı

Ovaryan hiperstimülasyon sendromu ovaryumun medikal manipülasyonu sonucu ortaya çıkan en ciddi komplikasyondur [93]. Tam ovulasyon indüksiyonuna (Oİ) ihtiyaç duyan gebe kalmak isteyen ovule olamayan hastalarda ve belli sayıda oosit alımının istendiği yardımcı üreme teknikleri (ART) uygulanan kadınlarda kontrollü ovaryan stimülasyonunda (KOH) görülür. Bu nedenle, OHSS, infertilite tedavilerinin bir sonucu olarak genç sağlıklı bireyleri etkileyen, iatrojenik bir durumdur [93]. OHSS, abdominal distansiyon ve huzursuzluk, genişlemiş ovaryum, asit, gelişmiş ovaryum vasküler geçirgenliği ve diğer komplikasyonlarını da içeren geniş bir belirti ve semptom yelpazesine sahiptir [93-95].

Şiddetli formu ile OHSS, hayatı tehdit edici bir durumdur; çünkü böbrek yetmezliğine, felç ve bir ekstremitenin perfüzyonun kaybını içeren venöz veya arteriyel tromboembolik

olaylara neden olabilir [93]. Aynı zamanda anne ölümüyle de ilişkilendirilmişti [96]. Bunlara ek olarak OHSS, iş, yatak istirahati ve hastanede kalmanın yanı sıra, ağır vakalardaki yoğun tıbbi yönetim nedeniyle önemli bir ekonomik kayba neden olmaktadır. OHSS'nin gerçek insidansının belirlenmesi, sendromun genel kabul görmüş bir tanımı olmadığı için zordur. Ayrıca, uygulanacak olan klinik yöntem (OI veya KOH), kullanılan ilaçlara ve tedavi edilen hasta tipine (risk altında olan veya altında olmayan) bağlıdır [93]. Zamanlanmış ilişki veya intrauterin inseminasyon (aşılama) için klomifen sitrat veya aromataz inhibitörleri ile ovulasyon indüklendiğinde hafif bir OHSS formu oluşabilir, fakat orta ila şiddetli OHSS nadiren olsa da görülmektedir [97].

2.4.2. OHSS'nin sınıflandırması

Diğer hastalıklarda olduğu gibi OHSS'nin klinik bir spektrumu vardır. Bu spektrumun bir ucunda hafif belirti ve bulgular yer alırken, diğer uçta yoğun yönetim gerektiren hastalar ve ölüm riski yer almaktadır. Sınıflama iki nedenden dolayı yapılmıştır [98]:

- Hastalık tedavisinin daha iyi idare edilmesi ve öngörülmesi amacıyla farklı evrelerin insidansını hesaplamak.
- Optimal ve standart tedavi şemasını meydana getirerek tedaviyi bireyselleştirmek.

Rabau ve arkadaşlarının 1967'de ilk olarak ortaya koyduğu, ardından Schenker ve Weinstein'in 1978' de revize ettiği sınıflama sistemi klinik görünüm ve laboratuvar bulguları temel alınarak oluşturulmuştur [97, 98]. OHSS, hafif, orta ya da şiddetli formlara karşılık gelen üç kategoride ve altı derecede (grade) sınıflandırılmıştır [7, 12].

Çizelge 2.1. OHSS'nin sınıflandırılması

OHSS Sınıflama [97]		
Sınıflama		Klinik ve Biyokimyasal Özellikleri
Hafif OHSS	Grade 1	Sadece Lab. Bulguları (Total üriner E2>150 mg/24 saat)
	Grade 2	Grade 1 + Ovaryan büyüme (<5 cm)
Orta OHSS	Grade 3	Hafif OHSS + Abdominal distansiyon
	Grade 4	Grade 3 + Bulantı, kusma, diare, ovaryan büyüme (5-12 cm)
Ciddi (Şiddetli) OHSS	Grade 5	Orta OHSS + Asit ve/veya hidrotoraks
	Grade 6	Hepsi + hemokonsantrasyon, koagulopatiler ve renal yetmezlik

Hafif form, yüksek serum 17-estradiol (E2) ve progesteron (P4) seviyeleri, yani “kimyasal OHSS” olarak tanımlanır. Ovaryumlar, çap olarak 5 cm'den küçük olup, hafifçe büyümüştür [12]. Hafif form, birçok kadında izlenmektedir ve tedavinin hedefi olduğu için klinik önemi bulunmamaktadır. Eğer erken seviyede asit varlığı tespit edilirse ciddi OHSS olarak sınıflandırılır. Üçüncü boşlukta sıvı birikiminin olmadığı erken evrede bile az ya da orta miktarda sıvı ultrasonografi yöntemi sayesinde tespit edilebilmektedir. Asit bulgusuna rastlanması hastalığın çabuk bir şekilde ciddi forma evrilebileceğinin göstergesi kabul edilmeli ve yakından izlenilmesi gerekliliği unutulmamalıdır [98].

Orta formda şişkinlik, abdominal distansiyon ve huzursuzluğa mide bulantısı, kusma ve ishal eşlik eder. Ovaryumlardaki büyüme 5 ila 12 cm çapına kadar ulaşır [12].

Ciddi formda, ovaryum çapları genellikle 12 cm'den daha büyüktür, genellikle masif asitler ile çevrilidir, daha az sıklıkta hidrotoraks ve/veya perikardiyal effüzyonla bulunur ve nadiren de olsa, böbrek fonksiyon bozukluğu ve hemokonsantrasyon oluşabilir [12].

1992 yılında Navot ve arkadaşlarının ortaya koydukları kategorizasyonda ovaryan büyüme yerine klinik görünüm ve laboratuvar parametreleri dikkate alınmaya başlanmıştır. Bu yapılan sınıflamada yaygın (generalize) ödem ve karaciğer fonksiyon bozukluğu "ciddi form" olarak; gergin asit, ARDS, ciddi hemokonsantrasyon (htc>%55) ve lökositoz (>25000) "hayatı tehdit eden form" olarak kabul edilmiştir [98].

Çizelge 2.2. Ciddi ve kritik OHSS'nin karşılaştırılması

Ciddi OHSS	Kritik OHSS
Değişken büyüklükte over	Değişken büyüklükte over
Gergin asit ve/veya hidrotoraks	Gergin asit ve/veya hidrotoraks ve/veya perikardial efüzyon
Htc> %45	Htc> %55
BK> 15000 h/mm3	BK> 25000 h/mm3
Oligoüri	Oligoüri / anüri
Kreatinin 1,0-1,5 mg/dl	Kreatinin> 1,6 mg/dl
K.C disfonksiyonu	Renal yetmezlik
Anazarka tarzı ödem	Tromboemboli ARDS

1999 yılında ise Rizk ve Aboulghar [99] hafif formu klinik önemi bulunmadığından dolayı sınıflamadan çıkarmışlardır ve ciddi OHSS'yi ise grade A, B, C olarak gruplamışlardır [98].

Çizelge 2.3. Rizk ve Aboulghar'a göre OHSS sınıflaması [99]

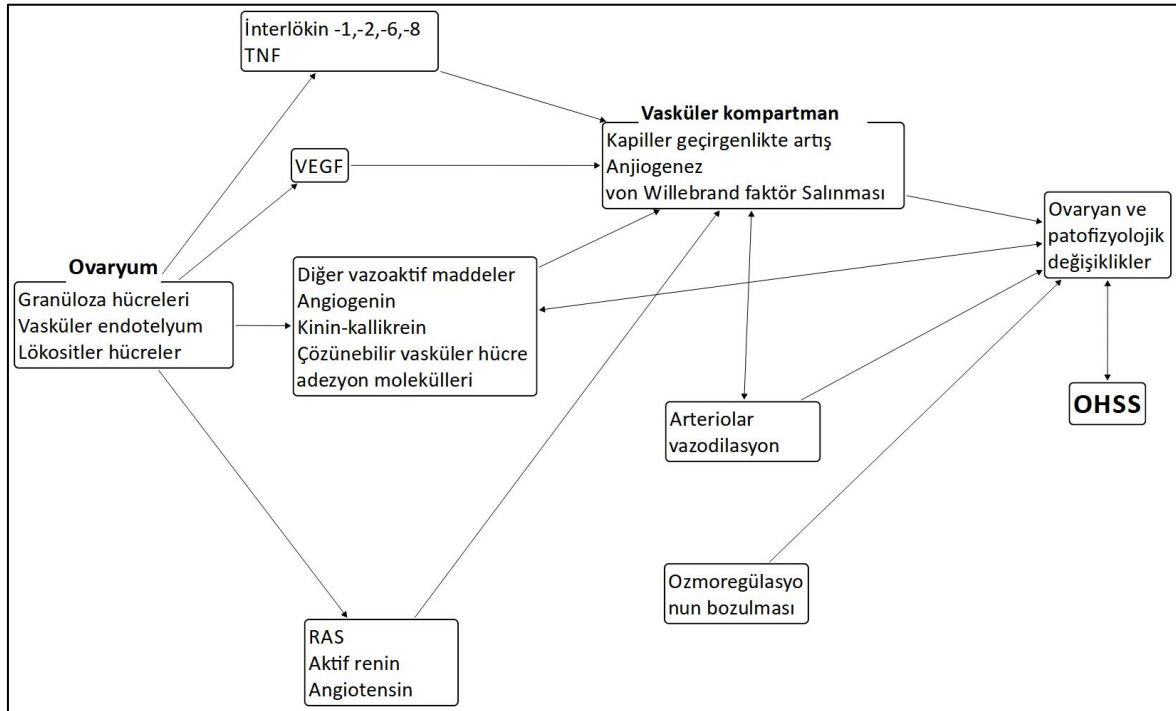
OHSS Sınıflama (Rizk ve Aboulghar, 1999)		
Sınıflama		Klinik ve Biyokimyasal Özellikleri
Orta OHSS		Huzursuzluk, ağrı, bulantı, distansiyon, asit, büyük overler, normal hematolojik ve biyolojik profil
	Grade A	Dispne, oligüri, bulantı, kusma, diare, abdominal ağrı, klinik asit varlığı, belirgin abdominal distansiyon veya hidrotoraks, USG'de belirgin asit ve büyük overler, normal biyokimyasal profil
Ciddi (Şiddetli) OHSS	Grade B	Grade A'ya ilave olarak masif gergin asit, belirgin büyümüş overler, ciddi dispne ve belirgin oligüri, artmış hematokrit, yükselmiş serum kreatinin ve karaciğer fonksiyon bozukluğu
	Grade C	ARDS, renal akım durması, venöz tromboz gibi komplikasyonlar

Özetle; OHSS hakkında birçok sınıflama yapılmasına rağmen OHSS'nin dinamik yapısından dolayı orta formların saatler içinde ciddi forma dönüşebileceği unutulmamalıdır [98].

2.4.3. OHSS'nin patofizyolojisi

Olgunun patofizyolojisi tam olarak açıklanamasa da OHSS'nin klinik görünümünden sorumlu altta yatan mekanizmanın, çeşitli kan damarlarının kapiller geçirgenliğindeki bir artıştan kaynaklandığı bilinmektedir [13-15]. Bu artmış vasküler geçirgenlik, akut hemodinamik anormallikler ve geniş bir klinik görünüm yelpazesi ile bağlantılı olarak sıvının intravasküler boşluktan “üçüncü kompartımana” hızlı ve yoğun bir şekilde kaymasına neden olur [13, 14].

OHSS'nin patofizyolojik sürecine birçok sistem ve aracının dâhil olduğu öne sürülmüştür. Bu faktörler; ovaryan renin–angiotensin sistemi (OVRAS), prostaglandinler, histaminler, sitokinler, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)/vasküler geçirgenlik faktörü (VPF), pigment epitel-kaynaklı faktör (PEDF)'dür [12-14, 16, 17].



Şekil 2.1. OHSS'nin patofizyolojisi [100]

Ovarian renin–angiotensin sistemi (OVRAS)

Renin-anjiotensin-aldosteron sisteminin yerel aktivasyonu, neovaskularizasyon ve kapiller geçirgenliği arttırarak OHSS'nin şiddetli formunun oluşumuna sebep olabilmektedir [13]. Renin-anjiotensin sisteminin bir parçası olan Anjiotensin II, çok etkili bir vazokonstrüktör faktördür. Bununla birlikte vasküler endotel hücrelerinde vazokonstriktif etki oluşturarak, vasküler geçirgenliğin artışına neden olur. OHSS'de belirgin özellik olan bu artış, anjiotensin II artışı ile birlikte olabilir [101].

Prostaglandinler

Prostaglandinler, OHSS'nin patofizyolojisinde geleneksel olarak kilit araçlar olarak ortaya sürülmüştür. Bu moleküller, Anjiotensin II üretimini arttırarak OHSS'yi doğrudan veya dolaylı olarak uyarabilir. Ayrıca, aşırı derecede artan farmakolojik östrojen seviyeleri de prostaglandin üretimini uyarabilir. Bir prostaglandin inhibitörü olan İndometazin'nin şiddetli OHSS olgularının tedavisinde bir önleyici olarak, daha sonra OHSS tedavisi için insan denemelerinde kullanılması hayal kırıklığı ile sonuçlanmıştır [12, 18]. Bunlara ek olarak, tavşan ovaryum dokusundaki prostaglandin sentezini azaltma kabiliyetine rağmen, İndometazin, farmakolojik dozlarda bile asit oluşumunu ve ovaryum büyümesini önleyememiştir [12].

Histaminler

Histaminler, OHSS'nin olası araçları olarak öne sürülmüştür [18, 102]. Bir çalışmada tavşan modeli kullanılarak, OHSS'de H1 reseptör blokerleriyle tedavi araştırılmıştır. Her ne kadar ilk sonuçlar, asit ve ovaryum kisti oluşumunu inhibe etmede cesaretlendirici olsa da daha sonraki çalışmalar hayal kırıklığı yaratmıştır. Bir diğer araştırmada, OHSS'li tavşanlarda veya kontrollerinde histamin düzeylerinde bir fark bulunamamıştır [12]. Benzer şekilde, Zaides, Friedman ve ark., iki farklı H1 reseptör antagonisti kullanmış, fakat OHSS'nin patofizyolojik mekanizmasında histamin veya serotonin rolünün olup olmayacağı hakkında hiçbir ipucu bulamamıştır. Bu nedenle, şu anda histaminlerin OHSS patogenezinde önemli bir rol oynadığına inanılmamaktadır [12, 18, 102].

2.4.4. Sitokinler

Bağıışıklık sistemi ile overler arasındaki etkileşim, gonadal fizyolojide gelecek için umut veren ve OHSS'nin yeni olası aracılarını öne süren bir alan olarak ilgi çekmektedir [18, 19, 103]. Bu nedenle, genel ovaryum fonksiyonu ve ovaryumdaki süreçler daha özgün olarak çeşitli sitokinler tarafından düzenlenebilir ve aracılık edilebilir [18, 19]. Sitokinler, aktiveleştirilmiş immünoregülatörler ve mezenkimal hücreler tarafından sentezlenen polipeptitlerdir. İnterlökinler, özellikle çeşitli intra-ovaryan düzenleme mekanizmalarının olası modülatörleri olarak birçok araştırmada çalışılmıştır [12, 18, 19]. Hiperstimule overlerden salınan faktör veya faktörler kana karışır ve bu maddeler peritoneal membranlardaki damarları stimule ederek sıvı kaçağına neden olur [20]. Sitokinler, folliküler sıvıda ve bunu çevreleyen over dokusunda tespit edilmiştir. İnterlökin IL-2, IL-6 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) artmış vasküler permeabilitede rol oynayan mediatörlerdir [21].

İnterlökin-6

İnterlökin (IL) -6 (20-30 kD, glikoprotein), esasen bağışıklık sistemi ve farklı tipteki adipoz doku, hepatositler ve ovaryum folliküler granüloza hücreleri tarafından üretilen bir pleiotropik sitokindir [104]. IL-6, başlangıçta hepatositlerden izole edilmiş bir interferon türü olarak tanımlanmıştır [19, 105]. IL-6'nın mRNA'sı in vivo olarak kendi kendini sınırlayan iki anjiyogenetik süreçte üretilir: Follikülogenezis ile ilişkili neovaskülarizasyon ve implantasyondan sonra uterus desidua kapiller ağın oluşumu [106].

Geva ve Lessing, IL-2, IL-6 ve TNF- α 'nın OHSS gelişimindeki olası rolünü belirlemeye çalışmışlardır [107]. Araştırmacılar, yüksek veya düşük yanıtı sahip, OHSS olmayan kontrollere oranla daha sonra OHSS gelişen IVF hastalarının folliküler sıvısında anlamlı olarak daha yüksek IL-6 seviyeleri bulmuşlardır. Bu nedenle, yumurta toplanması sırasında IL-6'nın folliküler sıvı konsantrasyonunun IVF hastalarında OHSS'nin gelişimini olumlu yönde tahmin edebileceği görülmektedir [19]. Bunlara ek olarak, IL-2, IL-6 ve TNF- α 'nın folliküler sıvısındaki konsantrasyonları ile serum E₂ düzeyleri veya alınan oosit sayısı arasında korelasyon bulunamamıştır [107]. Bu nedenle, follikül sıvısında yüksek IL-6

seviyesi OHSS oluşumuna işaret ettiği için, bu IVF sikluslarında taze embriyo transferi (ET) olmadan tüm embriyoların dondurulması tavsiye edilmektedir. Alternatif olarak, transfer edilen embriyoların sayısının diğer tüm IVF döngülerinde bir ile sınırlandırılması, çoklu gebeliklerin minimize edilmesinin yanı sıra OHSS riskini de asgariye indirebilir [12].

Revel ve diğerleri şiddetli OHSS'li kadınlarda periton sıvısındaki sitokin ve nitrit konsantrasyonlarını ölçmüşlerdir. OHSS hastalarının peritoneal sıvısındaki IL-6 (3523'e 30 pg/ml), TNF- α (14'e karşı 4.2 pg/ml) ve IL-8 (1695'e karşı 900 pg/ml) seviyeleri kontroller ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Serumda ise sadece IL-6 düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek olarak ölçülmüştür. Diğer yandan, OHSS hastalarının asitli sıvısındaki nitrit seviyelerinin de (0.5 vs 34 nmol/ml) anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir (375'e 11pg/ml) [108].

TNF-a, IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8'in her birinin, birleşik etkilerinin additif veya sinerjistik olabileceği öne sürülerek vasküler geçirgenlikte değişiklikleri uyardığı gösterilmiştir [12, 19, 109]. Başka bir çalışmada ise over karsinoması olan hastaların asitli sıvısında IL-1, TNF- α ve IL-6 düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir [110]. Bir diğer çalışmada ise; IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyeleri, OHSS hastalarının peritoneal sıvısında, kontrollere kıyasla anlamlı olarak artarken, IL-1 seviyelerinde bu derecede bir artış görülmemiştir [108].

Endotel hücreleri, makrofajlar, lenfositler, epitel hücreleri ve fibroblastlar dâhil birçok hücre tarafından üretilen her yerde bulunan sitokin olan IL-6, IL-1 ve TNF- α gibi şok tetikleyici sitokinler tarafından indüklenir. IL-6 çok sayıda etkisi yanında anjiyogenez ve hiperpermeabiliteyi ilgilendiren etkilere sahiptir. Çeşitli çalışmalar, OHSS hastaların asit sıvısında ve serumunda IL-6 seviyelerinde artış olduğunu doğrulamıştır [12, 107, 111, 112]

2.4.5. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ailesi ilk kez 1980 keşfedilmiş olup, ilk bulunduğu zamanlarda tek bir üyeden meydana geldiği düşünülse de, sonraki araştırmalar bunun birçok üyesi olan bir aile olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu aile VEGF-A (Human-VEGF olarak da isimlendirilmektedir), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, Plasental büyüme faktörü (PlGF) ve yılan zehri VEGF'ü (svVEGF, VEGF-F) olarak isimlendirilen yedi üyeden

oluşur. Ayrıca kaynaklarda VEGF olarak isimlendirilen büyüme faktörü gerçekte Human-VEGF'nin ya da diğer adıyla VEGF-A'yı işaret etmektedir [113, 114]. İlk sırada VEGF-A olmak üzere ailenin tüm üyeleri; vücutta meydana gelen birçok fizyolojik (vaskülogenez, anjiyogenez veya kemotaksi gibi) ve patolojik süreçte (kanser, neovasküler hastalıklar veya kronik inflamatuvar hastalıklar gibi) görev yapmaları nedeniyle son yıllarda oldukça popüler hale gelmişlerdir [115, 116].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve vasküler geçirgenlik faktörü (VPF)

VEGF, 46kDa ağırlığında, homodimerik, heparine bağlı glikoprotein yapısında bir moleküldür [117]. Vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak da bilinen VEGF, başlangıçta endotel hücrelerine özgü bir mitojen olarak tanımlanmıştır [118]. VPF ise tümörle ilişkili kan damarlarından proteinlerin ekstravazasyonunu destekleme işlevi gören bir protein olarak bulunmuştur [119]. Daha sonra VPF ve VEGF'nin tek bir VEGF geni tarafından kodlandığı anlaşılmıştır [100].

VEGF, tümör hücreleri, makrofajlar, trombositler, keratinositler ve böbrek mesangial hücreleri dâhil olmak üzere birçok hücre tipi tarafından üretilmektedir. VEGF'nin aktiviteleri vasküler sistemle sınırlı değildir; VEGF, kemik oluşumu, hematopoez, yara iyileşmesi ve gelişim gibi normal fizyolojik işlevlerde de rol oynar [120].

VEGF reseptörleri

Bu büyüme faktörü ailesinin biyolojik etkilerini gösterebilmesi için kendisine özgü olan reseptörlerine bağlanabilmesi gereklidir. Bu ligandlar, VEGF reseptörü 1 (VEGFR1), VEGFR2 ve VEGFR3 olarak bilinen üç ilişkili tip III reseptör tirozin kinazına (RTK) bağlanır. Her VEGF ligandı, bu VEGF reseptörlerinin her biri için kendine özgü bağlanma spesifikliğine ve affinitesine sahiptir. VEGFA, VEGFB ve PlGF, VEGFR-1'e bağlanır; VEGFA, VEGFR-2'ye bağlanır; VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-3'e bağlanır. VEGF-C ve VEGF-D'nin proteolitik işlenmesi, VEGFR-3'e kıyasla daha düşük afinite ile de olsa, VEGFR-2'ye bağlanmalarına izin verir [116, 121]. VEGF reseptörleri de diğer büyüme faktörlerinin transmembran özellikteki tirozin kinaz reseptörlerine benzer şekilde özgün ligandları ile bağlandığında dimerize olurlar ve sonrasında cevap oluşturmak için hücre içerisindeki

mekanizmaları harekete geçirirler. VEGF tarafından uyarılan bu reseptörler de sinyal iletimi sağlayacak olan diğer görevli proteinleri fosforile hale getirirler. Böylece ikincil haberciler oluşur ve mesajın hücre içerisinde taşınması sağlanır [116]. Heparan sülfat da VEGF'nin reseptörüne bağlanmasına yardımcı olarak önemli bir görev üstlenir ve bu olayın düzenlenmesine katılır [122].

VEGFR-1 (flt, fms benzeri tirozin kinaz reseptörü)

VEGF reseptör 1, Flt-1 veya fms benzeri tirozin kinaz-1 (ki burada fms, McDonough sarkom virüsünü ifade eder) olarak da isimlendirilmektedir [123]. VEGFR-1, VEGF için VEGFR-2'den daha yüksek afiniteye (yaklaşık 15 pM'ye karşı 750 pM) sahiptir. VEGFR1'in C-terminal kuyruğunda bulunan altı adet kalıntı, fosforilasyon bölgesi olarak tanımlanmıştır [123]. VEGFR-1 seçici olarak vasküler endotel hücreleri tarafından eksprese edilir (Kendall ve Thomas, 1993). Ayrıca, trofoblast hücrelerinde, monositlerde ve mezengial böbrek hücrelerinde de üretilmektedir [124].

VEGFR-2 (flk-1, kinaz ekli alan içeren reseptör VEGFR-2 (KDR))

VEGFR-2, Bruce ve diğerleri tarafından 1992'de tanımlanmış olup [125], Flk-1/KDR (Fetal Karaciğer Kinaz-1/Kinaz Ekli Alan İçeren Reseptör) olarak da adlandırılır [126]. VEGFR-2 insanlarda ana VEGF reseptörü [125] olmakla birlikte VEGF sinyalizasyonunda ana bir kavşaktır [127]. VEGF ile uyarılmış endotel hücre göçü, proliferasyonu, hayatta kalması ve artmış vasküler geçirgenliğin baskın aracısıdır [126].

Fareler ile gerçekleştirilen araştırmalarda VEGFR-2'nin üretiminde yokluk ve sorunların olması durumunda bu hayvanların hematopoietik prekürsör hücrelerinin, farklılaşmış endotel hücrelerinin olmadığı ve organize kan damarlarının gelişemediği ve in utero 8.8 ile 9.5 günler arasında ölümün gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda VEGFR-2 hem endotelial hem de hematopoietik prekürsör hücrelerin gelişiminde zorunlu olduğu aydınlatılmıştır [116]. Vasküler endotel hücrelerinde ve lenfatik endotel hücrelerinde bol miktarda eksprese edilmektedir [128]. VEGFR-2 ayrıca nöronal hücrelerde, megakaryositlerde, hematopoietik kök hücrelerde, retinal progenitör hücrelerde ve farklı kanser hücrelerinde ifade edilir [127].

VEGFR-2, VEGF'ye VEGFR-1'den daha düşük afiniteye sahip olmasına rağmen, VEGFR-2 ligandlarına yanıt olarak güçlü protein-tirozin kinaz aktivitesi sergilemektedir. VEGFR-2'nin altı tirozin kalıntısı, otofosforile edilir. Kalıntıların 1054 ve 1059'un VEGFR-2 aktivasyon döngüsü içindeki otofosforilasyonu, kinaz aktivitesinin artmasına neden olmaktadır [123]. VEGFR-2, VEGFA'nın normal fizyolojik etkilerinin yürütülmesinde aracılık görevi üstlenirken, bunun tersine VEGFR-1, bu fizyolojik süreçte yanıtıcı olarak görev yapar ya da sinyal yolağını baskılayarak negatif bir etkinin ortaya çıkmasına neden olur [116, 129].

VEGF geninin ifadenmesi

İnsan VEGF geni, 6p12 kromozomunda yerleşik ve sekiz ekzondan oluşmaktadır. VEGF geni, kemirgenlerde ve insanlarda aynı ekzon yapısını gösterir, aralarında %95 protein homolojisi vardır. İnsana benzer şekilde sıçan ovaryum hibridizasyon çalışmaları sonucunda, çoğunlukla LH dalgalanmasından sonra görülen önemli VEGF mRNA ifadenmesinin olduğu gösterilmiştir [93]. Moleküler biyoloji çalışmaları, OHSS gelişiminde önemli olan VEGF ve hCG arasında güçlü bir bağlantı olduğunu göstermektedir [100]. İlk olarak, hibridizasyon çalışmaları sıçan [130] ve primat [131] ovaryumundaki VEGF mRNA ifadenmesinin ağırlıklı olarak LH dalgalanmasından sonra olduğunu göstermiştir. Bu artış OHSS için de esastır. İkinci olarak, LH salgılanmasını baskılamak için GnRH antagonisti ile luteal faz uygulaması, (LH'ye bağlı olan) VEGF mRNA ifadesini azaltmıştır ki bu ifadenme LH'ye bağlıdır [100, 131].

VEGF üretiminin düzenlenmesi

VEGF üretimi hipoksi, sitokinler ve prostaglandinler ile yukarı yönlü olarak düzenlenir [118, 132]. Doğrudan anjiyogenezi uyarmayan sitokinler ve büyüme faktörleri, bazı hücre tiplerinde VEGF ekspresyonunu etkileyerek anjiyogenezi düzenleyebilir. Başka bir deyişle, sitokinler dolaylı bir anjiyogenik veya anti-anjiyogenik etkiye sahip olabilmektedir [100, 133]. VEGF üretimini kuvvetlendiren büyüme faktörleri arasında transforme büyüme faktörü b, fibroblast büyüme faktörü-4, trombosit (platelet) kaynaklı büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü-1, IL-1b ve IL-6 bulunmaktadır [33, 100, 133]. VEGF üretimi, trombospodin, hiperoksi ve interlökin-10 ile de azalır [100].

Fizyolojik ve patolojik durumlarda VEGF'nin rolü

In vivo olarak VEGF, damar geçirgenliğinde çok büyük bir rol oynamaktadır. Ayrıca, gelişmekte olan embriyoda ve endometrial siklus ve foliküllerin luteinizasyonu gibi yoğun şekilde anjiyogenez geçiren yetişkin dokusunda anjiyogenezin başlatılması ve gelişiminde önemli bir yer tutmaktadır [134]. Fizyolojik rolüne ek olarak, VEGF, tümör vaskülarizasyonunun gelişiminde ve romatoid artrit gibi durumlarda görülen aşırı neovaskülarizasyonda kritik bir anjiyojenik faktör olarak gösterilmiştir [100]. Ayrıca, endometriozisli kadınların periton sıvısında bu faktörün seviyeleri, normal kontrollerle karşılaştırıldığında artış göstermektedir [100].

Üreme fonksiyonunda ve ovaryan kist oluşumunda VEGF'nin rolü

Dişi üreme sistemi de ileri düzeyde fizyolojik anjiyogenez sergilemektedir. Ovaryum ve uterusda gerçekleşen anjiyogenez, östrojen/menstrual döngüsünün sürdürülmesi ve düzenlenmesi ve gebeliğin oluşması ve devamı için gereklidir [100, 135]. VEGF ayrıca vasküler geçirgenliği arttırma kabiliyeti, ovaryum kistlerinde sıvı oluşumu ve tuba uterina tüpündeki akıntı oluşumunda önemli bir faktör olabilmektedir [100, 136, 137]. Yapılan araştırmalar sonucunda, üreme dönemi boyunca VEGF'nin, anjiyogeneze aracılık ederek ovaryum folliküllerinin ve korpus luteumun büyümesinde ve korunmasında önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır [135, 136]. Ek olarak araştırma sırasında fallop tüpü lümen epiteli içindeki VEGF, vasküler geçirgenliği arttırmış ve tubal lümen salgılarını modüle etmiştir [136]. Benzer şekilde, iyi huylu over neoplazmlarının epitelinde var olan VEGF, over kistlerinde sıvı oluşumuna katkıda bulunabilmektedir [100].

VEGF ve OHSS arasındaki bağlantı

VEGF'nin OHSS'deki rolü kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir [25, 132]. Albert ve diğerleri VEGF'nin OHSS gelişiminde potansiyel bir aracı olarak rolünü doğrulayan üç önemli neden ileri sürmüştür [28]. İlk olarak, VEGF ve izoformları vazoaktif özelliklere sahiptir [106, 119]; ikinci olarak, VEGF folliküler sıvıda tanımlanmıştır ve üçüncü olarak, mRNA transkriptleri ve proteinleri granülosa-luteal hücrelerinde tespit edilmiştir [136].

Bunlara ek olarak da VEGF, kontrol hastalarına kıyasla OHSS gelişen kadınların serum ve periton sıvısında artmıştır [30, 100].

2.4.6. OHSS risk faktörleri

Teorik olarak, OHSS gonadotropinlerin kullanıldığı kontrollü ovaryan hiperstimülasyon uygulanan herhangi bir hastada gelişebilmektedir. Fakat bazı kadınlar çok daha yüksek risk altındadır. Bu risk grubundaki kadınların belirlenmesi, klinik uygulamada OHSS'yi azaltmak ve hatta ortadan kaldırmak için çok önemlidir [93]. Araştırmalar sonucu bazı faktörler OHSS gelişiminde risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Yaş, düşük vücut ağırlığı, PCOS gibi olgular KOH'tan önce başlangıçta risk olarak değerlendirilen primer risk faktörleridir. Ovulasyon indüksiyonu esnasında meydana gelen yüksek miktarda eksojen gonadotropin, hızlı artan östradiol seviyesi, daha önce OHSS geçirme gibi durumlar ise sekonder risk faktörleri olarak adlandırılmıştır [93, 98].

Çizelge 2.4. OHSS risk faktörleri [93]

OHSS Risk Faktörleri (Pellicer 2019)
KOH dan Önce
– Öncesinden OHSS geçirme
– PKOS veya PKOS benzeri ovaryum yapısı
– Siyah Irk
– Genç Yaş <35 yaş
–Antral follikül sayısı > 2mm ≥ 24
–Serum AMH> 3,4 ng/ml
KOH Sırasında
- 19 Follikül gelişimi
- Serum E ₂ >3500 pg/ml
OPU dan Sonra
- 15'ten fazla oosit alımı yapılması

2.4.7. OHSS'nin önlenmesi

Teoride, gonadotropinler verilerek KOH uygulanan herhangi bir hastada OHSS gelişebilmektedir [93]. OHSS'yi tamamen ortadan kaldırmak mümkün olmamakla birlikte, risk faktörlerinin erken tanımlanması ve KOH'a giren kadınların dikkatli klinik yönetimi ile insidansta önemli düşüşler sağlanabilir [7]. OHSS için alınan önlemler primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olarak kategorize edilebilir. Birincil önleme stratejileri, stimülasyon

protokolünü over yanıtı için bir hastanın bireysel risk faktörlerine yönelik kişiselleştirmeye odaklanır. İkincil önleme stratejileri ise, OU'ya (ovarian uyarımı) aşırı yanıtı olan hastalarda OHSS'yi önlemek için kullanılır [7].

2.4.8. OHSS'nin tedavisi

OHSS'in en iyi tedavisi OHSS'den kaçınılmasıdır. Her ne kadar spontan gebelikte OHSS nadiren görünse de OHSS'nin büyük çoğunluğu in vivo veya in vitro fertilizasyon için ovulasyon indüksiyonundan veya KOH'dan sonra gerçekleşir [12]. OHSS'nin klinik yönetimi için tedavi yaklaşımı, hastalığın ciddiyeti ve ilerlemesine bağlı olarak çok yönlüdür ve buna göre bireyselleştirilmiştir. OHSS tanısı konulduktan sonra hastalığın şiddeti saptanmalıdır. Ayakta tedavi, daha hafif OHSS formları olan kadınlar için önerilmektedir [7]. Ayakta tedavi unsurları arasında günlük sıvı dengesi, günlük ağırlık, karın çevresindeki artışın değerlendirilmesi, kan testleri ile her 48-72 saatte bir ultrason muayenesi ve değerlerde herhangi bir bozulma belirtisinde kliniğe başvurma uyarısı yer almaktadır. [7]. OHSS'ye bağlı hastaneye yatış ölçütleri hematokriti yüzde 45'ten yüksek olması ve/veya herhangi bir pulmoner veya hemodinamik belirtisidir. OHSS'de yatan hasta tedavisi sıvı yönetimi ve eğer hipo-albüminemi belirtilirse (>28 mg/dl) albümin uygulaması ile diürezis bakımı; antikoagülan ilaçların belgelendirilmiş bir trombofili, pıhtılaşmanın artması veya tromboembolizm öyküsü veya 48 saatlik olağan intravenöz tedaviden sonra düzeltilmemiş hemokonsantrasyonu olan hastalarda uygulanmasını ve kuldosentez/parasentez'i içerir [7]. Klinik tablo hızla değişebileceğinden hastanede yatan hastalar sık sık kontrol edilmelidir. Kritik OHSS geliştiği zaman, hasta yoğun bakıma kabul edilmelidir. Sadece çok kritik durumlarda erken gebeliğin kesilmesi düşünülmelidir [7]. Kabergolin verilmesi (8 gün boyunca günde 0,5 mg) [138] ve bir GnRH antagonisti ile kabergolin (7 gün boyunca oral 0,5 mg artı 2 gün boyunca günde 250 mcg ganirelix) VEGF'nin ve daha sonra OHSS'nin etkilerini azaltmak için tavsiye edilmiştir [139].

OHSS'ye özgü bir tedavi mevcut değildir [34]. OHSS'nin en aza indirilmesi ve tedavisi için birçok etkili ajan getirilmiş olmasına rağmen, tamamen ortadan kaldırılamamıştır. OHSS'in en iyi tedavisi hiç oluşmamasını sağlamaktır [12]. Tedaviler, oosit olgunlaşmasını tetiklemek için hCG kullanımından kaçınılması, embriyo transferinin ertelenmesi ve

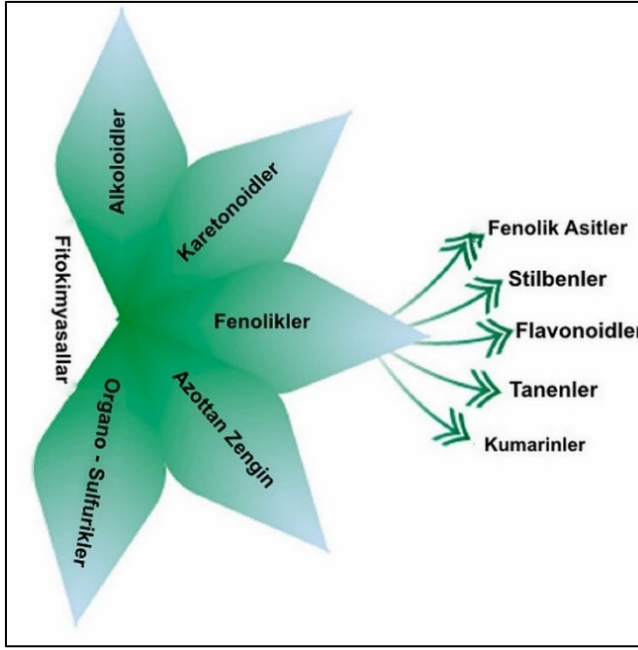
hastanın durumunun sıkıca izlenmesinden ibarettir [7, 34, 35]. Özetle, OHSS tedavisinin temel dayanağı destekleyici tedavilerdir [13].

Son yirmi yılda, ovulasyon ve folliküler aspirasyondan önce GnRH agonistlerinin (GnRHa) insan koryonik gonadotropininin (hCG) yerine kullanılması, son folliküler olgunlaşmanın tetiklenmesi sırasında gelişen OHSS'nin insidansını ve ciddiyetini önemli ölçüde azaltmıştır [7, 35, 140]. Fakat OHSS, GnRHa kullanan çok yüksek riskli bireylerde yine de ortaya çıkabilmektedir [140]. Ayrıca, OHSS gelişimini önlemek için geliştirilen KOH uygulamasındaki hem öncesinde hem de sonrasındaki tüm modifikasyonlara rağmen, yine OHSS gelişimi engellenememektedir [12]. Bunlara ek olarak, KOH da ortaya çıkan OHSS olgularının raporlanma oranı hala oldukça düşüktür [6, 7]. Durumun arkasındaki patofizyolojiyi aydınlatmak ve böylece kalıcı bir tedavi için daha fazla araştırma gereklidir [13]. OHSS'nin sıçan modelleri, faydalı girişimsel yöntemler geliştirmek için değerli olabilir [34]. 21. yüzyıldaki en büyük modern tıp çalışmalarından biri gerçekten herhangi bir OHSS komplikasyonu olmadan infertilite kliniği oluşturmaktır [12].

2.5. Kersetin

2.5.1. Fitokimyasalların sınıflandırılması

Günümüzde, bitki ekstraktları, kadınlardaki üreme bozukluklarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fitokimyasallar, birçok hastalık riskini azaltma yeteneğine sahip, bitkilerde yaygın bir şekilde bulunan, besleyici olmayan (besin-dışı) biyoaktif bileşiklerdir. 50.000'den fazla bilinen farklı fitokimyasal tanımlanmıştır. Belirgin bir şekilde, fenolikler bir veya daha fazla aromatik benzen halkasına sahiptir ve mono veya polihidroksile edilebilir. Ayrıca fenolikler, insan beslenmesinde en bol bulunan antioksidanlar olarak kabul edilir [141].

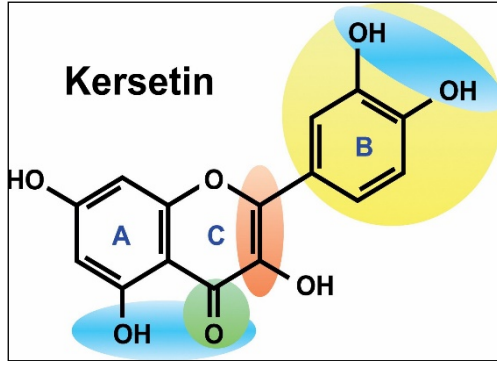


Şekil 2.2. Fitokimyasalların sınıflandırılması [141]

Fenolikler; fenolik asitleri, stilbenleri, tanenleri ve kumarinleri içeren flavonoid olmayanlar ve flavonoidler olarak iki kategoride sınıflandırılır [141]. Flavonoidler, geniş farmakolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi çeken bitki kökenli bileşiklerdir [38]. Bununla birlikte, flavonoidler de yapısal farklılıklarına göre flavonlar (apigenin), flavononlar (eriodictyol, narengenin), flavonoller (Kersetin, kaempferol), antosiyaninler (malvidin) ve izoflavonoid (genistein) olarak altı sınıfa ayrılırlar [142]. Flavonoidler, çiçeğin renginden ve aromasından sorumlu sekonder bitki metabolitleridir ve antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antialerjik ve antienflamatuar özelliklere sahiptirler [141].

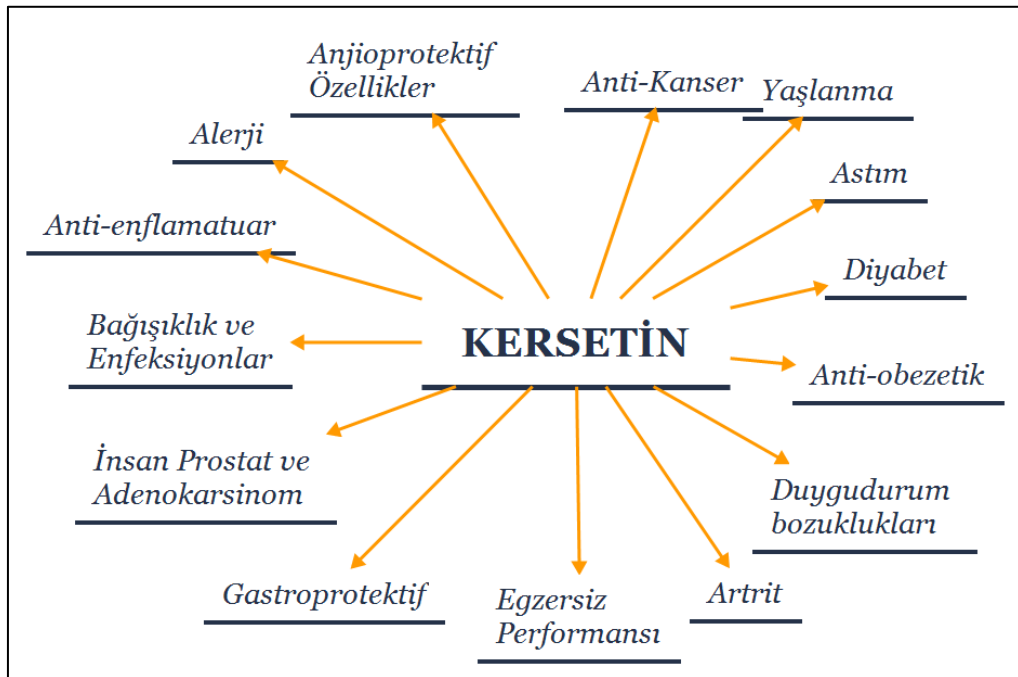
2.5.2. Kersetinin moleküler yapısı ve genel özellikleri

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksi flavonları), *Sophora japonica* L., *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel ve *Crataegus pinnatifida bunge* gibi bitkilerin çiçeklerinde, yapraklarında ve meyvelerinde yaygın olarak bulunan bir flavonoid bileşiğidir ve çeşitli biyolojik aktiviteye ve yüksek tıbbi değere sahiptir [143]. Ayrıca, kersetin fitoöstrojen olarak bilinen bir dizi bitki kökenli steroidal olmayan bileşik grubunun da bir üyesidir [40]. İnsanlar tarafından Kersetin tüketimi günde 11 ila 21 mg arasında değişirken, bazen bu tüketim önerilen miktardan daha azdır [144, 145].



Şekil 2.3. Kersetinin moleküler formülü [146]

Kersetin, antioksidan potansiyele [42], kardiyovasküler koruma etkisine, anti-inflamatuar, antikanser aktiviteye [43-45], anti-diyabetik [46] etkilere ve menapoz sonrası kadınlarda kemik kaybının tekrardan kazanılmasını sağlayan etkilere sahiptir [47]. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonundan [48], lipid peroksidasyonundan [49] korur ve hücrelerde redoks dengesizliklerini önler [50]. Bunlarla birlikte, Uluslararası WHO Kanser Araştırma Ajansı'na göre Kersetin, insanlar için kanserojenik olan kategoride (Grup 3) sınıflandırılmaz [147]. Ayrıca, Kersetinin klinik çalışmaları yapılarak popülasyon üzerinde hiçbir toksisitesi veya yan etkisi gözlenmediği bildirilmiştir [148]. Kersetin temel olarak deglikozilasyondan sonra emilir [149].



Şekil 2.4. Kersetinin özellikleri [150]

2.5.3. Kersetinin antioksidan özellikleri

Kersetin, serbest radikalleri temizleme ve geçiş metali iyonlarını bağlama yeteneğinden ötürü güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir [151]. Sahip olduğu bu antioksidan kapasitesi temel olarak Kersetin molekülü içindeki serbest radikal süpürme işlemi için en uygun konfigürasyona sahip olan iki antioksidan farmakoforu'na bağlıdır. Bunlar, A halkasının 3. pozisyonundaki hidroksil (OH) grubu ve B halkasındaki katekol grubudur (Şekil 2.3) [152]. Bazı araştırma ekipleri tarafından kabul edildiği gibi, flavonoid ailesi içinde Kersetin, O_2^- [153] ve $ONOO^-$ [154] dâhil olmak üzere ROS'un en güçlü temizleyicisidir [150]. Bu özellikler kersetini, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi vücutta zararlı etkiler oluşturabilen lipid peroksidasyonu için iyi bir inhibitör yapmaktadır [42]. Böylece Kersetin gibi antioksidanlar oluşan radikallerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu sonlandırılabilirler [150]. Ek olarak, Kersetin, sadece lipid peroksidasyonunun ilerlemesini durdurmaz, aynı zamanda serbest radikal oluşumunun önlenmesinde katkıda bulunan glutatyon seviyelerini de artırır [155]. Kersetin, GSH, SOD, CAT, GSH-PX ve Glutatyon redüktaz aktivitelerini artırarak serbest radikal üretimi üzerinde güçlü bir temizleme etkisine sahiptir [51]. Kersetin ilginç bir şekilde, Ca^{2+} bağımlı hücre ölümünü önleyerek, oksidatif stresden etkilenen hücreleri koruyabilmektedir [42]. Begum ve Terao, kersetin aglikonun ve konjugat metabolitlerinin (kersetin-3-O- β -glukuronid ve kersetin-3-O- β -glükositin), eritrositlerin sigaranın neden olduğu zararlardan koruyabileceğini ortaya çıkarmışlardır [150, 156]. Ayrıca, 40 sporcunun olduğu bir çalışmada bildirildiği üzere, Kersetin, egzersizin neden olduğu oksidatif stresin artmasını engelleyebilmektedir [157]. Sıçanlarda sodyum florür (NaF) kaynaklı oksidatif stres hasarına karşı yapılan ön tedavi sonrasında Kersetin karaciğer ve böbrek hasarını önleyerek oksidatif durumun önemli ölçüde toparlanmasını sağlamıştır [150]. Benzer bir çalışmada, NaF intoksikasyonunda kersetinin kardiyoprotektif özellikleri incelenmiştir. NaF uygulaması kalbin proksidan-antioksidan statüsü ile ilgili tüm endeksleri önemli ölçüde değiştirmesine rağmen Kersetin ön tedavisinin, bu değişiklikleri önlediği bulunmuştur [150]. Kersetin gibi flavonoidler için tanınan bu antioksidan aktivite, genellikle diyabet, koroner kalp hastalığı ve inme gibi kronik hastalıklara bağlı oksidatif stres riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir [158]. Victor ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, Kersetin uygulamasının, antioksidan ve anti-apoptotik etkileriyle Wistar sıçanlarının uterus ve

ovaryum dokularında kadmiyum klorür (CdCl_2) kaynaklı toksisite üzerinde önleyici etkileri bulunduğu gösterilmiştir [52].

Bunlara ek olarak; Kersetin hem plaketlet agregasyonu hem de adezyonunun inhibisyonunu sağlarken vasküler endotel hücrelerini H_2O_2 hasarından sahip olduğu antioksidan özellikleri yolu ile korur [54]. Yakın zamanda kersetinin'in antioksidan enzimler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için yapılan bir başka çalışmada ise, kersetin'in PCOS sıçan modelinde SOD, CAT ve GPX'in aktivitesini anlamlı şekilde arttırdığı ve ayrıca Letrozolün over morfolojisi üzerindeki etkilerini tersine çevirdiği ortaya koyulmuştur [53]. Ayrıca, Kersetin serbest radikalleri temizleyerek, inflamasyonu da azaltabilir [150].

2.5.4. Kersetinin anti-inflamatuvar etkileri

Günümüzde, Kersetinin, genellikle inflamasyon ile uyarılan in vitro enzimler olan siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) üretimini inhibe ettiği bilinmektedir [46, 150]; bununla birlikte, in vivo deneyler de bu anti-inflamatuvar etkiyi kanıtlamaktadır. Ayrıca kersetinin, Graves orbitopatisinden kültüre edilen fibroblastlarda proinflamatuvar sitokinleri önemli ölçüde inhibe ettiği aydınlatılmıştır [150, 159]. Kersetin içeren *Rhodomyrtus tomentozanın* özütleri ile tedavi sonucunda, LPS uygulanmış RAW 264.7 hücrelerinde ve periton makrofajlarında bu tedavinin NO ve prostaglandin E2 salınımını etkili bir şekilde azalttığı ortaya çıkarılmıştır [160, 161].

Flavonoidlerin, sitokin sekresyonu üzerindeki etkisine ilişkin olarak yapılan başka bir araştırmada ise, 50 ve 100 nM dozda kullanılan Kersetinin, LPS ile uyarılmış RAW 264.7 makrofajlarında IL-6 ve TNF-alfa sekresyon seviyelerini azalttığı görülmüştür [162]. Ayrıca, kersetinin (10-25 μM dozda), LPS ile uyarılmış BV-2 mikroglia hücrelerinde NO ile TNF- α üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiği de belirlenmiştir [60]. Başka bir araştırmada ise okratoksinle uyarılmış HepG2 (insan hepatomu) hücrelerinde Kersetinin (10 μM dozda), aşağı doğru düzenlenmiş COX-2 ve NF- κB ekspresyonunu ve NO üretimini azalttığı rapor edilmiştir [61].

Kersetin (25 μ M) LPS ile inkübe edilmiş insan kanında IL-1 β , IL-6, IFN- γ ve TNF- α üretimini etkili bir şekilde inhibe etmiştir [163]. Bununla birlikte insan deneklere verilen altı haftalık Kersetin takviyesi (150 mg) sitokin TNF- α 'nın serum konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır [164]. Flavonoid olan kersetin'in sitokin ekspresyonu üzerindeki etkisine ilişkin olarak, 100–200 mg/kg dozlarında, sıçan hipertrigliseridemisi ile ilişkili akut pankreatit modelinde pankreas histopatolojik hasarını azalttığı ve NF- κ B, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nin mRNA'sını ve protein ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir [165]. Bunlara ek olarak kersetin'in (100 μ M), sıçan aort endotel hücrelerinde yüksek glukoz kaynaklı NF- κ B ve AP-1 aktivitesini sırasıyla %43 ve %69 azalttığı rapor edilmiştir [166].

Ayrıca Kersetin anti-enflamatuar sitokin olan IL-10'un ekspresyonu üzerine uyarıcı etkiler yapabilmektedir [150]. Bu yöndeki bir çalışmada febril konvülsiyon (Hipertermik nöbet) oluşturulan sıçanların hipokampusünde Kersetin (10 mg/kg) ile tedavi edilen ile edilmeyen gruplar karşılaştırıldığında IL-10 konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir [167].

Çizelge 2.5. Kersetinin etkilediği moleküler mekanizmalar

Kersetinin Etkilediği Moleküler Mekanizmalar [62]

↓VEGFR2 fosforilasyonu; ↓VEGFR2 mRNA ifadenmesi; ↓ERK sinyal yolağı; AKT/mTOR/P70S6K sinyal yollarının modülasyonu; ↓MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları; ↓COX-2 ifadenmesi; ↓MMP-2 ve MMP-9 salgılanması

2.5.5. Kersetinin anti-anjiyojenik, anti-tümör etkileri

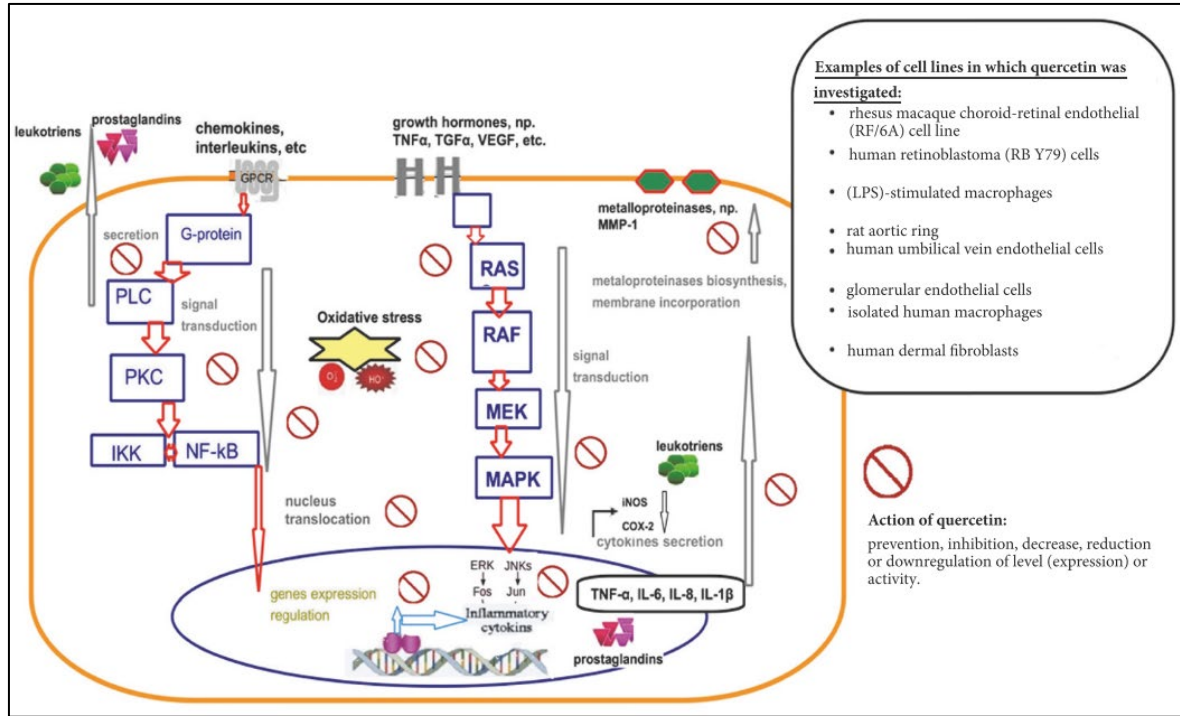
Son zamanlarda, Kersetin pro-anjiyojenik ve antianjiyojenik etkileri nedeniyle ilgi çekmektedir [168]. Bazı çalışmalar, kersetin'in hem in vivo hem de in vitro tümör, koroid ve retinal anjiyojenez üzerindeki anti-anjiyojenik etkilerini ortaya koymaktadır [62-65, 168]. OHSS patofizyolojisinde de çok önemli olan anjiyojenez, yeni kapiller yapıların büyümesini ifade eder ve bu sürece büyüme faktörleri, adezyon molekülleri, endostatin gibi moleküller aracılık etmektedir. Fizyolojik anjiyojenez, üreme gelişimi ve hasar onarımı ile ilişkilidir [148].

Pratheeshkumar ve diğerkleri Kersetinin anti-anjiojenik aktivitesini farklı modeller kullanarak incelemişlerdir. Kersetin'in, anjiyogeneze, endotel hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve tüp oluşumu dâhil olmak üzere birkaç önemli adımı engellediğini göstermişlerdir. Bu etkilere VEGF'nin neden olduğu VEGFR2 fosforilasyonunun baskılanmasının yanı sıra aşağı-akım kinazlarının AKT, mTOR ve ribozomal protein S6 kinazının HUVEC'lerde fosforilasyonunun inhibisyonunun da eşlik ettiğini bildirilmiştir [63]. Daha sonraki araştırmalarda; Kersetin'in, HUVEC de VEGFR2 mRNA ekspresyonunu inhibe ettiğini ve hem HUVEC'lerde hem de zebra balığı embriyolarında ERK'nin fosforilasyonunu azalttığını bulunmuştur [64].

Son zamanlarda, bu flavonoidin bir endotel hücre hattında VEGF'nin indüklediği anjiyogeneze engel olduğu bildirilmiştir. Mikromolar düzeyde hücre oluşumunu, göçü ve tüp oluşumunu inhibe ettiğini de ortaya konulmuştur. Bunlara ek olarak, Kersetin hem p38MAPK hem de ERK 1/2 'in fosforilasyonunu da inhibe etmiştir. Araştırma sonucunda, kersetinin antianjiyogenik aktivitesini VEGFR-2 aracılı aşağı akış sinyalizasyonunun modülasyonu yoluyla gerçekleştirmiş olabileceği ileri sürülmüştür [65].

Literatür, Kersetinin çeşitli kanser hücre hatlarının (insan ovaryum kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, insan kolon kanseri, vb.) ve çeşitli ksenograft kanser modellerinde kanser büyümesini [148] ve proliferasyonunu inhibe edebileceğini göstermektedir [148, 169, 170]. Bu çalışmalarda tümörlü hayvan modellerinde hayatta kalma oranı önemli ölçüde artmış ve tedavi sonunda tümör hacmi önemli ölçüde azalmıştır. Kersetin'in ksenograft hayvan modelleri üzerindeki inhibitör etkisi, apoptozun desteklenmesinde, proliferasyonun, anjiyogenezin ve metastazın inhibisyonunda kendini göstermektedir [148]. Bununla birlikte; Kersetin, kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncini azaltabilir ve ilaçların antitümör etkilerini artırabilir [170]. Meme kanseri ve lösemi hücre ksenograft modelleri kullanılan araştırmalar sonrasında, farklı dozlarda kersetin'in, Akt/mTOR yolunu inhibe ederek apoptozu ve hücre döngüsünü uyarabildiği bildirilmiştir. [66, 171, 172]. Diğer bir çalışmada, kersetin'in, AKT sinyalini düzenleyerek lenfomalı farelerde anjiyogenezi inhibe edebildiğini ortaya koymuştur [66].

Trombospondin-1 (TSP-1), tümör büyümesini inhibe edebilen ve OHSS patogeneğinde yeni araştırma konularından biri olan [173] daha önce keşfedilmiş bir anti-anjiyojenik faktördür [174]. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, kersetin'in, TSP-1 ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek prostat kanseri fare modelinde tümör büyümesini inhibe edebildiği bulunmuştur [174]. Zhao ve diğerleri, meme kanseri BALB/c fare modelinde, 34 mg/kg kersetin uygulanması sonucunda, kalsinörin/NFAT yolağının inhibe edilerek anjiyogenezin önlenildiğini bulmuşlardır [175]. Ayrıca, in vivo deneyler ile kersetin'in tümör metastazı üzerindeki önleyici etkisi de doğrulanmıştır. Kolorektal akciğer metastazı, 50 mg/kg Kersetin ile yapılan tedaviden sonra anlamlı derecede azalmıştır [148]. Kersetin uygulaması ayrıca EGFR sinyal yolunu düzenleyerek VEGF ekspresyonunu baskılamış ve sonucunda EMT'yi inhibe etmiştir [148, 176]. Kersetinin allojenik tümör büyümesi üzerindeki engelleyici etkisi, akciğer kanseri, pankreas kanseri, vb. tümör hücresi modellerinde de bulunmuştur [148].



Şekil 2.5. Kersetinin moleküler mekanizmaları [177]

2.5.6. Kersetinin ovaryuma etkileri

Kersetin, hücre steroidojenik aktivitesini düzenler ve hormonal indekslerin düzenlenmesine yardımcı olup bu sayede ovaryumun işlevlerini de düzenler [55]. Naseer ve diğerleri, ısı stresi yaratılan tavşanlarda, Kersetin takviyesinin folliküler gelişimi önemli ölçüde iyileştirdiği, granüloza hücrelerindeki apoptozu en aza indirdiğini göstermişlerdir [56]. Bazı in vitro çalışmalarda kersetin'in over hücreleri üzerindeki olası rolü de araştırılmıştır. Kersetin'in domuz veya tavuk ovaryum folliküllerinden elde edilen kültüre granüloza hücrelerinde, T-2 toksinine veya kadmiyuma bağlı oksidatif hasarı ve apoptozu önlediğini bildirilmiştir [57, 58]. Ayrıca, Chen ve diğerleri, Kersetin'in yaşlanan sıçanlarda ovaryumun folliküler rezervini etkileyerek olumlu etkiler oluşturduğunu öne sürmüşlerdir [59].

Kersetin'in yukarıdaki etkileri ile OHSS'nin temel patofizyolojik mekanizmalarındaki hem inhibisyon hem de regülasyon özelliklerinden dolayı henüz özgün bir tedavisi olmayan bu sendromun hem önlenmesi hem de tedavisi için potansiyel taşımaktadır. Ayrıca literatür araştırmaları sonucunda OHSS sıçan deney modelinde Kersetinin kullanıldığı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Literatür bulgular ışığı altında, önerilen bu çalışmada, ovaryan hiperstimülasyon sendromu modeli oluşturulan ratlarda Kersetinin OHSS üzerine ve ilişkili olduğu VEGF/VEGFR-2, IL-6 üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tezin bu bölümde ilk olarak tez araştırılmasında kullanılan bütün laboratuvar araç ve gereçleri ile deney sırasında kullanılan sarf malzemeleri ve bunların marka, üretildiği ülke bilgileri verildi. Bundan sonraki bölümde OHSS sıçan deney modelinin nasıl yapıldığı, deney planı ve ardından deney sonunda hangi işlemlerin yapıldığı ayrıntıları ile açıklandı. Bir sonraki bölümde araştırmada gerçekleştirilen deney yöntemleri uygulanan protokolleri ile yazıldı. Bu bölümün ardından deneyler sonucunda elde edilen ovaryum dokularının histo-morfolojik olarak nasıl değerlendirildiği anlatıldı. Son bölümde ise tüm deneyler ve analizler sonucunda elde edilen sonuçların istatistiksel olarak nasıl değerlendirildiği açıklanarak gereç ve yöntem bölümü sonlandırılmıştır.

3.1. Kullanılan Makine, Teçhizatlar ve Sarf malzemeleri

3.1.1. Makine ve teçhizatlar

Çizelge 3.1. Kullanılan makine ve teçhizatların listesi

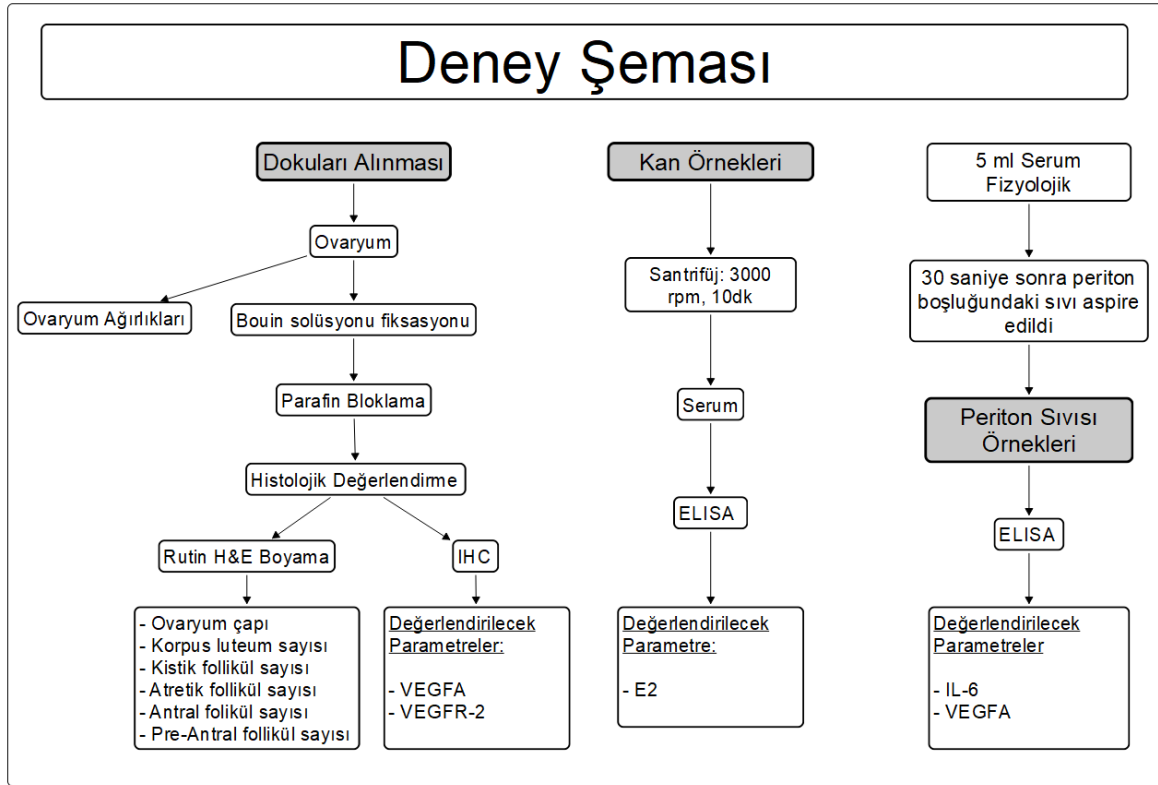
Makine ve Teçhizat İsimleri	Marka, Model ve Üretildiği Ülke
Otomatik doku takip cihazı	Leica TP 1020, Almanya
Parafin Gömme (Blokla) Cihazı	Leica EG 1120, Almanya
Mikrotom	Leica SM 2000, Almanya
Bilgisayar destekli görüntüleme cihazı	Leica DM 4000B, Almanya
Mikroskop yazılımı	LEICA LAS V4 4.9, Almanya
Mikroplaka okuyucu	PowerWave XS, Biotek, ABD
Soğutmalı santrifüj	Rotina 420R, Hettich, Almanya
-80°C ve -20°C derin dondurucu	Sanyo, Japonya
Soğutmalı mikrosantrifüj	Micro 200R, Hettich, Almanya
ETÜV	İsolob, Almanya
Combi-spin vortex	İsolab, Almanya

3.1.2. Kullanılan kit, kimyasal ve sarf malzemeleri

Çizelge 3.2. Kullanılan sarf malzemeleri

Sarf Malzeme	Marka, Lot ve Üretildiği Ülke
PMSG	Oviser 500 (8Y02-1, 8S02-1), Hipra, İspanya
hCG Choriomon 5000 I.U.	IBSA, İsviçre
Kersetin	Sigma Aldrich, ABD
VEGF-A Polyclonal Antibody 100µl	Bioss-USA
VEGF-R2 Polyclonal Antibody 100µl	Bioss-USA
UltraVision Polyvalent (Rabbit-Mouse)	LabVision TP-060-HL
Hydrogen Peroxide Block	Thermo scientific, TA-125-HP
UltraV Block	Thermo scientific, TA-060-UB
Streptavidin Peroksidaz	Thermo scientific, TS-060-HR
Diaminobenzedin (DAB)	Thermo scientific, TS-125-HDS
Tween 80	Sigma-Aldrich, ABD
DMSO	Sigma Aldrich, ABD
Rat E2 ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory, Çin
Rat VEGFA ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory, Çin
Rat IL-6 ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory, Çin
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, ABD
Pikrik Asit	İsolab, Almanya
PBS -Fosfat tamponlu su, Ph 7.4	Besolab, BS-161
Asetik Asit	Sigma-Aldrich, ABD
Teksoll 96 % Extra pure	Tekkim, TK.930131.02500
Ksilen (İzomerleri Karışımı) Extra pure	Tekkim, TK.090270.02500
Formaldehit	Tekkim, TK.060161.05001

3.2. OHSS Sıçan Modelinin Planı, Yapılışı ve Örneklerin Toplanması



Şekil 3.1. Deney şeması

3.2.1. OHSS deney planı

Tamamlanan çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan G.Ü.ET-19.017 karar nolu etik kurul onayı alınarak yapılmıştır. Çalışmada, 22 günlük, 28 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar kullanılarak OHSS modeli oluşturulmuştur [22, 178, 179]. Bu yaş aralığının tercih edilme nedeni, erişkin olmayan sıçanların ovaryumları çoğunlukla olgunlaşmanın farklı evrelerinde folliküllerden ve ovaryumun destek hücreleri olan interstisyel hücrelerden oluşur. İnterstisyel hücreler luteinizasyona neden olan hücrelerdir ve bir miktar östrojen salgılayarak FSH'nin etkinliğine yardımcı olur. Hayvanlar 12 saat gece/gündüz periyodunda, 21-24 °C ve %45-55 nem özelliği olan hayvan barınma yerlerinde, standart sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenmişlerdir. Sıçanlarda OHSS modelinin oluşturulması ve deneklerin izlenmesi Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesinde yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen sıçanlar aşağıda belirtildiği gibi rastgele 4 gruba ayrılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.3. OHSS sıçan modeli deney planı

	1. gün (22)	2. gün (23)	3. gün (24)	4. gün (25)	5. gün (26)	6. gün (27)	7.gün (28)
Grup 1: Kontrol	DMSO- Tween 80- Saline (0.5:1:8.5)	DMSO- Tween 80- Saline (0.5:1:8.5)	DMSO- Tween 80- Saline (0.5:1:8.5)	DMSO- Tween 80- Saline (0.5:1:8.5)	DMSO- Tween 80- Saline (0.5:1:8.5)	DMSO- Tween 80-Saline (0.5:1:8.5)	Deneyin Bitişi
Grup 2: KOH			PMSG 10 IU		hCG 10 IU		
Grup 3: OHSS	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	hCG 30 IU		
Grup 4: OHSS+Kersetin	PMSG 10 IU Kersetin 30 mg/kg	PMSG 10 IU Kersetin 30 mg/kg	PMSG 10 IU Kersetin 30 mg/kg	PMSG 10 IU Kersetin 30 mg/kg	hCG 30 IU Kersetin 30 mg/kg	Kersetin 30mg/kg	

3.2.2. Hayvan deneyinin yapılışı

Tüm 22 günlük hayvanların çalışmaya başlamadan önceki ağırlıkları ölçülüp kaydedilmiştir. Kontrol grubuna (Grup 1) Kersetinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO-Tween80-Salin (0,5:1:8,5) çözeltisi [180] Kersetin ile aynı hacimde olacak şekilde deneyin 1. ve 6. günleri arasında intraperitoneal yol ile uygulanmıştır. KOH grubundaki (Grup 2) hayvanlara ise ovaryum indiksiyonu yapmak için deneyin 3. günü PMSG 10 I.U. ve 5. günü hCG 10 I.U. subkutan (s.c.) olarak uygulanmıştır. OHSS (Grup 3) ve OHSS+Kersetin (Grup 4) grubunda sıçanlarda OHSS'nin major belirtilerinin ortaya çıkması için [22, 178, 179], 22 günlük ratlara 4 gün boyunca PMSG 10 I.U. s.c. olarak uygulandı. Sonrasında ise ovulasyonu indüklemek için her iki grubada deneyin 6. gününde 30 I.U. hCG s.c. olarak uygulandı. Tedavi grubuna ise Kersetin [181] DMSO-Tween80-Saline (0,5:1:8,5) solüsyonunda çözülerek 30 mg/kg dozda intraperitoneal yolla, her PMSG ve hCG uygulamasından 2 saat önce deneyin 1. ve 5. günleri arasında ve 6. gün diğer günlerdeki uygulama saatinde tek başına uygulandı. Deney sonunda tüm sıçanlar tartıldı ve ağırlıklarına göre ksilazin (5-8 mg/kg/i.p.) ve ketamin (75-90 mg/kg/i.p.) anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak kurban edilmektedir.

3.2.3. Örneklerin toplanması

Periton Sıvısının Alınması

Tüm sıçanlar hCG uygulamasından 48 saat sonra tekrar tartıldı ve 50 mg/kg ketamin i.p. olarak verilerek laparotomi gerçekleştirildi. 2 ml serum fizyolojik tampon peritoneal boşluğa doldurularak 30 saniye çalkalandı ve periton yıkama sıvısı dikkatlice geri alınmıştır. Alınan örnekler deney gününe kadar uygun koşullarda (-80°C) saklanmıştır.

Kanların Toplanması

Deney sonunda bütün gruptaki hayvanların derin anestezisi (ketamin- ksilazin) altında intrakardiyak kan alınarak ötenazileri gerçekleştirildi. E₂ serum seviyesi ölçümü için alınan kanlar serum tüplerine aktararak, 3000 rpm da 10 dk. santrifüj edilip, serumun ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen serumlar, yapılan biyokimyasal analizler için -80°C'de deney gününe kadar saklandı.

Ovaryum Dokularının Alınması

Sakrifiye edilen hayvanların bilateral ovaryum dokuları çıkarılarak ağırlıkları ölçüldü. Bütün gruptaki hayvanların ovaryumları histolojik incelemeler için yeterli miktarda Bouin solüsyonu içeren kaplara alındı. Sonrasında, 4 gün boyunca Bouin solüsyonunda fiksasyon gerçekleştirilerek %70'lik lityum karbonatlı alkol solüsyonunda 24 saat yıkama işlemi yapılarak dokular takibe alındı. Takip işleminden sonra ovaryum dokuları parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi.

Kullanılan Fiksasyon solüsyonu: Bouin fiksatif (100 ml bouin solüsyonu için)

- 75 ml Pikrit asit (su ile doyurulmuş)
- 25 ml formaldehit
- 2 ml Asetik asit

Çizelge 3.4. Kullanılan otomatik takip prosedürü

Kullanılan Kimyasal ve Oranı	Süre
%70 Alkol	45 dakika
%70 Alkol	45 dakika
%80 Alkol	45 dakika
%96 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin	1 saat

3.3. Deney Yöntemleri

Ovaryum dokusunun histolojik olarak incelenmesi için H&E (Hematoksilen-Eozin), Periyodik Asit Schiff (PAS); VEGFA ve VEGFR-2 proteinlerinin immünohistokimyasal ekspresyonunun değerlendirilmesi için immünohistokimyasal boyama; periton sıvısındaki IL-6, VEGFA ve serumdaki E2 oranlarının belirlenmesi için ELISA (Enzim bağlı immünosorbent deneyi) analizleri ve ışık mikroskobundan elde edilen bulgular doğrultusunda ovaryum dokularının bilgisayar ortamında 3 boyutlu modelleme işlemleri gerçekleştirildi.

3.3.1. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi

Ovaryum kesitleri 60°C'lik etüvde 1,5-2 saat boyunca deparafinizasyon işlemi için bekletildi. Sonrasında ise örnekler 2 kez 15'şer dakika farklı ksilolde bekletildikten sonra sırasıyla azalan (%100-90-80-70-50) etil alkol serisinde 10'ar dk tutuldu. Daha sonra, ovaryum kesitleri 10 dk akar musluk suyunda yıkanarak alkolden arındırıldı. İlk olarak 10 dakika hematoksilen boya solüsyonu ile boyanan kesitler daha sonra akar musluk suyu altında 10 dakika yıkandı. Aşırı hematoksilen boyanmasını engellemek için kesitler glasiyel

asetik asit ile alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarıldı ve sonrasında yine akan musluk suyu altında 5 dakika daha yıkandı. Bu sefer ovaryum kesitleri 10 dakika Eozin boya solüsyonu ile boyandıktan sonra 3-5 dakika boyunca akan musluk suyu ile yıkanarak dehidratasyon işlemi için artan etil alkol (%100-90-80-70-50) serisinden hızlıca geçirildi. Son olarak örnekler 45 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.3.2. Periyodik asit Schiff (PAS) boyaması

Ovaryum dokularından 4 µm kalınlığında alınan kesitler aşağıdaki PAS prosedürü uygulanarak bilgisayar destekli Leica DM 4000B LAS Ver. 4.9 (Almanya) görüntülü analiz sisteminde incelenerek değerlendirildi.

Periyodik asit boyama yöntemi

- Lam üzerine alınmış doku kesitlerin deparafinizasyon işlemi için 37 °C etüvde bir gece boyunca bekletildikten sonra etüv derecesi 57 °C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.
- Sonrasında ovaryum doku kesitleri 2 farklı klisol solüsyonunda 5'şer dakika süresince bekletildi.
- Kesitler sırası ile %100 (2 defa), %96, %80 ve %70'lik etil alkol solüsyonlarında 3 dakika süresince bekletildi.
- Alkol solüsyonlarından çıkarılan kesitler, distile suda 4-5 kez batırılıp-çıkarılarak alkolden arındırıldı.
- Bundan sonra doku kesitleri 10 dakika süresince %0,5'lik Periyodik asit solüsyonunda bekletildi.
- Periyodik asit solüsyonundan arındırmak için kesitler 10 dk. boyunca akar suda yıkandı.
- Yıkanan kesitler Schiff reaktifi solüsyonunda 25 dakika boyunca bekletildikten sonra sodyum metabisülfid ile 2 defa 5 dakika boyunca yıkandı.
- Sonrasında bu sefer akar musluk suyunda 15 dakika boyunca yıkama yapıp distile sudan geçirilen kesitler 1 dakika süresince Harris Hematoksilen ile çekirdek boyası yapıldı.
- Boyanan kesitler akan musluk suyu ile 10 dk. yıkandı.

- Ovaryum kesitleri azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilolde bekletilip entellan ile kapatıldı.

3.3.3. İmmünohistokimyasal (IHC) boyama

Değerlendirilen IHC parametreleri

Vasküler endotelyal büyüme faktör A (VEGFA), Vasküler endotelyal büyüme faktör resöptörü 2 (VEGFR-2) ekspresyonu (immünohistokimyasal).

Ovaryum dokularından 4 µm kalınlığında alınan kesitler aşağıdaki immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulanarak bilgisayar destekli Leica DM 4000B LAS Ver. 4.9 (Almanya) görüntülü analiz sisteminde incelendi. VEGFA ve VEGFR-2 proteinlerinin immünohistokimyasal yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal boyama yöntemi

- Polilizinli lam üzerindeki doku kesitlerinin deparafinizasyon işlemi için 37 °C etüvde bir gece boyunca bekletildikten sonra etüv derecesi 57 °C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.
- Sonrasında ovaryum doku kesitleri 2 farklı ksilol solüsyonunda 15'şer dakika süresince bekletildi.
- Kesitler sırası ile %100, %96, %80 ve %70'lik etil alkol solüsyonlarında 1 dakika süresince bekletildi.
- Alkol solüsyonlarından çıkarılan kesitler, 2 kez 5'er dakika distile suda bekletilerek alkolden arındırıldı.
- Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulaması ile dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS ile lamlar ile 3 kez yıkandı.
- Daha sonra, sitrat tamponu (pH 6.0) kullanılarak doku kesitlerine mikrodalga fırında 15 dk. retrieval işlemi uygulandı.
- İşlemden sonra soğuyana kadar bekletilen kesitler (15 dk. civarında) distile suya alınarak 2 ayrı kaptaki 5 dk. distile su da bekletilerek sitrat solüsyonundan arındırıldı.

- Ovaryum dokuların etrafı PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildikten sonra 3 kez PBS (Ph 7.4) ile yıkandı.
- Bu işlemin ardından özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla doku kesitlerine 30 dk. UltraV block uygulandı ve herhangi bir yıkama yapılmadan primer antikor aşamasına geçildi.
- Bu aşamada kullanılan primer antikorlar: VEGFA için 1/250 ve VEGFR-2 için ise 1/150 dilüsyon oranları kullanıldı. Dilüsyonlar PBS ile hazırlandı.
- Ovaryum kesitleri gece boyunca +4 °C primer antikorlar ile inkübe edildi.
- Sonraki gün 16 saati geçmeden, kesitler 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkanarak 30 dakika boyunca biotinli sekonder antikorun primer antikora bağlanması sağlandı.
- Bu işlemin ardından doku kesitleri PBS ile 3 kez 3'er dakika iyi bir şekilde yıkandıktan sonra 30 dakika süresince streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakılıp, işlem sonunda dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.
- Son olarak ortama diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen DAB eklenerek reaksiyonun gerçekleştiği gözlemlendiğinde reaksiyon distile su ile durdurularak kromojen boyaması gerçekleştirildi.
- Sonrasında dokuların zıt boyanması Mayer'in hematoksilin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonunda dokular 5 dk. akan suda yıkandı.
- IHC boyaması yapılan ovaryum dokularının entellan ile kapatılması için kesitler artan (%70, %80, %96, %100) alkol serilerinde otuz saniye altında olacak şekilde geçirilerek 30 dk. boyunca ksilolde bekletildi.

3.3.4. ELISA analizleri

Elde edilen periton sıvısı ve serum örnekleri deneyler yapılana kadar -80 °C de muhafaza edildi. Protein tayini ve diğer ELISA analizleri aynı gün içerisinde yapıldı.

Protein tayini

Elde edilen periton sıvısı ve serum örneklerindeki protein miktarı bikinkoninik asit (BCA) protein miktar tayini kiti kullanılarak hesaplandı. Bu yöntemde BCA, proteinlerle etkileşime girer ve numune solusyonunda yeşilden mora renk değişimi yaşanır. Renk

değişimi protein konsantrasyonu ile değişmektedir. Bu renk değişimi de spektrofotometri yardımı ile 562 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans değerleri bulundu. Elde edilen absorbans değerleri, BSA standartları kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon eğrisine göre hesaplanarak protein konsantrasyonu belirlendi. Protein tayininde protein standardı olarak sığır serum albümini kullanıldı ve protein miktarları pg/mL cinsinden hesaplandı.

Periton sıvısı örnekleri

Peritoneal sıvıdan VEGF ve IL-6 kantitatif ölçümleri uygun ELISA kiti kullanılarak ve kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Serum örnekleri

Alınan kan örneklerinden elde edilen serum örnekleri kullanılarak E₂ parametresinin kantitatif ölçümleri uygun ELISA kiti kullanılarak kit protokolü esas alınarak gerçekleştirildi.

Uygulanan ELISA yöntemi

Hazırlık, analiz ve hesaplama olmak üzere 3 aşamada uygulanan prosedürler ELISA kit üreticisi tarafından sağlanan bilgiler ile hazırlandı.

A. Hazırlık aşaması:

Reaktiflerin ve standart dilüsyonların hazırlanması

Bütün çözeltiler, kit içerisinde mevcut olan reaktifler kullanılarak, üretici firmanın önerdiği prosedürlere göre analiz öncesinde ve sırasında taze olarak hazırlandı. Bütün kullanılan örnekler ve kimyasal solüsyonlar oda sıcaklığına gelene kadar bekletildikten sonra kullanıldı. Her kit prosedüründe belirtildiği sayıda standart 1:2 oranında seri seyreltmeler yapılarak hazırlandı. Bu standartlar standart kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Tüm ELISA analizleri en az iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

B. Analiz Aşaması

- Standart olarak kullanılacak kuyucuklara 100 µl standart dilüent eklendi.
- Periton ve serum örneklerinden 50 µl alınarak, kitte mevcut olan antikor ile kaplı 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki kuyucuklara koyularak 2 saat 37 °C’de inkübe edildi.
- İnkübe edildikten sonra, kuyucuklar 3 kere yıkama çözeltisi ile yıkandı.
- Sonrasında, her bir kuyucuğa 50 µl biotin-konjugat eklendi ve kültür kabı yapışkan film ile kaplanıp, 1 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- Yapışkan film kaldırılıp kuyucuklar boşaltılarak, bağlanmamış birincil antikorun uzaklaştırılması için kuyucuklar yıkama çözeltisi ile üçer kez yıkandı.
- Bundan sonra her kuyucuğa 100 µl avidin-konjuge-HRP sekonder antikor eklenerek yapışkan film ile kaplanıp 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- Yapışkan film kaldırılarak, kuyucuklar boşaltıldı ve yıkama çözeltisi ile üçer kez yıkandı.
- Bu işlemde sonra her bir kuyucuğa kromojen substrat çözeltisi eklenerek renk değişiminin ardından durdurma çözeltisi eklenerek enzim reaksiyonu sonlandırıldı.
- Renk değişimi prensibine dayanan bu deneysel yöntemde, meydana gelen renk değişimi 450 nm’de mikropilaka okuyucu ile absorbans değerleri olarak ölçüldü.

C-Hesaplama Aşaması

- Standart konsantrasyonları X eksenine, absorbans değerleri Y eksenine yerleştirilerek standart kalibrasyon grafiği hazırlandı.
- Standart grafiğinde absorbanslara karşılık gelen konsantrasyon değerleri tespit edildi.
- Değerler protein miktarlarına göre normalize edilerek pg/ml birim olarak sunuldu.

3.4. Histolojik Değerlendirme

3.4.1. Kesit alma ve boyama işlemleri

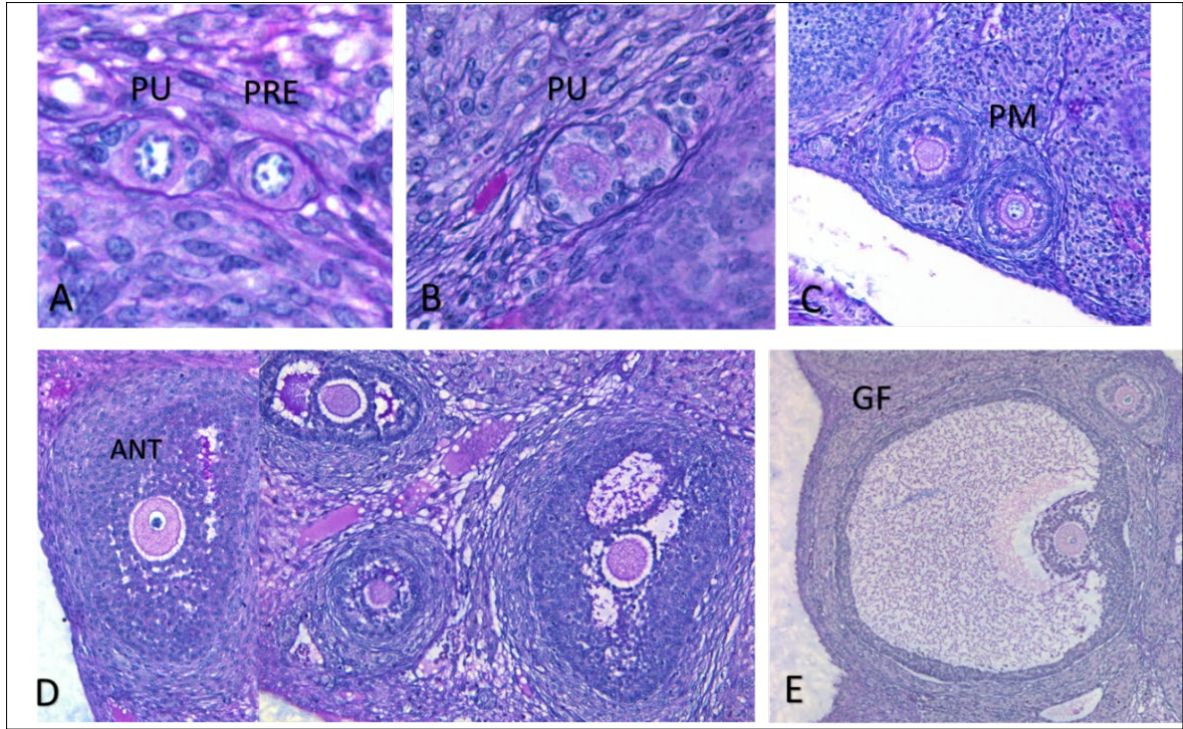
Bouin solüsyonunda fikse edilen ovaryum doku örnekleri rutin histolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan da ovaryumlardaki aynı yapının iki kez sayılmasını önlemek amacı ile en az 50 µm aralık olacak şekilde 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı [182, 183]. Alınan bu kesitlere Hematoksilen-Eozin ve PAS

boyaması yöntemleri uygulandı. Ovaryumların histo-morfolojisinin ve içindeki yapıların değerlendirilmesi için bütün gruplardaki her hayvan için en az 6 ayrı doku kesiti incelemeye alındı [183, 184]. Ovaryumda sayılan yapıların hepsi toplanarak 100 kabul edildi ve her follikül ve yapının sayısı ayrı ayrı yüzdelik olarak hesaplandı. Ayrıca korpus luteum yapılarının sayısının değerlendirilmesinde en büyük alandan geçen kesitler kullanılarak da sayım yapıldı [183, 185]. Deney sonunda boyanan kesitler Leica DM 4000B bilgisayar destekli ışık mikroskobunda incelenerek Leica LAS V4.9 programıyla değerlendirildi.

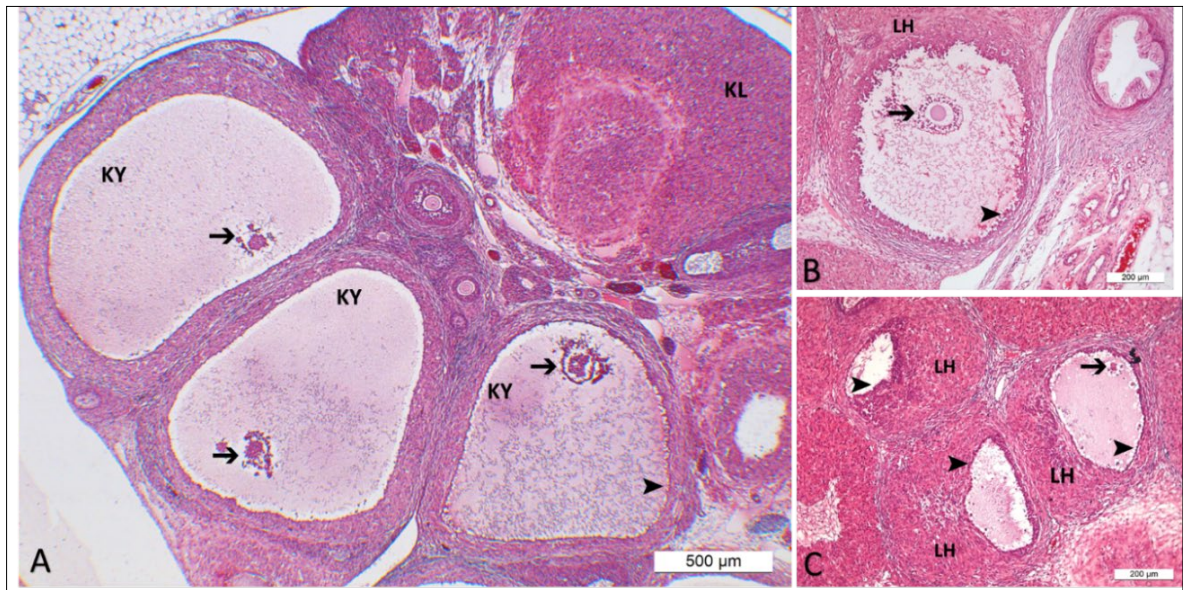
3.4.2. Ovaryum folliküllerin ve diğer yapıların değerlendirilmesi

Ovaryum dokularının ışık mikroskobu ile incelenmesinde ovaryum folliküllerin morfolojik sınıflandırılması aşağıdaki tanımlara göre yapıldı [74].

- I. *Primordiyal follikül*: Primer oosit etrafında tek tabakalı yassı granüloza hücrelerinin izlendiği follikül yapıları
- II. *Tek tabakalı primer follikül (Erken)*: Primer oosit etrafında tek tabakalı kübik granüloza hücrelerinin izlendiği follikül yapıları
- III. *Çok tabakalı primer follikül (Geç)*: Tanımlanabilir bir antrum içermeyen ve birden fazla granüloza hücre katmanının primer oositi çevrelediği follikül yapıları
- IV. *Antral follikül*: Bir veya iki küçük antrum bulunduran veya tek bir büyük antral boşluk içeren follikül yapıları
- V. *Atretik follikül*: Atretik follikül yapıları, küçük folliküller için dejenere bir oositin gözlemlendiği veya erken gelişmiş antrum yapısının olduğu veya her ikisini de içeren folliküller yapıları; diğerleri için follikül başına 10'dan fazla piknotik çekirdek içeren yapılar olarak tanımlanmışlardır [184, 186].
- VI. *Kistik yapılar*: Kistik yapılar, lüteal hücrelerce ve bu lüteal hücrelerden geriye kalan granüloza ve/veya kan hücreleri ile çevrelenmiş oosit bulunduran yapılar olarak tanımlanmıştır [187, 188].



Resim 3.1. Ovaryumdaki folliküllerin değerlendirmesinde kullanılan örnek yapılar. (A) primordiyal (PRE) ve primer unilaminar (PU) follikül örnekleri PAS, 40x, (B) primer unilaminar (PU) follikül örneği PAS, 40x (C) primer multilaminar follikül örneği (PM), (D) antral follikül örnekleri (AntF), (E) Graaf follikül örneği



Resim 3.2. Ovaryum dokusuna ait kistik yapı örnekleri, kistik yapı (KY), oosit kalıntıları (→), granüloza hücre tabakası (▶) lüteinize hücreler (LH), korpus luteum (KL) (A) H&E, 40x; (B, C) H&E, 100x

3.4.3. Histolojik bulguların 3D modellemesi

Işık mikroskobundan elde edilen bulgular doğrultusunda, bütün gruptaki sıçanların ovaryum dokuları bilgisayar ortamında 3 boyutlu hale getirilmiştir. Bu amaçla Cinema 4D Release 24 (Maxon computer, Friedrichsdorf, Germany) adlı 3 boyutlu modelleme ve animasyon programı kullanılmıştır. Elde edilen 3 boyutlu modellerden görüntüler alınmıştır. Görüntülerden 300 dpi olacak şekilde jpeg formatında renderler yapılmıştır.

3.5. İstatistiksel Yöntem

Deneyler sonunda elde edilen bütün değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermedikleri bu verilerle oluşturulan histogram grafiklerinin incelenmesi ve Shapiro-Wilk testi uygulanması sonucunda belirlendi. Elde edilen verilerde oluşan değişikliklerin gösterilmesi için ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanıldı. Normallik (Parametrik) test varsayımını gösteren değişkenler Tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde ise Tukey post-hoc testleri kullanıldı [188].

Her gruba ait ilk ve son ağırlık ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı normal dağılıma uymayan OHSS+Kersetin grubu hariç (Wilcoxon testi) diğer gruplarda parametrik-bağımlı örneklem t-testi kullanılarak hesaplandı [189].

Yapılan istatistiksel analiz ve hesaplamalar GraphPad Prism 8 (ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,0001$ değerinden küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi [188].

4. BULGULAR

4.1. Hayvan ve Ovaryum Dokusu Ağırlık Bulguları

4.1.1. Hayvan ağırlıkları

Çalışma süresince kontrol ve diğer gruplardaki hayvanlarda herhangi bir sebepten dolayı bir kayıp yaşanmadı. Her gruba ait sıçanların ağırlık ölçümleri bir kez deney başlangıcında ve bir kez de deney sonunda tartılarak yapıldı. Her gruba ait ilk ve son ağırlık ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı normal dağılıma uymayan OHSS+Kersetin grubu hariç (Wilcoxon testi) diğer gruplarda parametrik-bağımlı örneklem t-testi kullanılarak hesaplandı (Çizelge 4.2). Ayrıca sıçanların ağırlık değişimleri de istatistiksel olarak değerlendirildi. Fark olup olmadığı ANOVA hangi grupların bu farkı oluşturduğunun analiz edilmesi için ise *Tukey Post Hoc* testleri kullanıldı.

Çizelge 4.1. Gruplara ait ağırlıkların ve ağırlık değişimlerinin ortalama ve standart hata değerleri, n=7

GRUPLAR		Ortalama $\pm$ Standart Hata		
		İlk Ağırlık (g)	Son Ağırlık (g)	Ağırlık Değişimi (g)
1	KONTROL	82,43 $\pm$ 4,19	119,9 $\pm$ 10,48	37,43 $\pm$ 1,15
2	KOH	73,43 $\pm$ 5,52	116,3 $\pm$ 5,227	42,86 $\pm$ 1,67
3	OHSS	84,43 $\pm$ 6,43	129,4 $\pm$ 5,748	45,00 $\pm$ 1,38
4	OHSS+Kersetin	71,00 $\pm$ 6,78	113,9 $\pm$ 6,158	42,86 $\pm$ 1,65

Çizelge 4.2. Her grubun ilk ve son ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasının sonuçları, n=7

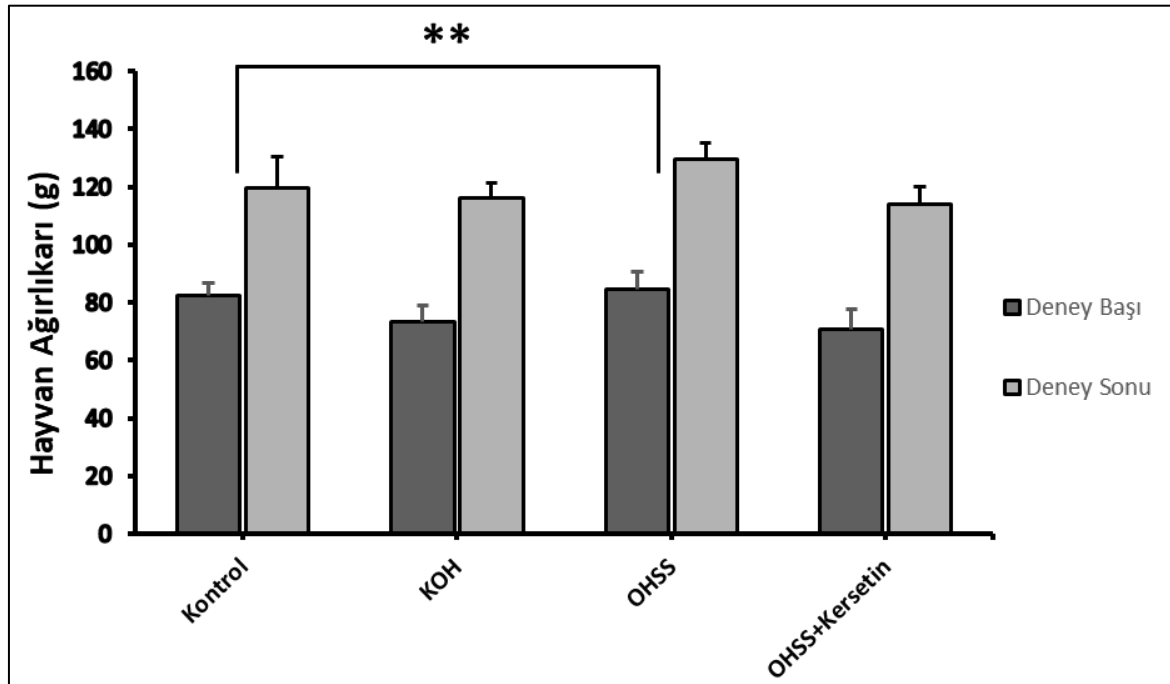
İlk Ağırlık – Son Ağırlık	Test	P Değeri (p<0.05)
Kontrol	Bağımlı örneklem t-testi	<0,0001 (***)
KOH	Bağımlı örneklem t-testi	<0,0001 (***)
OHSS	Bağımlı örneklem t-testi	<0,0001 (***)
OHSS+Kersetin	Wilcoxon testi	0,0156 (*)

Bu analizlere göre bütün gruplarda anlamlı bir ağırlık artışı tespit edildi (Çizelge 4.2). Bütün gruplardaki sıçanların ağırlıklarında zamanla birlikte artış tespit edilirken en fazla artış OHSS grubunda (45 $\pm$ 1,380 mg) sonra KOH (42,86 $\pm$ 1,668 mg) ve OHSS+Kersetin (42,86 $\pm$ 1,654 mg) en az artış ise kontrol (37,43 $\pm$ 1,152 mg) grubunda gözlemlendi.

Çizelge 4.3. Gruplara ait sıçanların ağırlık değişimlerinin ikili karşılaştırma istatistik tablosu, n=7

Tukey çoklu karşılaştırma testi	Düzeltilmiş P Değerleri
ANOVA	0,0095 (**)
Kontrol ile KOH	0,0704 (-)
Kontrol ile OHSS	0,0070 (**)
Kontrol ile OHSS+Kersetin	0,0704 (-)
KOH ile OHSS	0,7369 (-)
KOH ile OHSS+Kersetin	>0,9999 (-)
OHSS ile OHSS+Kersetin	0,7369 (-)

Ağırlık değişimlerinin değerlendirilmesi sonucunda (ANOVA, $p=0,0095$) sadece kontrol grubu ile OHSS grubu ($p=0,0070$) arasındaki ağırlık değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.1). Diğer ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Çizelge 4.3).



Şekil 4.1. Gruplara ait sıçan ağırlıklarının karşılaştırılması (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

4.1.2. Ovaryum dokusu ağırlıkları

Her gruba ait sıçanların deney sonlandırıldıktan sonra ovaryum dokuları tartılarak ağırlıkları ölçüldü. Sıçanların ovaryum ağırlıkları incelendiğinde ortalamaları ve standart hata değerleri kontrol grubunda $92,14 \pm 3,247$ mg; KOH grubunda $145,7 \pm 4,144$ mg; OHSS

grubunda $380 \pm 25,42$ mg; OHSS+Kersetin grubunda $264,3 \pm 15,21$ mg olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2). Gruplar arasında fark olup olmadığı ANOVA, hangi grupların bu farkı oluşturduğunu analiz etmek için ise *Tukey Post Hoc* testleri kullanıldı.

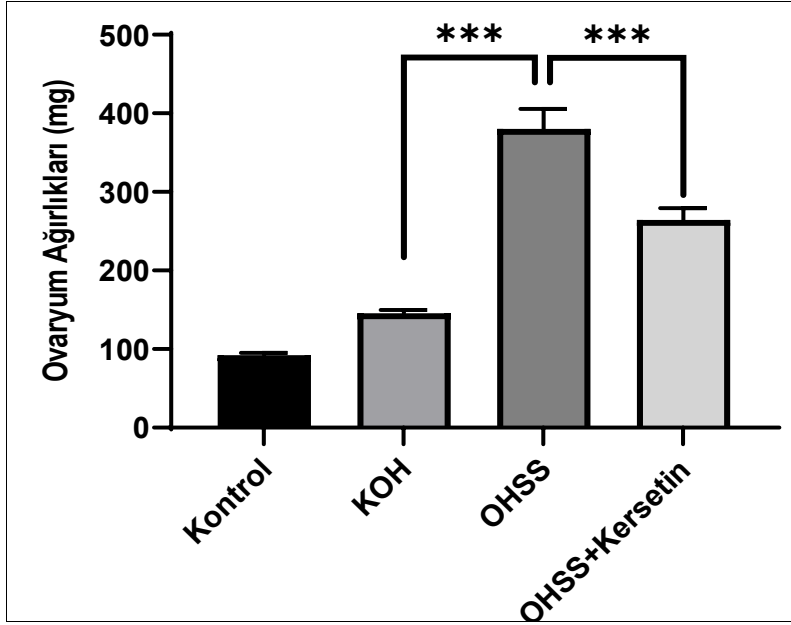
Çizelge 4.4. Gruplara ait ovaryum ağırlıklarının ortalamaları $\pm$ standart hata, n=7

GRUPLAR		Ortalama $\pm$ Standart Hata (mg)
1	Kontrol	92,140 $\pm$ 3,247
2	KOH	145,70 $\pm$ 4,144
3	OHSS	380,00 $\pm$ 67,27
4	OHSS+Kersetin (Tedavi)	264,30 $\pm$ 15,21

ANOVA analizi sonucunda anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,0001$). Gruplara ait ovaryum dokusu ağırlıklarının istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda sadece kontrol ile KOH grubu arasındaki fark ($p=0,0825$) istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Diğer ikişerli karşılaştırmaların hepsi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu karşılaştırmalar sırası ile Kontrol ile OHSS ($p<0,001$), Kontrol ile OHSS+Kersetin ($p<0,001$), KOH ile OHSS ($p<0,001$), KOH ile OHSS+Kersetin ($p<0,001$), OHSS ile OHSS+Kersetin ($p<0,001$) dir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Gruplara ait ovaryum ağırlıklarının değerlerinin istatistiksel çoklu karşılaştırma test sonuçları, n=7

Tukey çoklu karşılaştırma testi	Düzeltilmiş P Değerleri
ANOVA	<0,0001 (***)
Kontrol ile KOH	0,0825 (-)
Kontrol ile OHSS	<0,0001 (***)
Kontrol ile OHSS+Kersetin	<0,0001 (***)
KOH ile OHSS	<0,0001 (***)
KOH ile OHSS+Kersetin	<0,0001 (***)
OHSS ile OHSS+Kersetin	<0,0001 (***)



Şekil 4.2. Gruplara ait ovaryum ağırlık ölçümleri (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

Ovaryum ağırlıklarının en yüksek ölçüldüğü grup OHSS model grubu olarak tespit edildi. Bununla birlikte Kersetin verilen grup ile OHSS model grubu karşılaştırıldığında, Kersetinin ovaryum ağırlıklarını anlamlı bir şekilde ($p < 0,001$) düşürdüğü saptandı (Şekil 4.2).

4.2. Ovaryum Dokusu Çap Ölçüm Bulguları

Her gruba ait sıçanların ovaryum dokuları alındıktan sonra rutin histolojik takip yöntemi ile parafin bloklara gömüldü. Sonrasında bu parafin bloklardan 4 μ m boyutundaki kesitler alınarak H&E boyaması gerçekleştirildi. Altı farklı kesitten alınan resimler kullanılarak her ovaryum çap ölçümü için 6 ayrı ölçüm Image j 1.52p programı kullanılarak (NIH, Bethesda, MD) alındı. Sonrasında bu ölçümlerin ortalamaları alınarak çap uzunlukları mm cinsinden belirlendi (Resim 4.1).

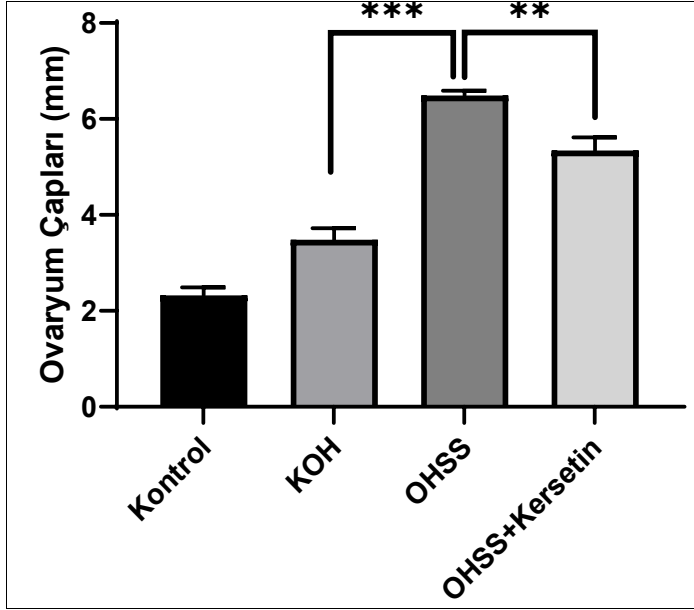


Resim 4.1. Ovaryum çap ölçümünün yapılışı, H&E, 40x

Sıçanların ovaryum çap ölçümleri incelendiğinde ortalamaları ve standart hata değerleri kontrol grubunda $2,32 \pm 0,168$ mm; KOH grubunda $3,49 \pm 0,237$ mm; OHSS grubunda $6,49 \pm 0,098$ mm; OHSS+Kersetin grubunda $5,34 \pm 0,272$ mm olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.3). Gruplar arasında fark olup olmadığı ANOVA, hangi grupların bu farkı oluşturduğunu analiz etmek için ise *Tukey Post Hoc testleri* kullanıldı.

Çizelge 4.6. Gruplara ait ovaryum dokusu çap ölçüm sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

GRUPLAR		Ortalama $\pm$ Standart Hata
1	Kontrol	$2,32 \pm 0,17$
2	KOH	$3,49 \pm 0,24$
3	OHSS	$6,49 \pm 0,10$
4	OHSS+Kersetin	$5,34 \pm 0,27$



Şekil 4.3. Gruplara ait ovaryum çap ölçümleri (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

Gruplara ait ovaryum çap ölçümlerinin istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda bütün gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak ($p < 0,0001$) anlamlı tespit edildi. *Tukey* çoklu karşılaştırmalı testinde de bütün ikili karşılaştırmaların sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Çizelge 4.7).

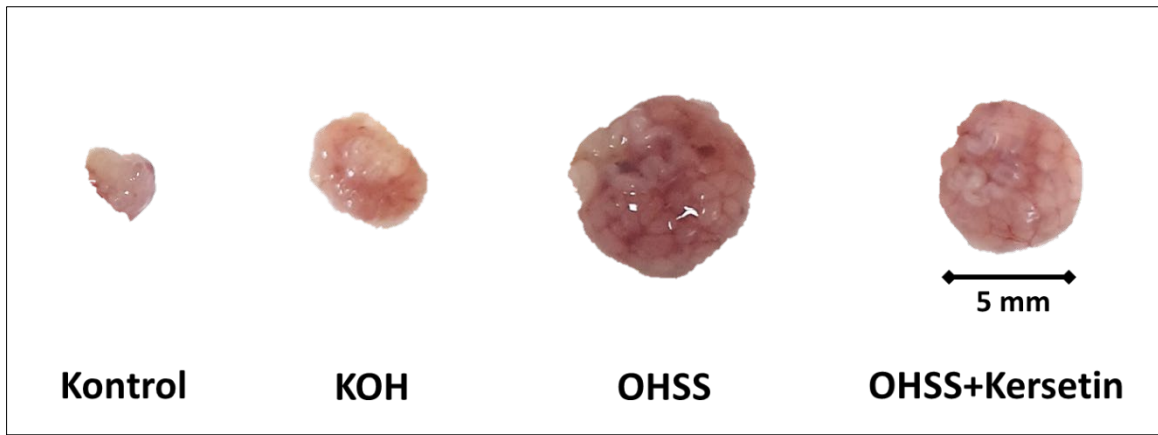
Çizelge 4.7. Gruplara ait ovaryum çap değerlerinin istatistiksel çoklu karşılaştırma test sonuçları, n=7

Tukey çoklu karşılaştırma testi	Düzeltilmiş P Değerleri
ANOVA	<0,0001 (***)
Kontrol ile KOH	0,0027 (**)
Kontrol ile OHSS	<0,0001 (***)
Kontrol ile OHSS+Kersetin	<0,0001 (***)
KOH ile OHSS	<0,0001 (***)
KOH ile OHSS+Kersetin	<0,0001 (***)
OHSS ile OHSS+Kersetin	0,0031 (**)

Sonuçlara göre en yüksek çap ölçümü OHSS grubunda tespit edilirken, kersetin tedavisinin sonucunda ovaryum çapında OHSS grubuna göre anlamlı bir düşüş ($p=0,0031$) bulundu. Bunlara ek olarak bir doz PMSG uygulamasının ovaryum çaplarını kontrole göre ($p=0,0027$) anlamlı bir şekilde yükselttiği tespit edildi (Şekil 4.3).

4.3. Makroskopik Bulgular

Tüm gruplara ait ovaryum dokuları makroskopik olarak incelendiğinde (morfometrik bulgularda desteklediği şekilde) kontrol grubu dışındaki diğer ovaryum dokularında özellikle OHSS grubunda OHSS'nin temel komponentlerinden biri olan ovaryum çapında ve boyutundaki artış dikkati çekmekteydi (Resim 4.2). Ayrıca OHSS grubunda ovaryum yüzeyinde belirgin şeffaf görünümlü ve ovaryum dokusunun hemen tamamını kaplayacak şekilde kistik oluşumlar, hemorajik alanlar dikkat çekti. Kersetin uygulanan grupta ise ovaryum çap ve boyutlarının OHSS grubuna göre küçüldüğü gözlemlendi. Ancak ovaryum dokusundaki kistik oluşumların varlığı devam etmekle beraber, OHSS grubuna göre azalmıştı (Resim 4.2).



Resim 4.2. Gruplara ait ovaryum dokularının makroskopik görüntüleri

4.4. Histolojik Bulgular

4.4.1. Kontrol (Grup 1) grubu

Kontrol grubuna ait sıçanların ovaryum kesitlerinde, küçük büyültmede ovaryum dokusunun en dıştan alçak, tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitelyum ile altında sıkı, düzensiz bağ dokusundan oluşan tunika albuginea ile çevrelenmiş olduğu görüldü (Resim 4.4). Ovaryum dokusu, dışta bağ dokusu yapısındaki stroma içinde değişik gelişim aşamalarında bulunan ovaryum folliküllerini içeren korteks ile içte bulunan gevşek bağ dokusu yapısındaki medulla bölümü normal görünmekteydi (Resim 4.3). Bu gruptaki

ovaryum dokularının korteks ve medulla bölgeleri belirgin bir şekilde ayırt edilebiliyordu (Resim 4.3).

Kortekste primer oositin tek katlı yassı hücreler tarafından çevrenmesi ile oluşan primordiyal folliküller, unilaminar primer, multilaminar primer folliküller, follikül sıvısının biriktiği antrum boşluğu içeren, teka interna ve teka eksterna tabakalarının ayırt edilmeye başlandığı sekonder (antral) folliküller, primer oositin korona radiata ile çevrelediği ve kumulus ooforusu içeren büyük çaplı Graaf folliküllerine rastlandı (Resim 4.4,5). Bazı antral follikül yapılarında, granüloza hücre tabakasındaki hücrelerde mitotik figürlere rastlandı (Resim 4.4). Bu grubun kesitlerinde bazı atretik folliküller de izlendi (Resim 4.3). Korpus luteum yapıları incelendiğinde, içte büyük, soluk boyanan granüloza lutein hücreleri ile ve dışta koyu boyanan teka lutein hücrelerinden oluşmaktaydı.

4.4.2. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (Grup 2) grubu

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu oluşturulan sıçan dokularına ait ovaryum kesitlerinin incelenmesinden sonra ovaryum dokusunu çevreleyen germinal epitel kübik şekilli ve normal görünümdeyken altında düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea bulunmaktaydı (Resim 4.7).

Ovaryum kesitlerinde değişik gelişim aşamalarındaki (primordiyal, primer, antral, Graaf follikülleri) ovaryum folliküllerini içeren korteks ile içte medulla bölgeleri ayırt edildi. Medulla bölgesi vaskülarizasyonun artmış olduğu oluşumların bulunduğu gevşek bağ dokusu yapısındaydı (Resim 4.7).

Bu grupta kontrol grubuna göre follikülogenezisin arttığı dikkat çekti (Resim 4.6 ve Çizelge 4.8). Korteksin içinde tek katlı yassı şekilli follikül hücrelerinin primer oositi çevrelediği primordiyal folliküller ile tek katlı kübik follikül hücreleri tarafında sarılı oositte oluşan unilaminar primer folliküller ve birden fazla granüloza hücre tabakasının oositi çevrelediği multilaminar primer folliküller görünmekteydi (Resim 4.7). Bunların yanısıra kesitlerde atretik folliküller de izlendi (Resim 4.6). Antral follikül, Graaf follikülün yanı sıra kontrol grubuna göre daha çok korpus luteum yapısı dikkati çekti (Resim 4.6, Çizelge 4.8). Korpus

luteum yapıları incelendiğinde, içte soluk boyanan granüloza lutein hücreleri ile dışta koyu boyanan teka lutein hücrelerinden oluştuğu görülmektedir (Resim 4.6).

Ayrıca bu grupta yapılan uygulamalara bağlı olarak geliştiği düşünülen ve kontrol grubunda görülmeyen duvarı birkaç sıra hücre tabakasından oluşan kistik oluşumlara rastlandı. Bunların folliküler kistik oluşumlar olabileceği düşünüldü. Kistik oluşumlar makroskopik görünümde de dikkati çekmekteydi (Resim 4.3, 4.6).

4.4.3. OHSS (Grup 3) grubu

OHSS grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde germinal epitel tek katlı kübik şekille izlenirken tukina albuginea düzensiz, sıkı bağ dokusu şeklinde gözlemlendi (Resim 4.8). Yine bu grupta da ovaryum kesitlerinin korteks alanında farklı gelişim aşamalarında olan ovaryum folliküllerine (primordiyal, primer, antral, Graff folliküller) rastlandı (Resim 4.8-9)

Ovarian hiperstimülasyon sendromu oluşturulan sıçanlara ait ovaryum kesitlerinin incelenmesi sonucunda küçük ve büyük büyültmelerde soluk sitoplazmalı, poligonal yapıdaki granüloza-lutein hücreleri ile onları çevreleyen teka lutein hücrelerinden oluşan korpus luteum oluşumlarının ve kistik oluşumların kontrol ve kontrollü ovarian hiperstimülasyon grubuna göre artmış olduğu gözlemlendi (Resim 4.9-10, Çizelge 4.8).

Kistik oluşumların ve korpus luteum yapılarının ovaryum dokusunun hemen tamamına yakınına oluşturduğu saptandı. Bu bulgu makroskopik görünümde de desteklenmekteydi (Resim 4.3). Bunlara ek olarak içindeki medullanın bu kistik oluşumlar arasında sıkışmış, dar ve çok sayıda hemorajik alanlar içeren dar bir bölge olarak izlendiği dikkati çekti (Resim 4.9B, 4.10A).

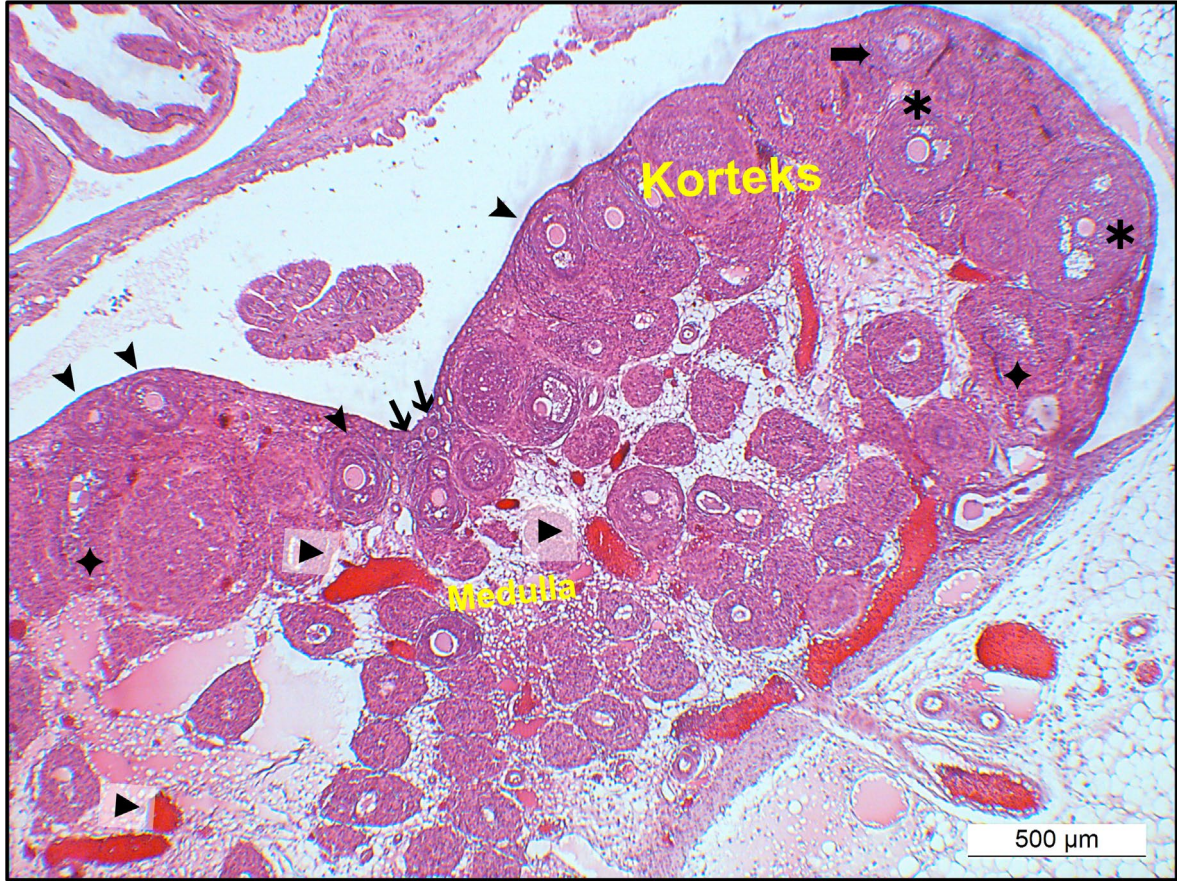
Bu gruptaki sıçanların ovaryum dokusu kesitlerinde, OHSS'nin de ana klinik unsurlarından biri olarak değerlendirilen çok miktarda kistik yapı ve hemorajik kistler izlendi (Resim 4.8, Resim 4.9A). Bununla birlikte diğer gruplardan farklı olarak bu kistik yapıların çoğunda kist kavitesinde hemorajik alanların varlığı dikkat çekti. Bazı yapılarda hemorajik alanların bütün kist boşluğunu doldurduğu görüldü (Resim 4.9A-4.10B).

Ayrıca bazı kistik yapıların ovaryum yapısını etkileyecek kadar genişlediği de izlendi (Resim 4.9A). Aynı gruba ait diğer kesitlerde yine çok sayıda korpus luteum, korpus hemorajikum yapılarına da rastlandı (Resim 4.9A-B, Çizelge 4.8).

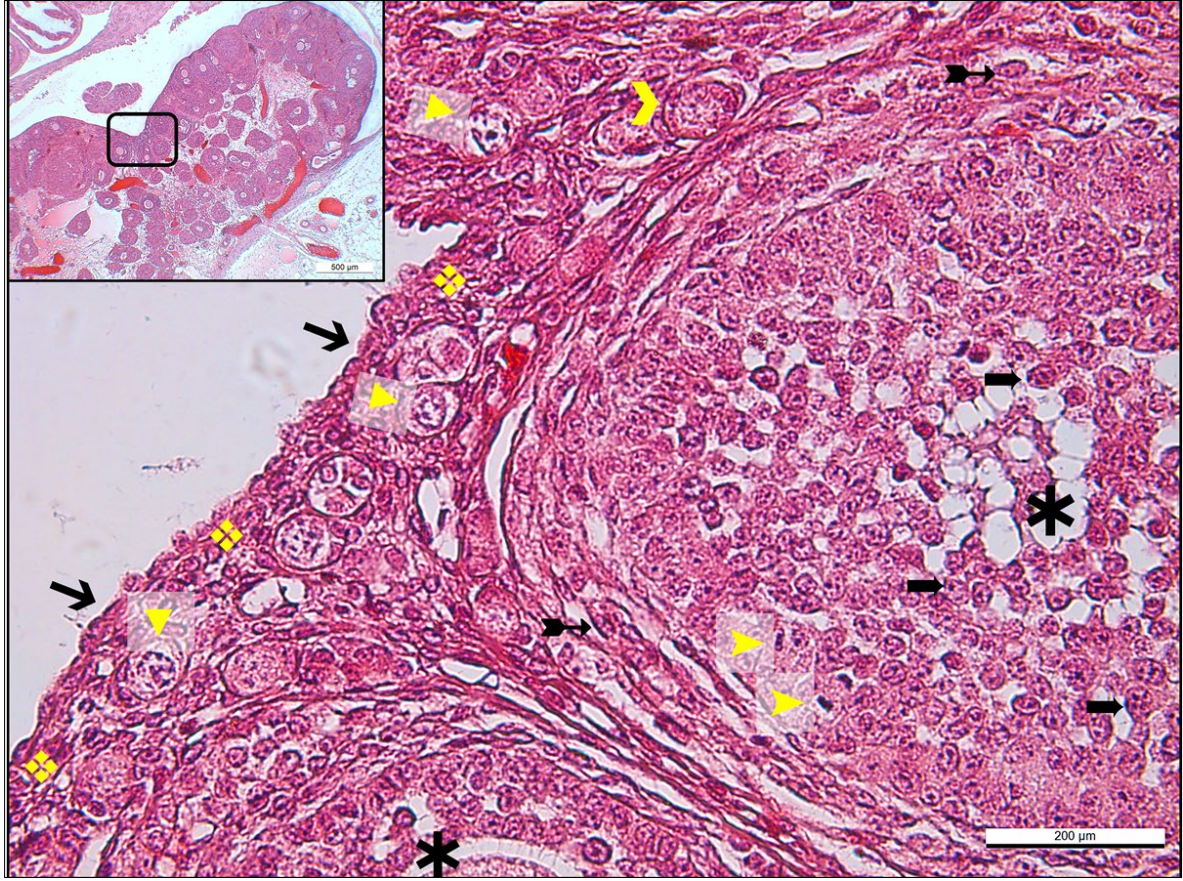
4.4.4. OHSS+Kersetin (Grup 4) grubu

Bu gruba ait kesitlerde ovaryum dokusunu dıştan çevreleyen tek katlı kübik epitel yapısındaki germinal epitel ile altında düzensiz, sıkı bağ dokusu yapısındaki t. albuginea izlendi (Resim 4.12). Diğer gruplarda olduğu şekilde kortekste değişik gelişim aşamalarında (primordiyal, primer, antral) folliküllere rastlandı (Resim 4.10-12). Kortekste primer oositin tek katlı yassı follikül hücrelerince çevrenmesiyle oluşan primordiyal folliküller izlendi. OHSS grubunda farklı olarak bu grubun kesitlerinde daha çok antral folliküllere rastlanmıştır (Resim 4.11, Çizelge 4.8). Ayrıca ovaryum kesitlerinde atretik folliküllere de rastlandı.

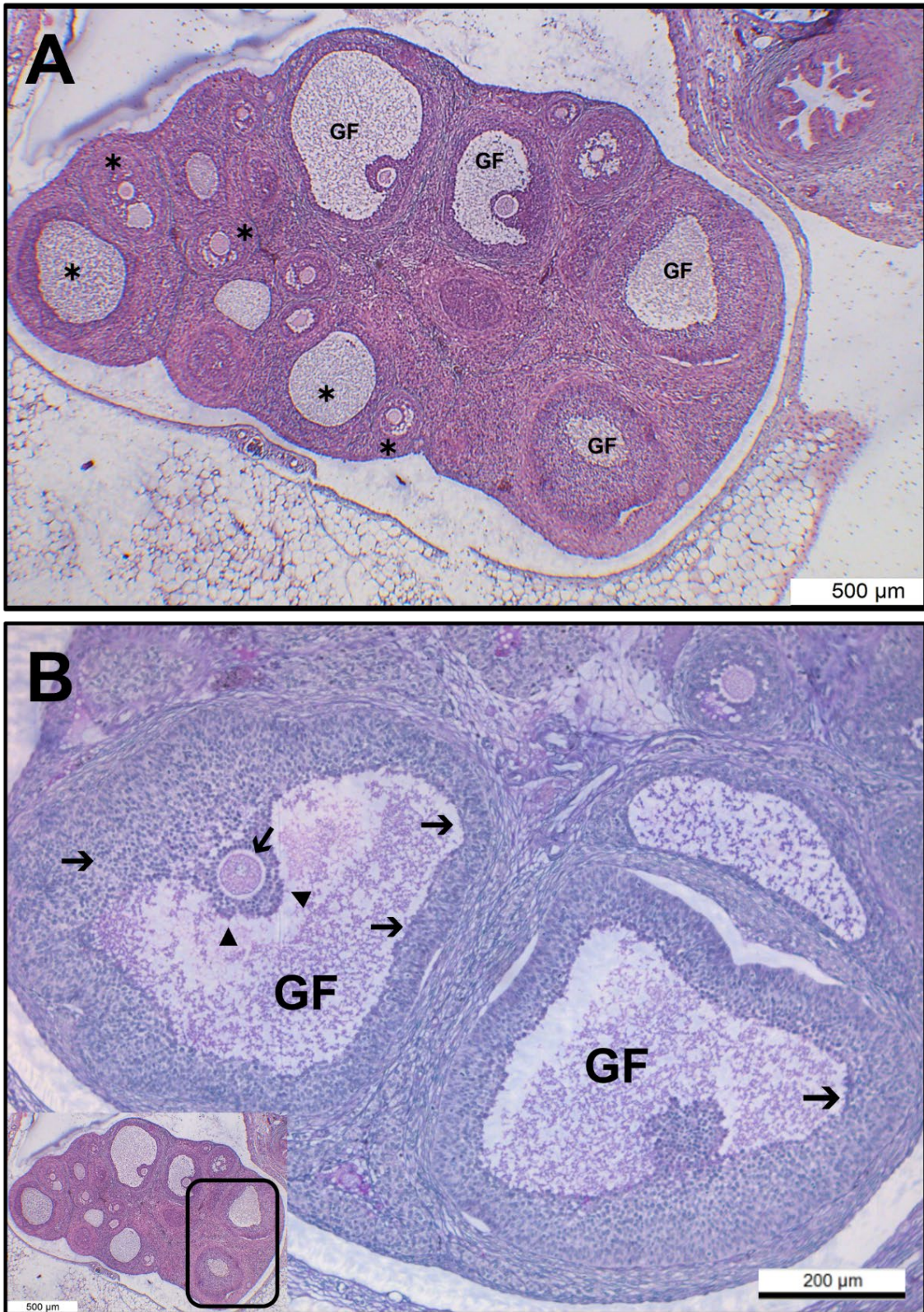
Bu grupta OHSS grubunda çok sayıda görülen korpus luteum oluşumları daha azdı. Korpus luteumlar incelendiğinde, bu yapıların soluk sitoplazmalı, poligonal yapıdaki granüloza-lutein hücreleri ile onları çevreleyen teka lutein hücrelerinden oluştuğu saptandı (Resim 4.11). Ayrıca bazı ovaryum kesitlerinde hemorajik bölgelere sahip korpus hemorajikumlar da izlendi. Bu bölgeler çoğunlukla bütün korpusun merkez boşluğunu doldururken bazen de sadece bir kısmında bulunuyordu (Resim 4.11A-B). Bu grupta OHSS grubunda görülen çevresi hücreler ile çevrenmiş kistik oluşumların mevcut olduğu ancak bu oluşumların OHSS grubuna göre azalmış olduğu saptandı (Resim 4.11A-B).



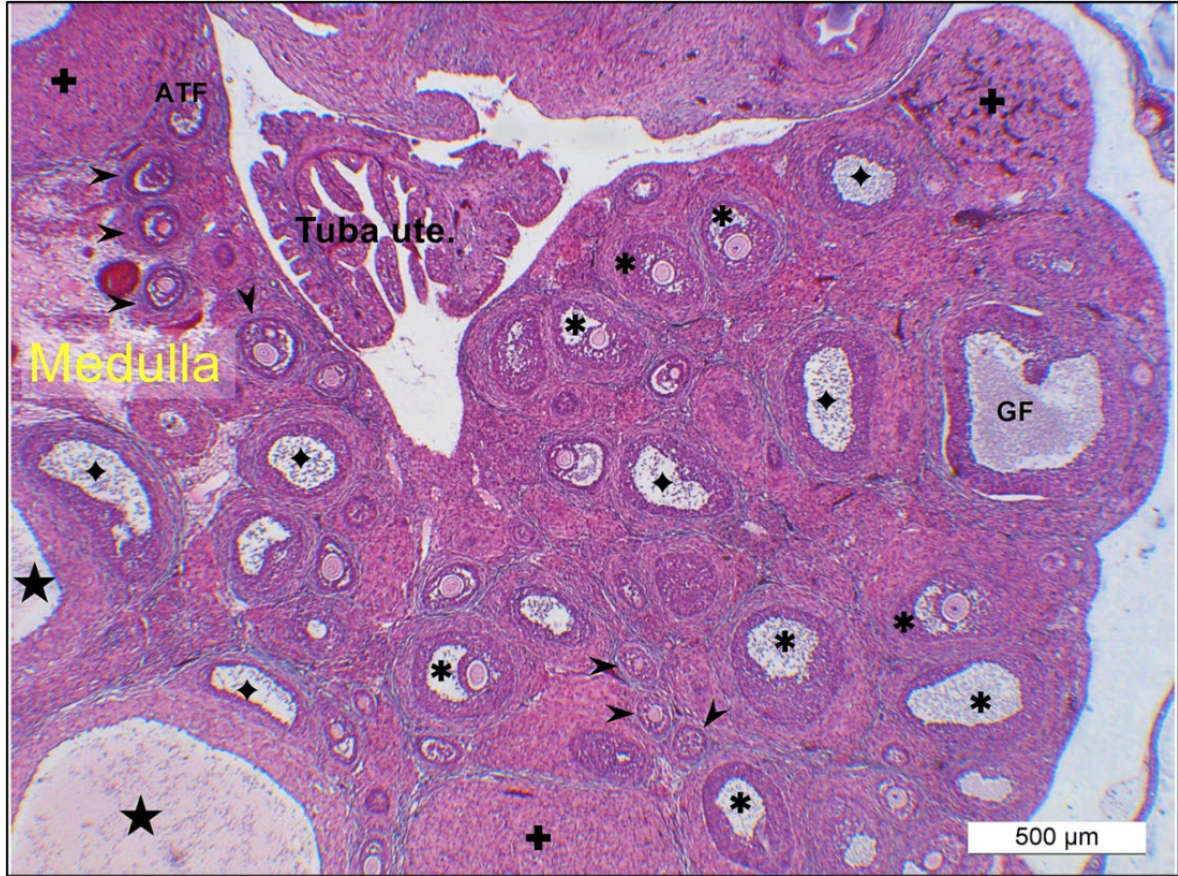
Resim 4.3. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, primordiyal follikül (→), multilaminar primer follikül (⇨), gelişmekte olan folliküller (▶), antral follikül (*), atretik follikül (◆), kan damarı (▼), H&E, 40x



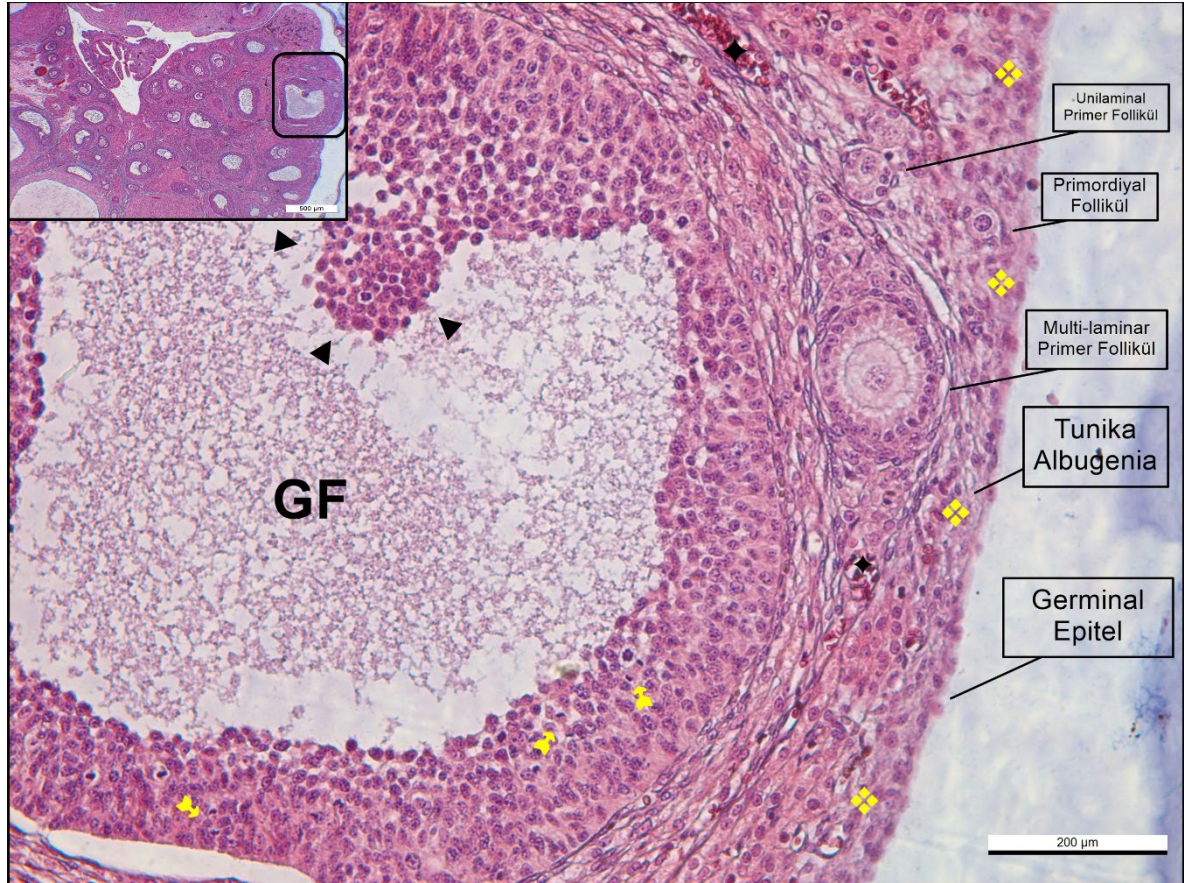
Resim 4.4. Kontrol grubuna ait ovaryumdaki germinal epitel (→) altında yerleşim gösteren primordiyal (▼) ve unilaminar primer folliküller (➤), epitelin altındaki sıkı bağ dokusu yapısındaki t. albuginea (◆), antral follikül (*), granüloza hücreleri (→), teka hücreleri (⇒) mitotik figürler (▶) H&E, 100x



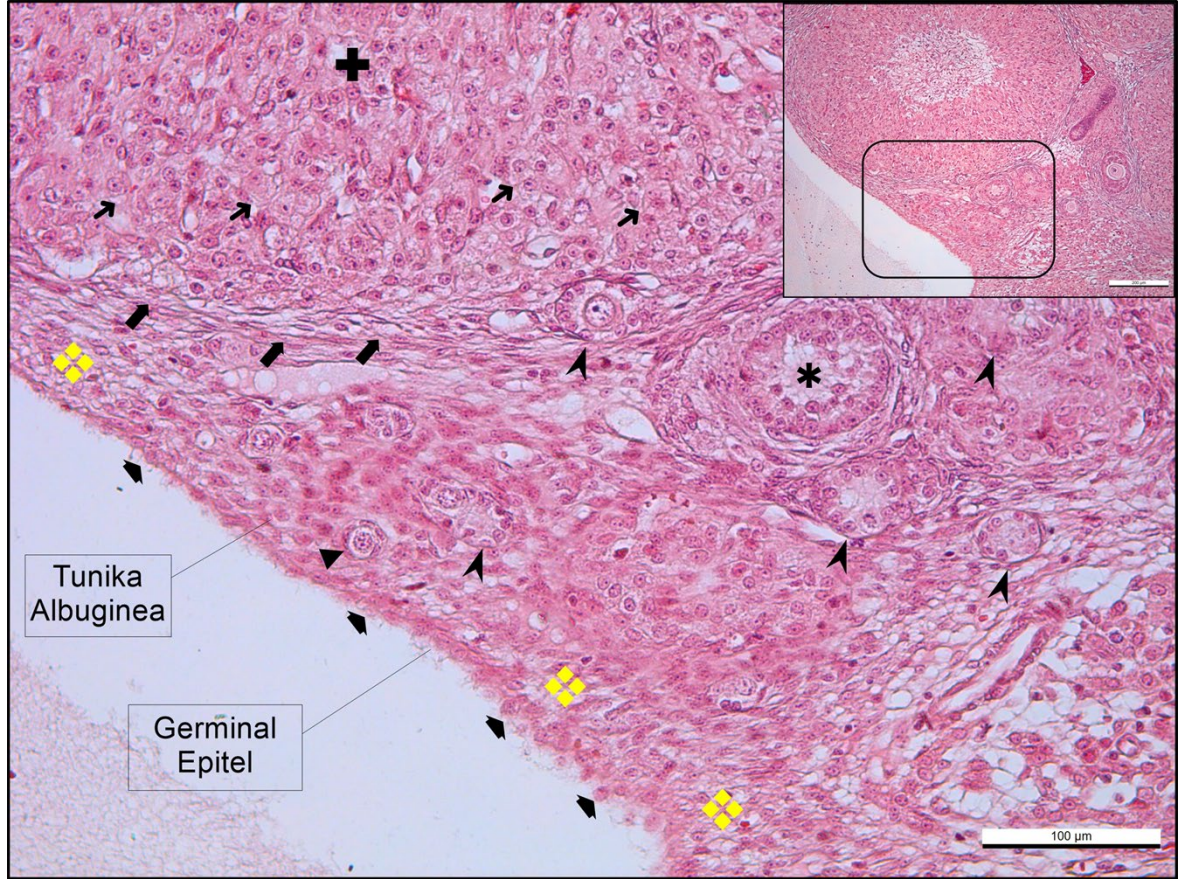
Resim 4.5. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu (A) gelişen çeşitli folliküler yapılar, antral follikül (*), Graaf follikül (GF), H&E, 40x, (B) kontrol grubuna ait Graaf follikül yapılarının görüntüsü, Graaf follikül (GF), oosit (→), korona radiata hücre tabakası (▲), granüloza hücre tabakası (→), PAS, 100x



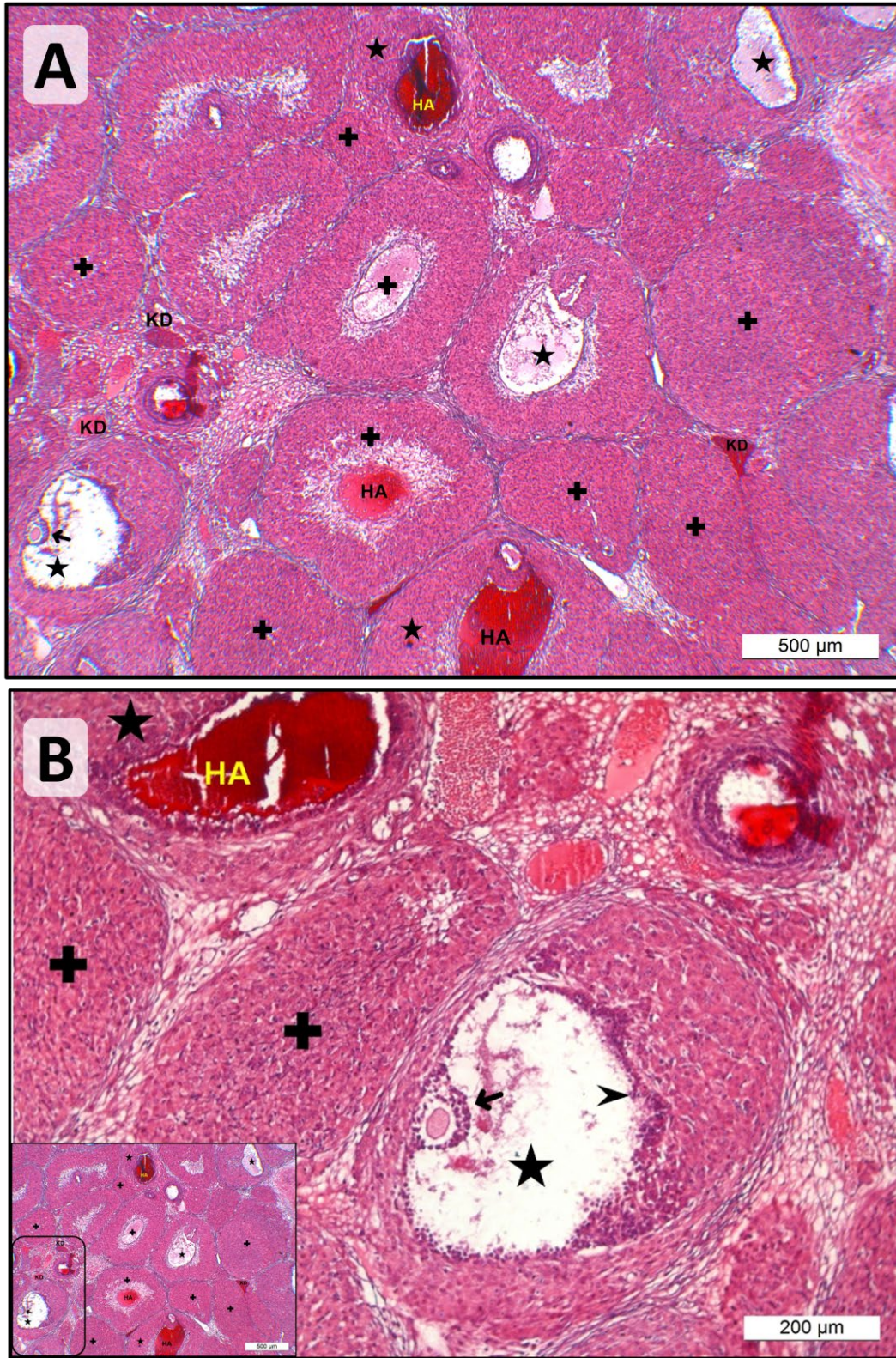
Resim 4.6. KOH grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, antral follikül (*), atretik follikül (◆), kistik yapılar (★), korpus luteum (+), gelişmekte olan follikül yapıları (➤), Graaf follikülü (GF), H&E, 40x



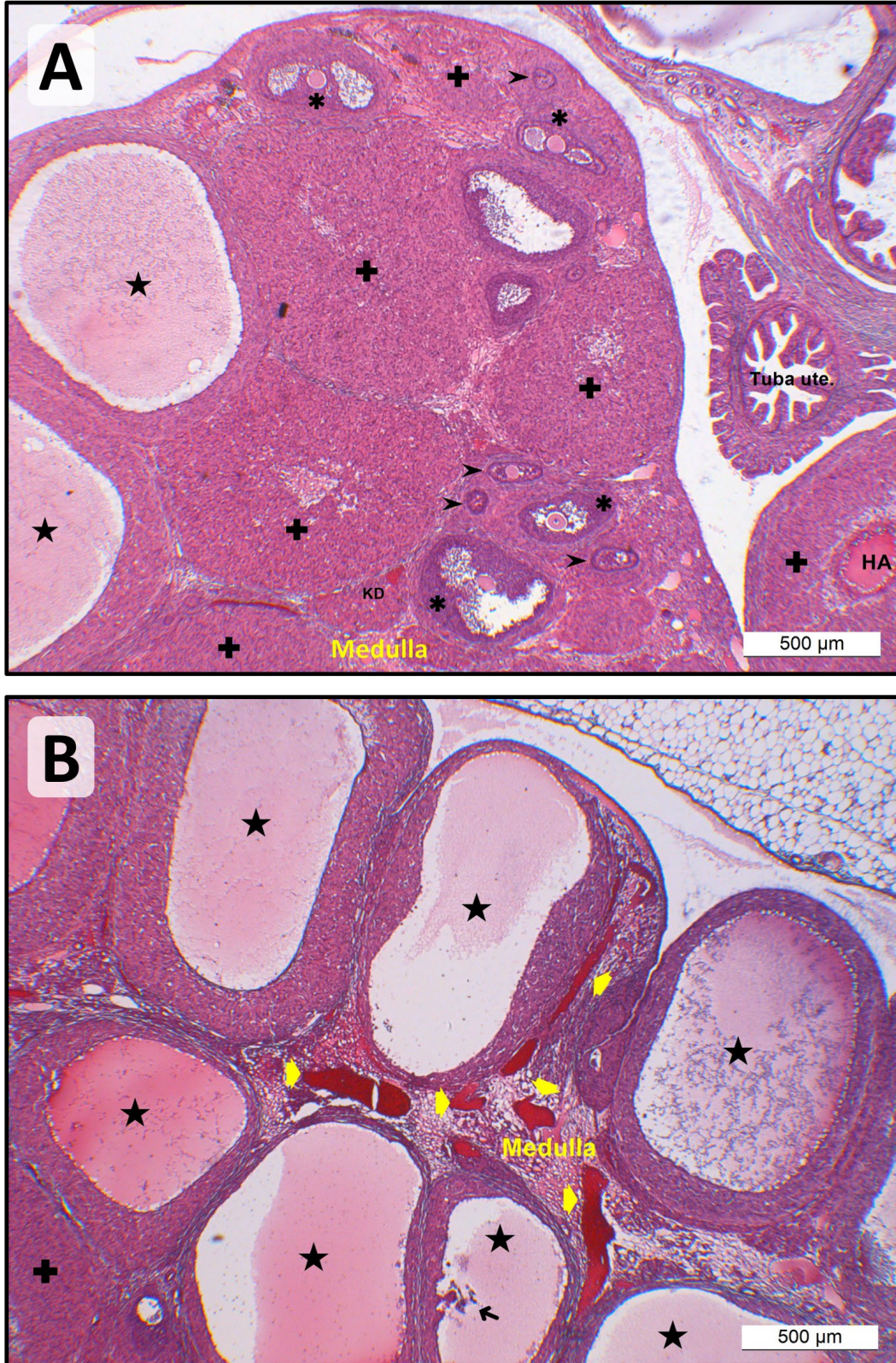
Resim 4.7. KOH grubuna ait ovaryumdaki tek katlı kübik epitel yapısındaki germinal epitel altında yerleşim gösteren primordiyal ve unilaminar primer folliküller, epitelin altındaki sıkı bağ dokusu yapısındaki t. albuginea (◆), kan damarı (◆), mitotik figürler (➡) H&E, 100x



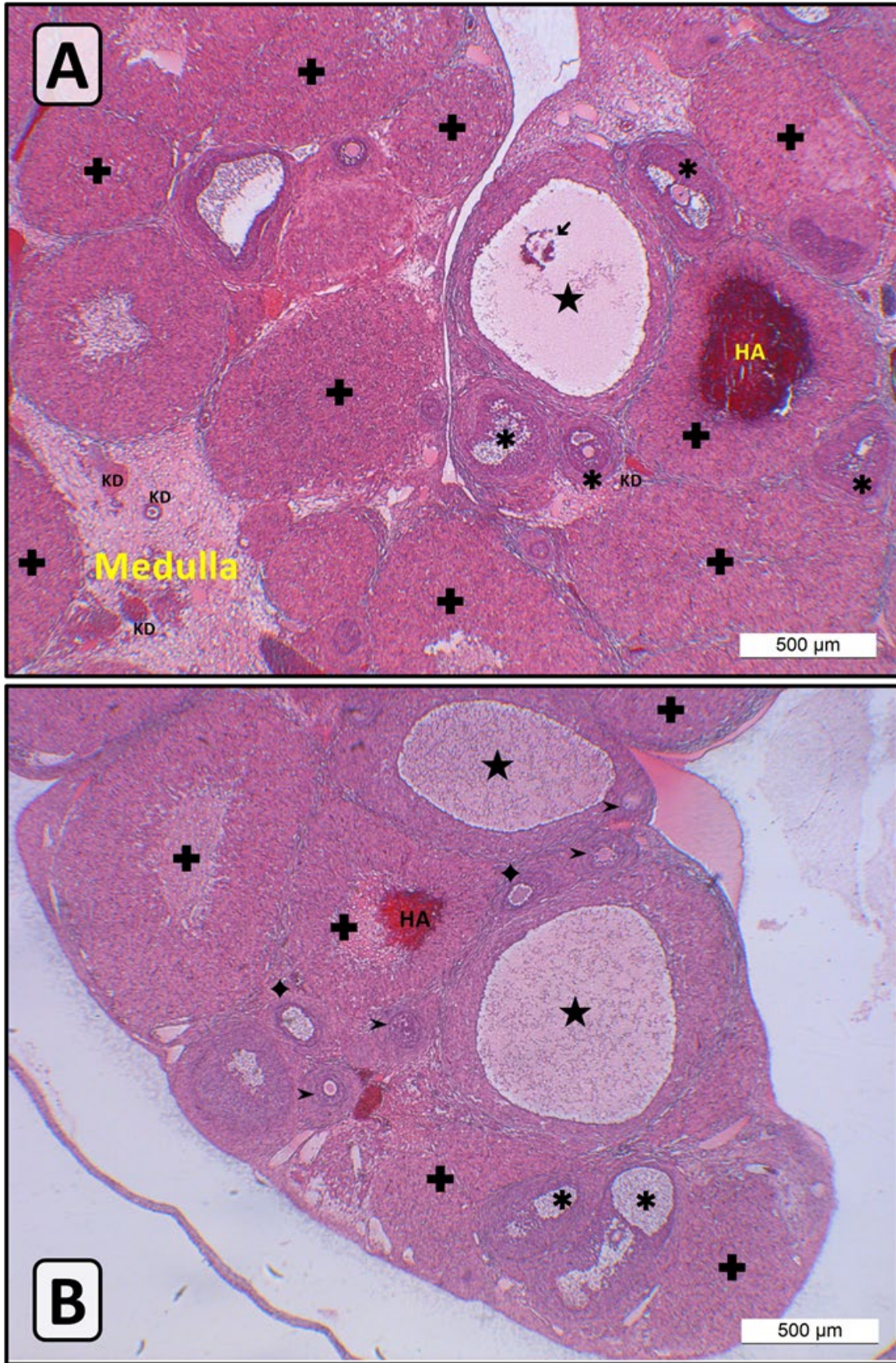
Resim 4.8. OHSS grubuna ait ovaryum dokusunu çevreleyen tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitel (◆), gelişim farklı aşamalarındaki primordiyal (▼), unilaminar primer (►) ve multi-laminar primer folliküller (*) ve korpus luteum (+) yapılarını oluşturan büyük soluk poligonal görünümlü granüloza lütein hücreleri (→) ve teka lutein hücreleri (➡), t. albuginea (◆) H&E, 200x



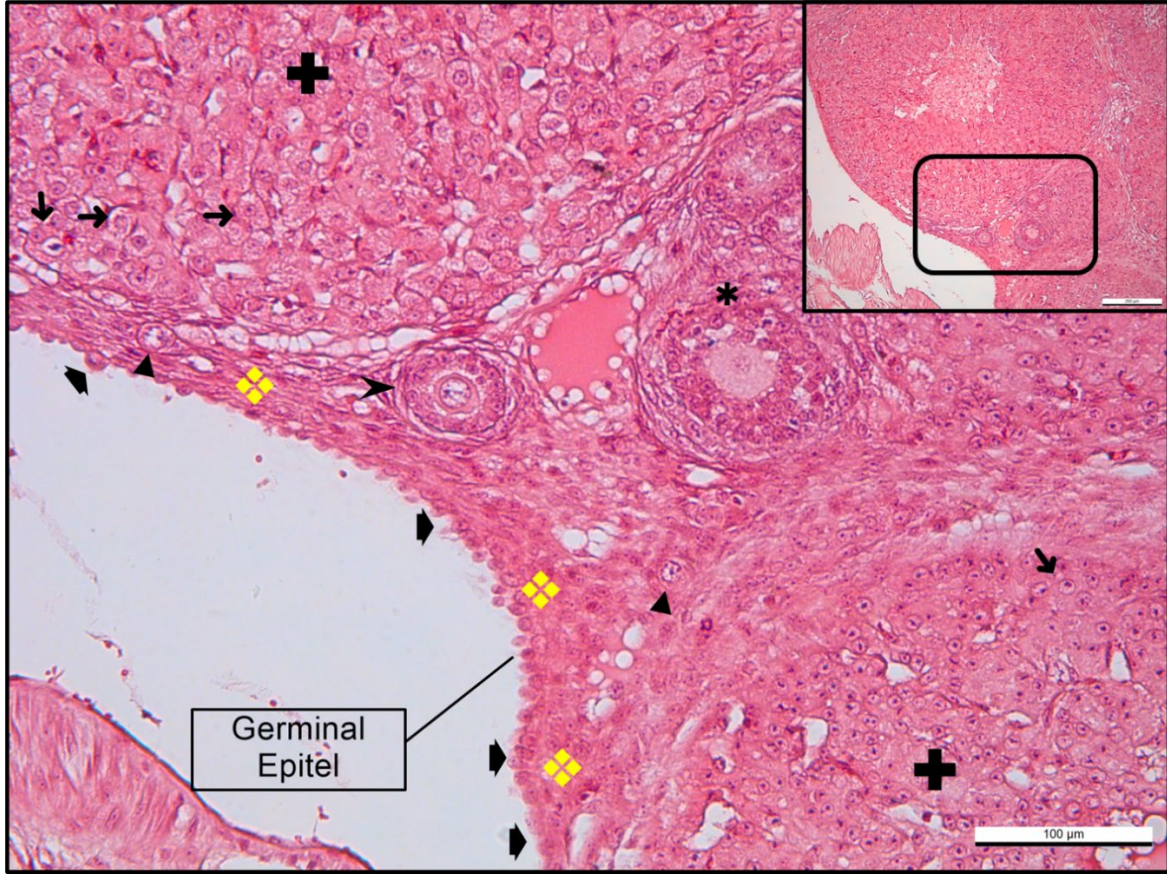
Resim 4.9. A-OHSS grubuna ait ovaryum dokusunun çok fazla sayıda kistik follikülün ve korpus luteumun olduğu genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), hemorajik alan (◆), oosit kalıntıları (→), H&E, 40x B- OHSS grubundaki kistik yapıların büyük büyütmedeki genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), oosit kalıntıları (→), follikül hücre tabakası (▶), hemorajik alan (HA), H&E, 100x



Resim 4.10. A- OHSS grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), hemorajik alan (HA), gelişmekte olan folliküller (▶), kan damarı (KD), H&E, 40x, B- OHSS grubuna ait ovaryum dokusunda çok fazla sayıda kistik yapılar (★), korpus luteum (+), hemorajik alan (▶), oosit kalıntıları (→), H&E, 40x



Resim 4.11. A, B- OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü, kistik yapılar (★), korpus luteum (+), antral follikül (*), gelişmekte olan folliküller (▶), oosit kalıntıları (→), hemorajik alan (HA), kan damarı (KD), H&E, 40x



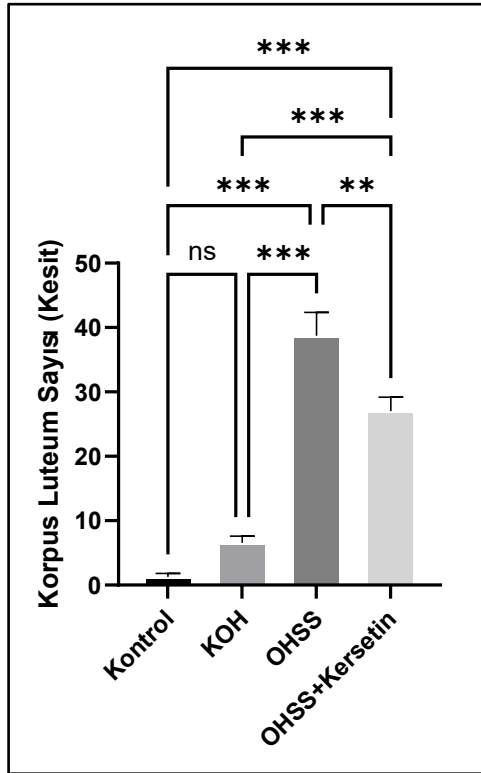
Resim 4.12. OHSS+Keratin grubuna ait ovaryum dokusunu çevreleyen tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitel (◆), gelişimin farklı aşamalarındaki primordiyal (▼), unilaminar primer (►) ve multi-laminar primer folliküller (*) ve korpus luteum (+) yapılarını oluşturan granüloza lütein hücreleri (→), t. albuginea (◇) H&E, 200x

4.4.5. Ovaryum folliküllerinin ve diğer yapılarının sayım sonuçları

Bütün deney gruplarına ait ovaryum dokusundaki primordiyal, primer erken, primer geç, antral ve atretik follikülleri ile kistik yapılar yöntemde belirtildiği gibi sayıldı. Sayım sonuçları yüzdelik olarak hesaplandı. Daha sonra bu elde edilen sonuçlar yine yöntemde açıklandığı biçimde istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.

Korpus luteum bulguları

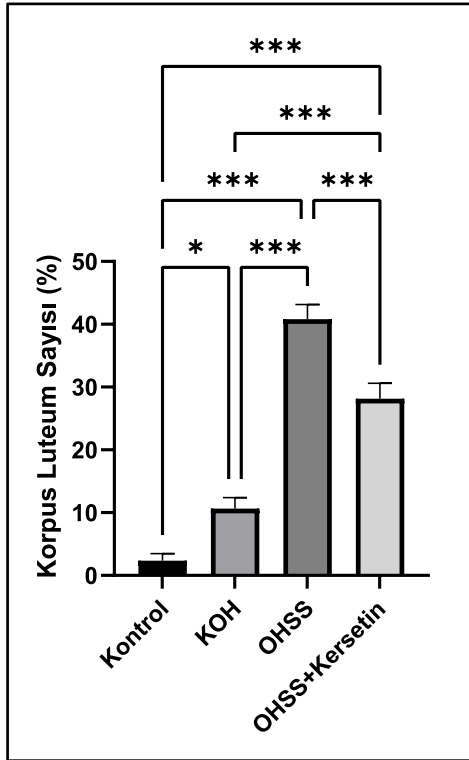
Yöntem kısmında belirtildiği gibi, korpus luteum sayılarının değerlendirilmesinde en büyük alandan geçen kesit [185] ile bütün yapılardaki korpus luteum yüzde oranı hesaplandı (Şekil 4.4-5).



Şekil 4.4. Gruplara ait en büyük kesitten geçen korpus luteum sayıları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde gruplar arasındaki fark iki incelemede de istatistiksel olarak anlamlı bulundu (ANOVA, $p < 0,001$). Tukey post hoc analizi sonuçlarına göre en düşük korpus luteum sayısı kontrol grubunda bulundu ($2,37 \pm 1,10$).

KOH grubundaki korpus sayısı kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yaklaşık 5 kat arttığı ($10,65 \pm 1,76$; $p=0,033$) gözlemlendi. En yüksek korpus sayısına OHSS model grubunda ($40,8 \pm 2,33$) rastlanırken, KOH grubuna göre anlamlı biçimde ($p<0,0001$) yaklaşık dört kat artış olduğu bulundu. Kersetin uygulanan OHSS+Kersetin grubunda ise korpus luteum oranının ($28,15 \pm 2,44$; $p=0,0008$) OHSS grubuna göre istatistiksel olarak yaklaşık yarı yarıya düştüğü saptandı. Yine bu grubun korpus sayısı oranı KOH grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak ($p<0,0001$) 2 kat artmış bulundu (Şekil 4.5, Çizelge 4.8).

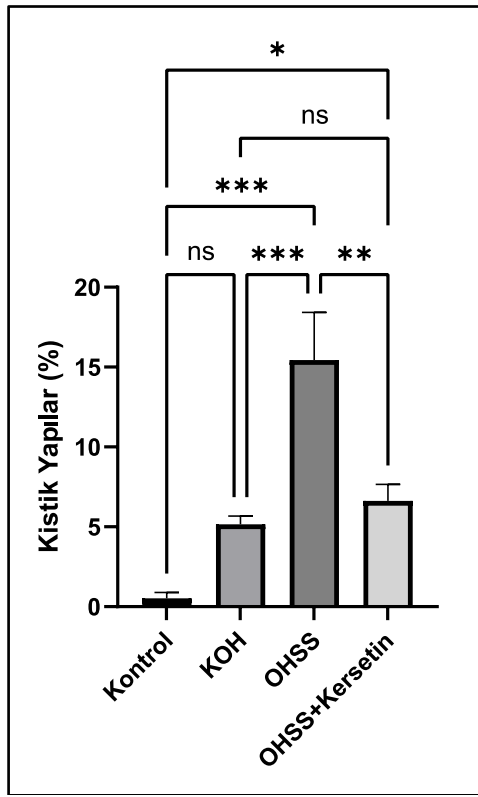


Şekil 4.5. Gruplara ait korpus luteum sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, $n=7$)

Kistik yapı bulguları

Her grupta bulunan sıçanların ovaryumlarındaki kistik yapıların sayım yüzde oran sonuçlarının analizleri yapılarak ortalamaları ve standart hata değerleri kontrol grubunda $0,52 \pm 0,38$; KOH grubunda $5,16 \pm 0,51$; OHSS grubunda $15,44 \pm 2,98$; OHSS+Kersetin grubunda $6,62 \pm 1,03$ olarak hesaplandı (Şekil 4.6, Çizelge 4.8).

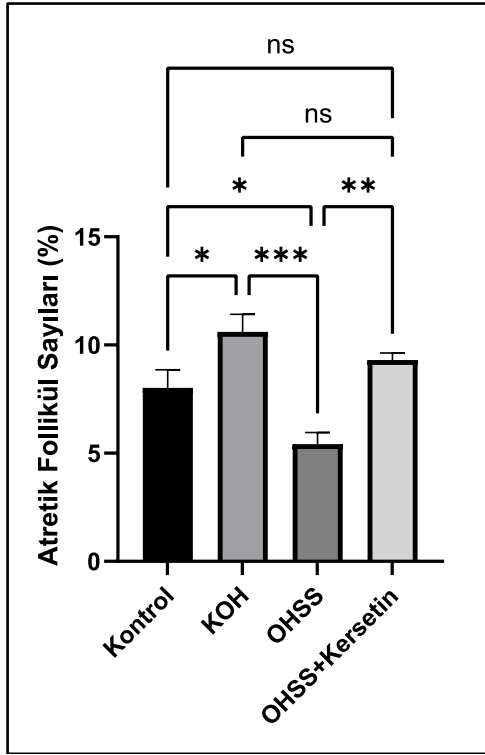
ANOVA sonuçları incelendiğinde, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). En az kistik yapıya kontrol grubunda rastlandı. Kistik yapıların, kontrole göre KOH grubunda anlamsız ($p=0,1632$) olarak yaklaşık 10 kat, Kersetin grubunda anlamlı ($p=0,0334$) 13 kat, OHSS grubunda ise anlamlı ($p<0,0001$) 30 kat artmış oldu, tespit edildi. Ayrıca en fazla kistik yapı OHSS grubunda bulunurken bu grup, Kersetin uygulanan grup ile kıyaslandığında kistik yapıların anlamlı şekilde ($p=0,0024$) yaklaşık yarıya düştüğü görüldü. OHSS+Kersetin grubunda KOH grubuna oranla kistik yapılarda artış olsa da istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,9031$) bulunmadı (Çizelge 4.8).



Şekil 4.6. Gruplara ait kistik yapıların sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, $n=7$)

Atretik follikül sayım sonuçları

Her grupta bulunan sıçanların ovaryumlarındaki atretik follikül sayım yüzde oran sonuçlarının istatistiksel analizleri yapılarak ortalamaları ve standart hata değerleri hesaplandı. Bu sonuçlara göre: kontrol grubunda $8,01\pm0,84$; KOH grubunda $10,61\pm0,81$; OHSS grubunda $5,42\pm0,54$; OHSS+Kersetin grubunda ise $9,31\pm0,33$ değerleri bulundu (Şekil 4.7, Çizelge 4.8).



Şekil 4.7. Gruplara ait atretik follikül sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

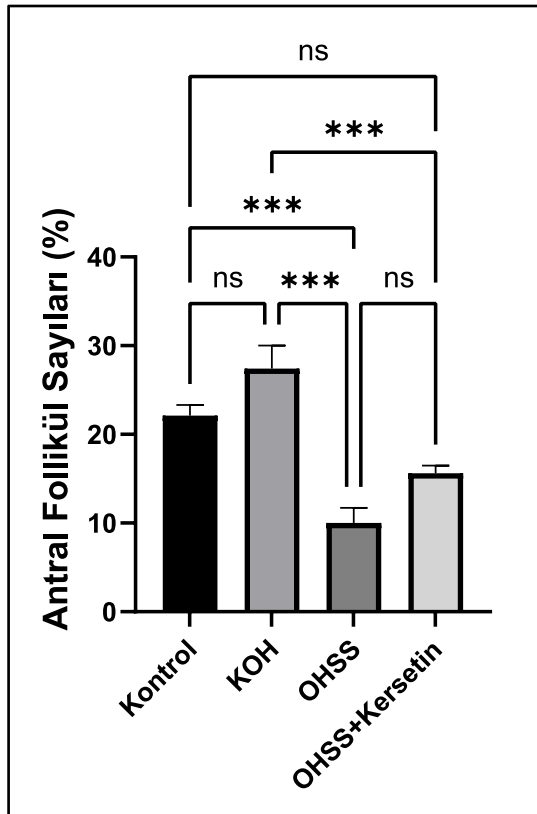
Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı (ANOVA, $p < 0,001$). En fazla atretik follikül yüzdesi KOH grubunda bulundu. Kontrol grubunda ise KOH grubu ile kıyaslandığında anlamlı ($p = 0,0492$) olarak daha az oranda atretik follikül görüldü. En az atretik follikül yüzdesine ise OHSS grubunda rastlanırken Kersetin uygulanan 4. grupta OHSS grubuna göre anlamlı ($p = 0,0019$) bir atretik follikül artışı olduğu saptandı. Tedavi grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında atretik follikül yüzdesinde artış bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0,5236$) değildi. Bunlara ek olarak OHSS+Kersetin grubunda KOH ile karşılaştırıldığında daha az atretik follikül bulunmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0,5199$) bulunmadı (Çizelge 4.8).

Antral follikül sayım sonuçları

Her gruba ait sıçanların ovaryumlarındaki Antral follikül sayım yüzde oran sonuçlarının analizleri yapılarak ortalamaları ve standart hata değerleri kontrol grubunda $22,13 \pm 1,2$;

KOH grubunda $27,42 \pm 2,58$; OHSS grubunda $10,01 \pm 1,71$; OHSS+Kersetin grubunda $15,61 \pm 0,86$ olarak hesaplandı (Şekil 4.8, Çizelge 4.8).

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü (ANOVA, $p < 0,001$). En fazla antral follikül KOH grubunda bulunurken en az OHSS grubunda tespit edildi. Bu gruplar kıyaslandığında ise anlamlı ($p < 0,0001$) bir düşüş olduğu görüldü. KOH grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında antral follikül yüzdesinde düşüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı ($p = 0,1563$). Ayrıca, OHSS+Kersetin grubunda antral follikül yüzdesi OHSS grubuna göre artmasına karşı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,1239$). Kersetin uygulaması antral follikül yüzdesini arttırmasına rağmen anlamlı bir yükseliş saptanmadı. Gonadotropin uygulanan KOH grubunda ise kontrole oranla antral follikül yüzdesi artmasına rağmen yine bu yükseliş anlamlı bulunmadı (Çizelge 4.8).



Şekil 4.8. Gruplara ait antral follikül sayım yüzde oran sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, $n=7$)

Çizelge 4.8. Gruplara ait korpus luteum, kistik yapılar, atretik ve antral follikül sayımı yüzde ortalama sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

	KONTROL	KOH	OHSS	OHSS+KERSETİN	P DEĞ.
Korpus Luteum (Kesit)	1,29 $\pm$ 0,52	6,57 $\pm$ 1,02	38,71 $\pm$ 3,64 ^{f_β}	27,00 $\pm$ 2,17 ^{f_βαα}	<0,001
Korpus Luteum (%)	2,37 $\pm$ 1,10	10,65 $\pm$ 1,76*	40,80 $\pm$ 2,328 ^{f_β}	28,15 $\pm$ 2,44 ^{f_βφ}	<0,001
Kistik Yapılar (%)	0,52 $\pm$ 0,38	5,16 $\pm$ 0,51	15,44 $\pm$ 2,98 ^{f_β}	6,62 $\pm$ 1,03* ^{αα}	<0,001
Atretik Folliküller (%)	8,01 $\pm$ 0,84	10,61 $\pm$ 0,81*	5,42 $\pm$ 0,54* ^β	9,31 $\pm$ 0,33 ^{αα}	<0,001
Antral Folliküller (%)	22,13 $\pm$ 1,20	27,42 $\pm$ 2,58	10,01 $\pm$ 1,71 ^{f_β}	15,61 $\pm$ 0,86 ^β	<0,001

Kontrol grubuna göre karşılaştırma, *p <0.05, **p <0.01, ^fp<0,001; KOH grubuna göre karşılaştırma, [†]p <0.05, ^{††}p <0.01, ^βp<0,001; OHSS grubuna göre karşılaştırma, ^αp<0.05, ^{αα}p<0.01, ^φp<0,001 (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi).

Pirmer geç follikül, primer erken follikül ve primordiyal sayım sonuçları

Her grupta bulunan sıçanların ovaryumlarındaki primer geç, primer erken ve primordiyal follikül sayım yüzde oran sonuçlarının istatistiksel analizleri yapılarak ortalamaları ve standart hata değerleri hesaplandı (Çizelge 4.9). Bütün incelemelerde gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001; Çizelge 4.9).

Primordiyal follikül oranı en fazla kontrol grubunda (31,08 $\pm$ 1,35), en az ise OHSS grubunda (9,04 $\pm$ 1,10) saptandı. Bu azalma istatistiksel olarak da anlamlıydı (p<0,0001). KOH grubunda ise primordiyal follikül oranı kontrole göre yine anlamlı düşüş gösterdi. OHSS+Kersetin grubunda (17,56 $\pm$ 1,48) ise OHSS grubuna kıyasla anlamlı (p<0,0001) olarak daha fazla oranda primordiyal follikül gözlemlendi (Çizelge 4.9).

Primer follikül oranları incelendiğinde ise hem erken (22,83 $\pm$ 1,31) hem de geç (12,97 $\pm$ 0,90) tiplerinde en fazla oranda kontrol grubunda izlendi. Bu veriler diğer gruplar ile kıyaslandığında farklar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Çizelge 4.9). OHSS+Kersetin (17,06 $\pm$ 1,41) ve KOH (14,42 $\pm$ 1,20) gruplarının primer erken verilerinde OHSS grubu (12,79 $\pm$ 0,92) ile karşılaştırıldığında artış görülse de istatistiksel olarak anlamlı

değildi ($p=0,0912$; $p=0,7845$). Benzer olarak Kersetin uygulanan grupta KOH grubuna karşı bir artış olsa da bu artış da anlamlı bulunmadı ($p= 0,4370$, Çizelge 4.9).

Bunlar ile primer geç follikül verilerine bakıldığında en az oranda OHSS+Kersetin ($5,30\pm0,81$) grubunda olduğu ve KOH grubu ($8,73\pm0,83$) ile kıyaslandığında bu oranın anlamlı ($p=0,0322$) şekilde arttığı ayrıca OHSS grubu ($7,59\pm0,74$) ile karşılaştırıldığında yine artış olsa da bunun anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p=0,2263$) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Gruplara ait primordiyal, primer erken ve primer geç follikül sayımı yüzde ortalama sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, $n=7$)

	KONTROL	KOH	OHSS	OHSS+KERSETİN	P DEĞ.
Primordiyal follikül (%)	$31,08\pm1,35$	$21,86\pm0,81^f$	$9,04\pm1,10^{f\beta}$	$17,56\pm1,48^{f\phi}$	$<0,001$
Primer erken follikül (%)	$22,83\pm1,31$	$14,42\pm1,20^f$	$12,79\pm0,92^f$	$17,06\pm1,41^*$	$<0,001$
Primer geç follikül (%)	$12,97\pm0,90$	$8,73\pm0,83^{**}$	$7,59\pm0,74^f$	$5,30\pm0,81^{f+}$	$<0,001$

Kontrol grubuna göre karşılaştırma, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $^f p < 0.001$; KOH grubuna göre karşılaştırma, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $^{\beta} p < 0.001$; OHSS grubuna göre karşılaştırma, $^{\alpha} p < 0.05$, $^{\alpha\alpha} p < 0.01$, $^{\phi} p < 0.001$ (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi).

4.5. İmmünohistokimya Değerlendirme Sonuçları

Yöntemde belirtildiği gibi VEGFA ve VEGFR-2 proteinlerinin ekspresyonları immünohistokimyasal olarak boyanarak semikantitatif olarak değerlendirildi.

4.5.1. VEGFA immünoreaktivitesinin değerlendirilmesi

Kontrol grubundaki ovaryum kesitlerinde kortekste bulunan farklı gelişim aşamalarındaki ovaryum folliküllerinin bazılarında granüloza hücrelerinde zayıf, teka hücrelerinde ve stromadaki hücrelerde yer, yer orta derecede VEGF-A immünreaktivitesi izlendi (Resim 4.13).

KOH grubunda kontrol grubuna göre ovaryum dokusuna ait kesitlerde VEGF-A immünreaktivitesinin genel olarak artmış olduğu, özellikle kan damarlarının endotel hücrelerinde ve duvarında kuvvetli pozitif immünreaktivitenin olması dikkati çekti.

Stromada, folliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde VEGF-A immünreaktivitesi ise orta derecede izlendi (Resim 4.14)

Ovarian hiperstimülasyon oluşturulmuş ovaryum dokusuna ait kesitlerde, ovaryum dokusunda kontrol ve KOH grubuna göre artmış bir VEGF-A immünreaktivitesi dikkat çekti. Korpus luteuma ait granüloza lutein, teka lutein hücrelerinde, kistik oluşumların duvarındaki hücrelerde, kan damarlarında kuvvetli VEGF-A immünreaktivitesi izlendi (Resim 4.15).

OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, korpus luteumdaki hücrelerde ve granüloza hücrelerinde, KOH ve OHSS grubuna göre daha zayıf VEGF-A immünreaktivitesi dikkati çekti (Resim 4.16). Genel olarak KOH ve OHSS gruplarına göre bu grupta VEGF-A immünreaktivitesi azalmıştı.

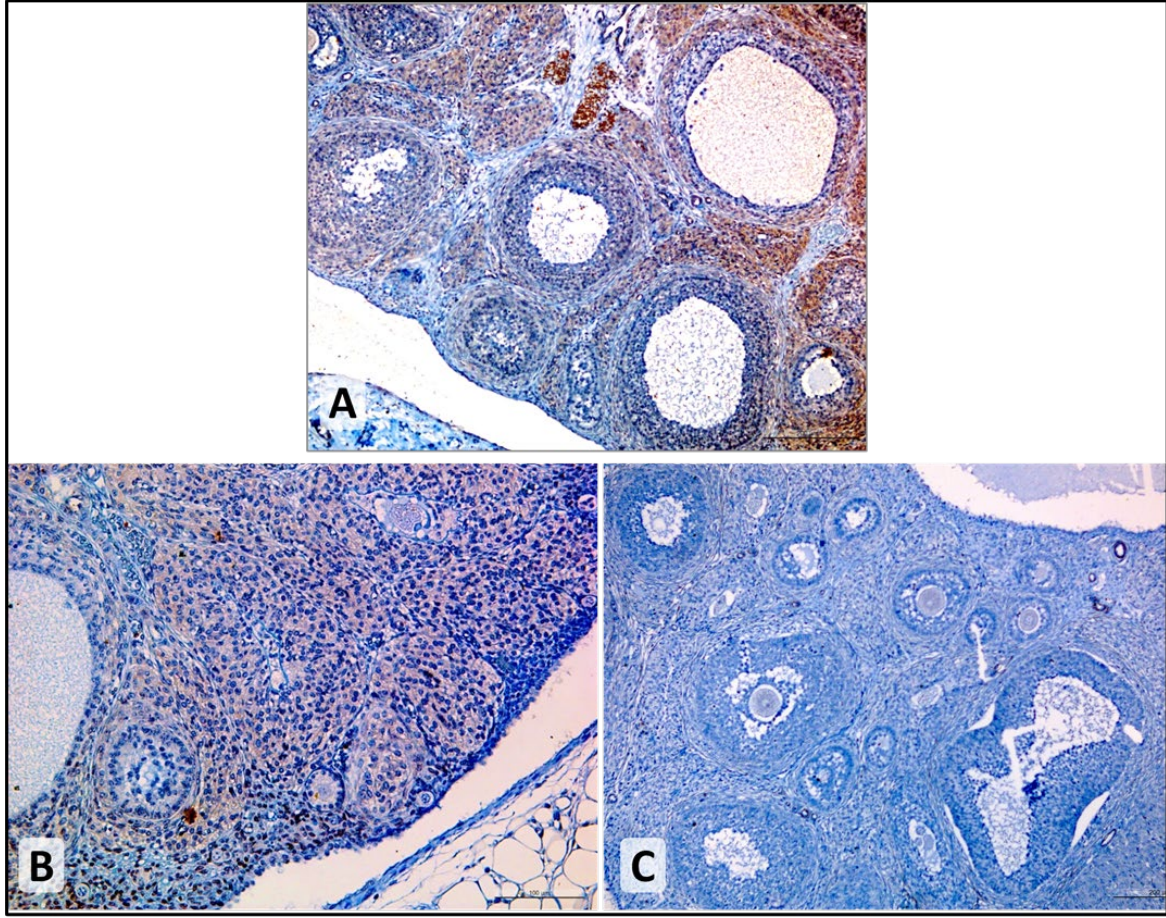
4.5.2. VEGFR-2 immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, gelişimin değişik aşamalarındaki folliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde orta derecede VEGFR-2 immünreaktivitesi gözlemlendi (Resim 4.17).

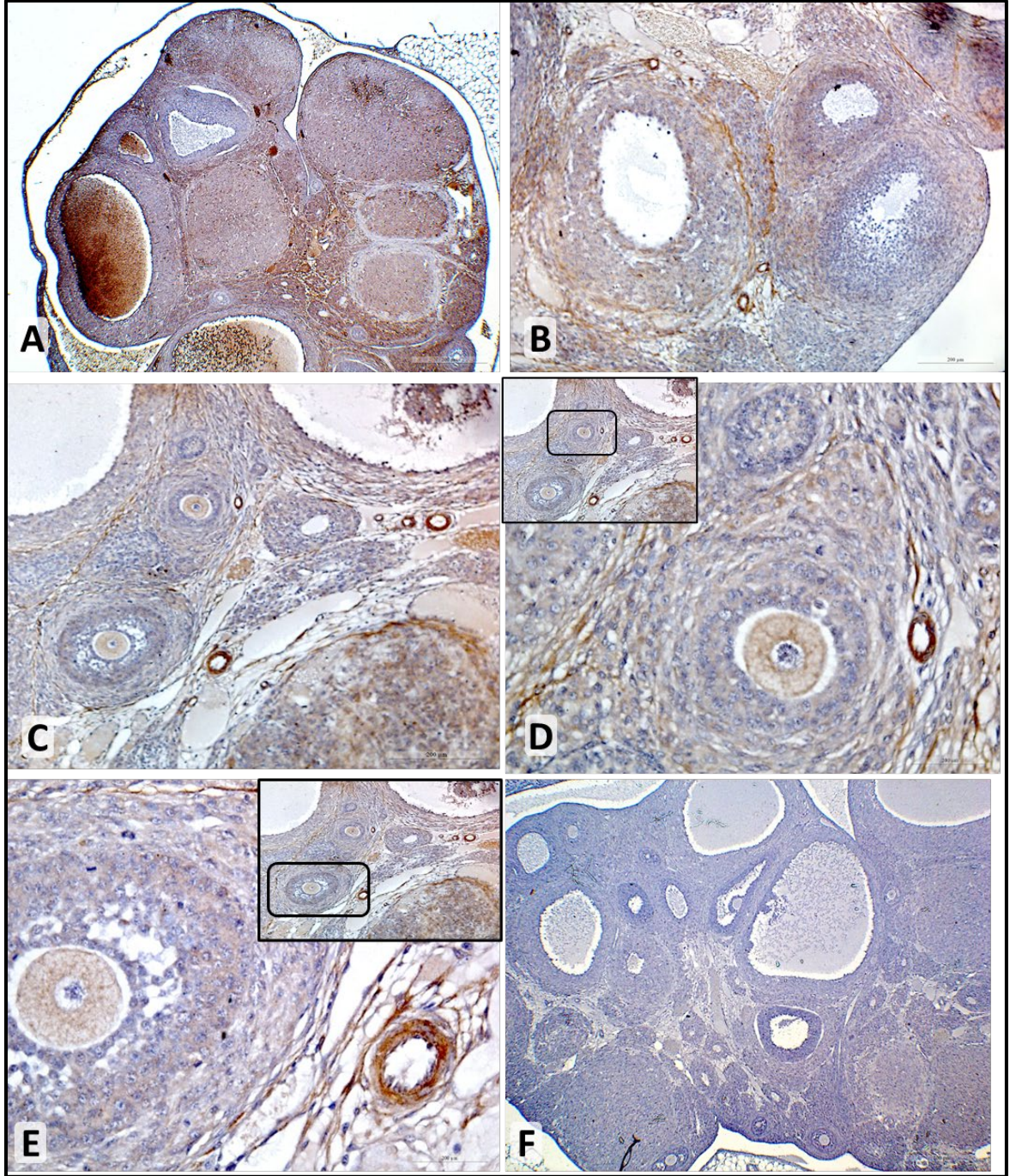
KOH grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde değişik gelişim aşamalarındaki folliküllerin teka hücrelerinde, korpus luteum yapısındaki granüloza-lütein, teka-lütein hücrelerinde orta derecede, medulla bölgesindeki kan damarlarında kuvvetli VEGFR-2 immünreaktivitesi görüldü (Resim 4.18).

OHSS grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde genel olarak kontrol ve KOH gruplarına göre artmış VEGFR-2 immünreaktivitesi görüldü. Medulladaki kan damarlarında, korpus luteumdaki granüloza-lutein, teka lutein hücrelerinde kuvvetli VEGFR-2 immünreaktivitesi saptandı (Resim 4.19).

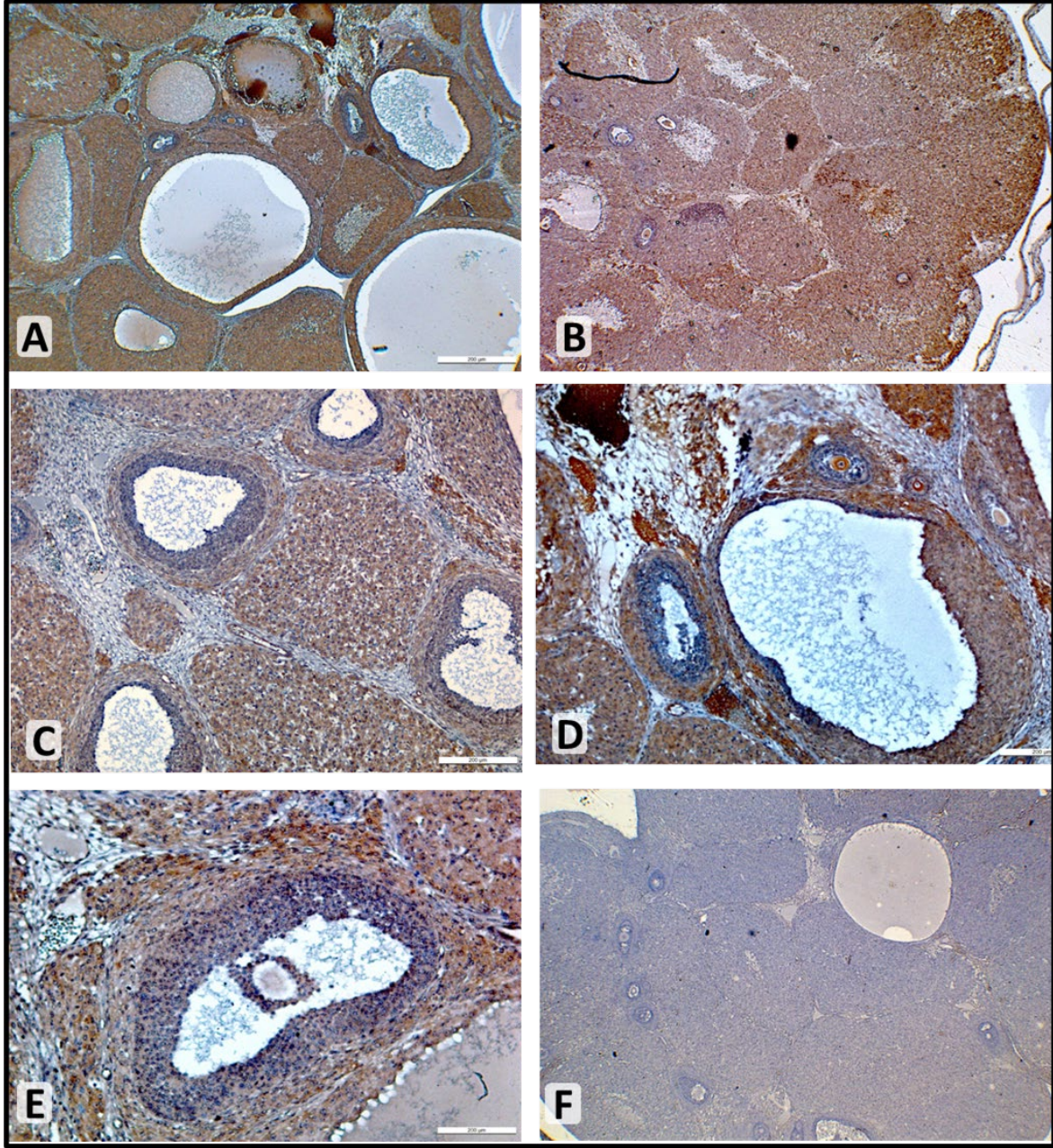
OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum kesitlerinde, OHSS grubuna göre granüloza-lütein, teka-lütein hücrelerinde, kan damarlarında azalmış bir immünreaktivite dikkati çekti (Resim 4.20).



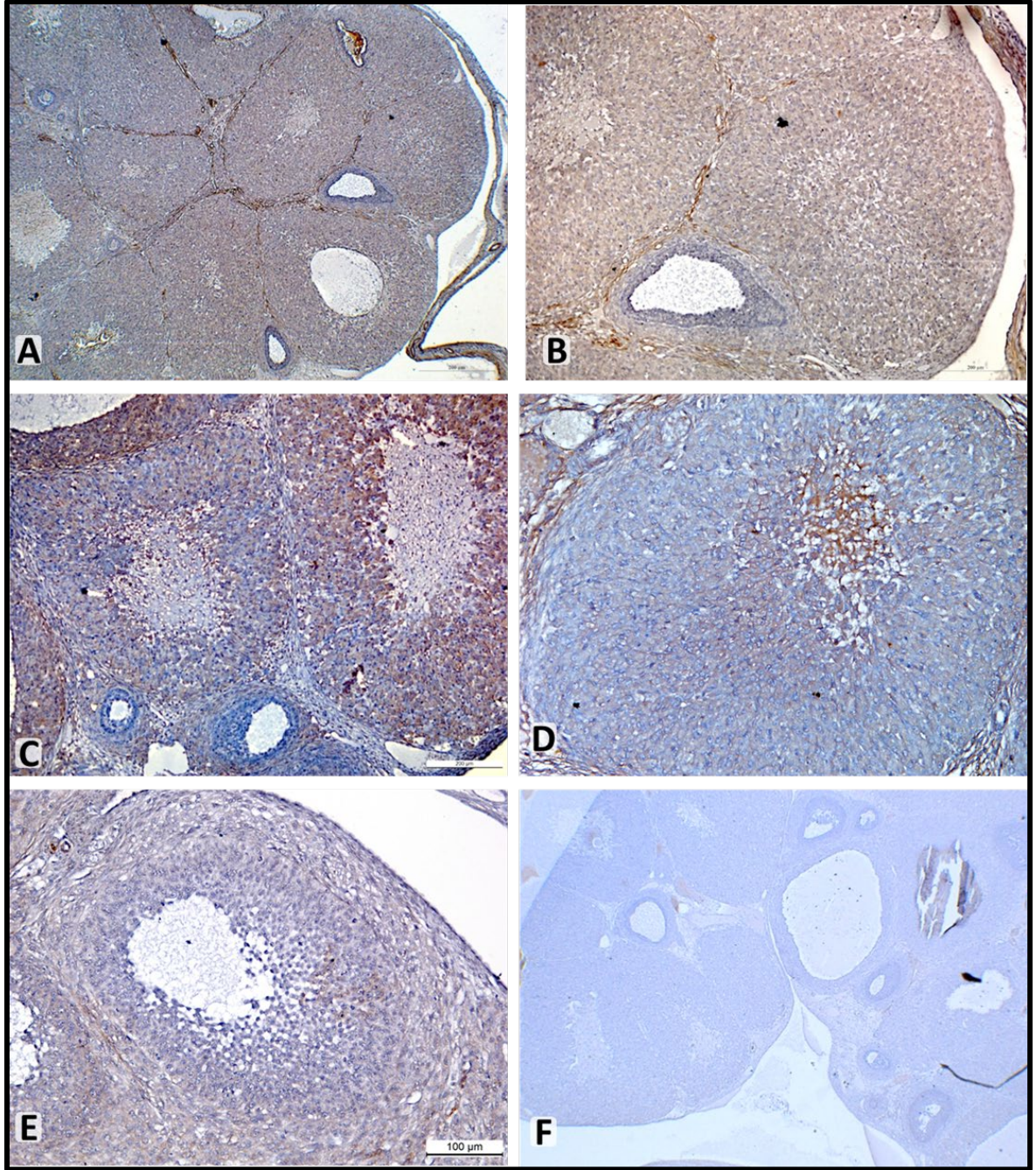
Resim 4.13. A-B Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda folliküllere ait granüloza hücrelerinde zayıf, teka hücreleri ve stromadaki hücrelerde yer, yer lokalize orta derecede VEGFA immünoreaktivitesi görülmekte 100x, 200x, C- negatif kontrol 100x, DAB-Hematoksilen



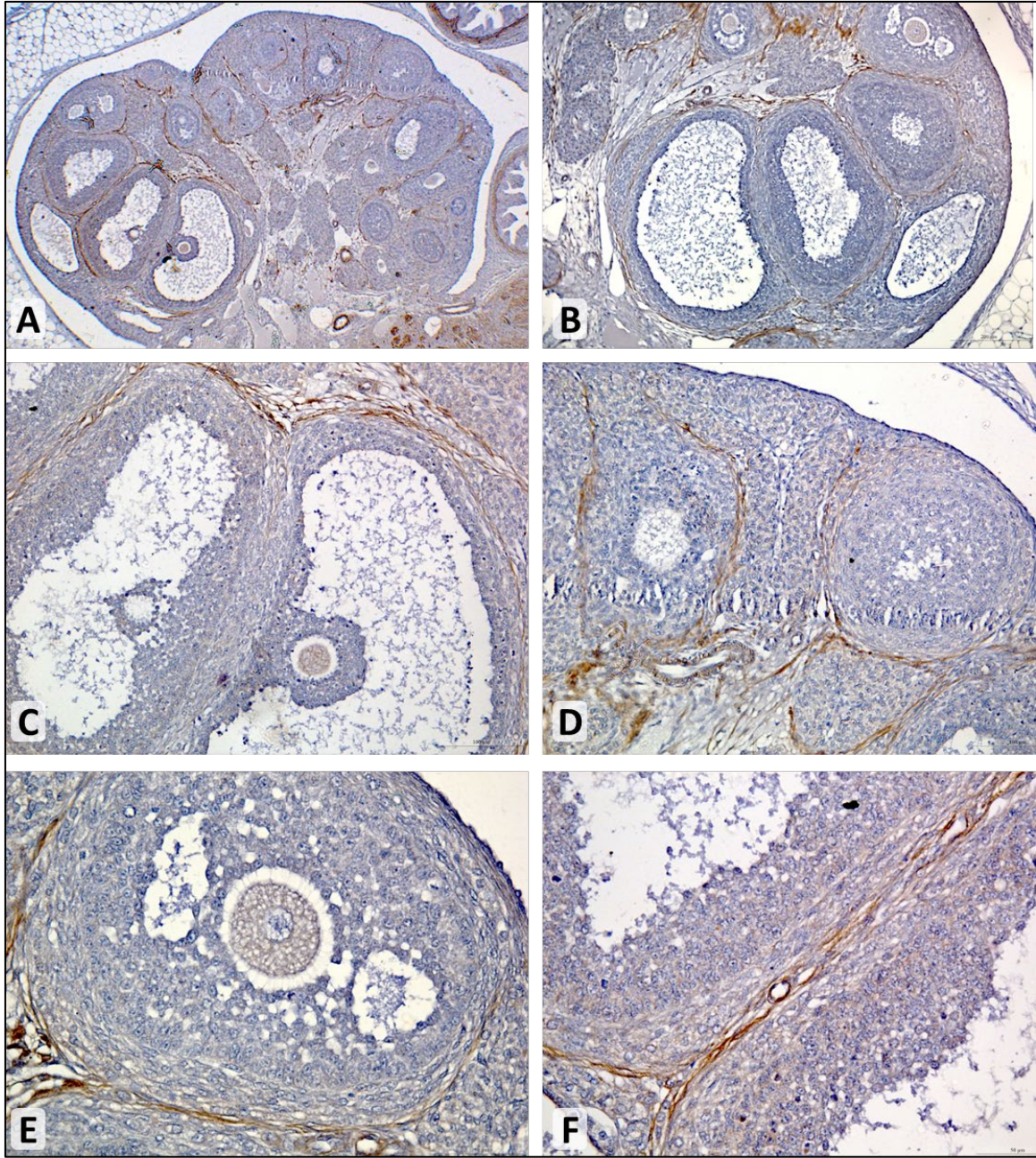
Resim 4.14. A-E, KOH grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, kontrol grubuna göre artmış VEGFA immünoreaktivitesi, kan damarlarında kuvvetli immüno reaktivite dikkati çekmekte, A- çeşitli evrelerdeki folliküller, korpus luteum ve kistik yapı, 40x, B- antral folliküller ve kistik yapı, 100x, C- farklı evrelerdeki folliküller ve kistik yapılar, kan damarları 100x, D- multilaminar primer follikül, 200x, E- antral follikül, 200x, F- negatif kontrol, 40x, DAB-Hematoksilen



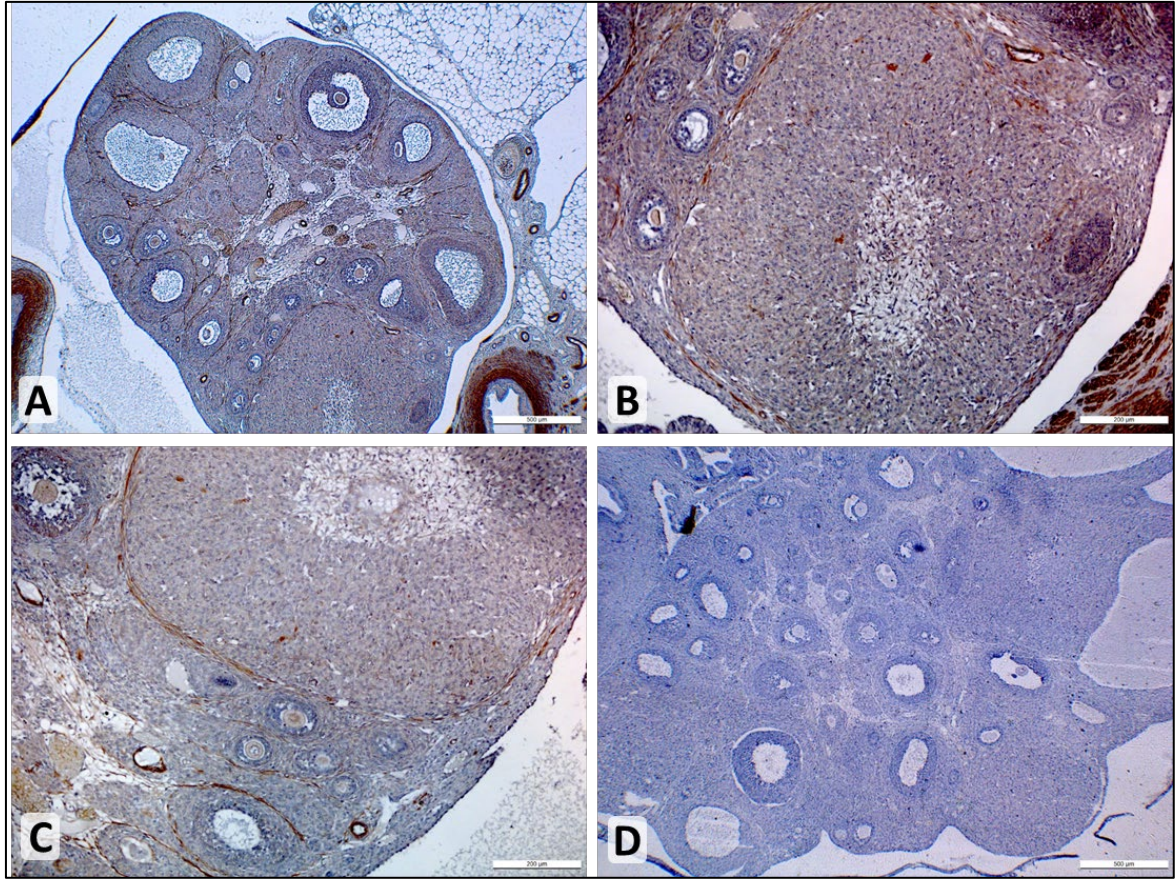
Resim 4.15. OHSS grubuna ait ovaryum kesitlerinde kontrol ve KOH grubuna göre artmış, kuvvetli VEGFA immünreaktivitesi izlenmekte, A, B- genel görüntü, 40x, C- çeşitli evrelerdeki folliküller ve korpus luteum yapıları, 100x, D- kistik yapı ve gelişim aşamasındaki folliküller, 100x, E-olgun follikül, 200x, F- negatif kontrol 40x, DAB-Hematoksilen



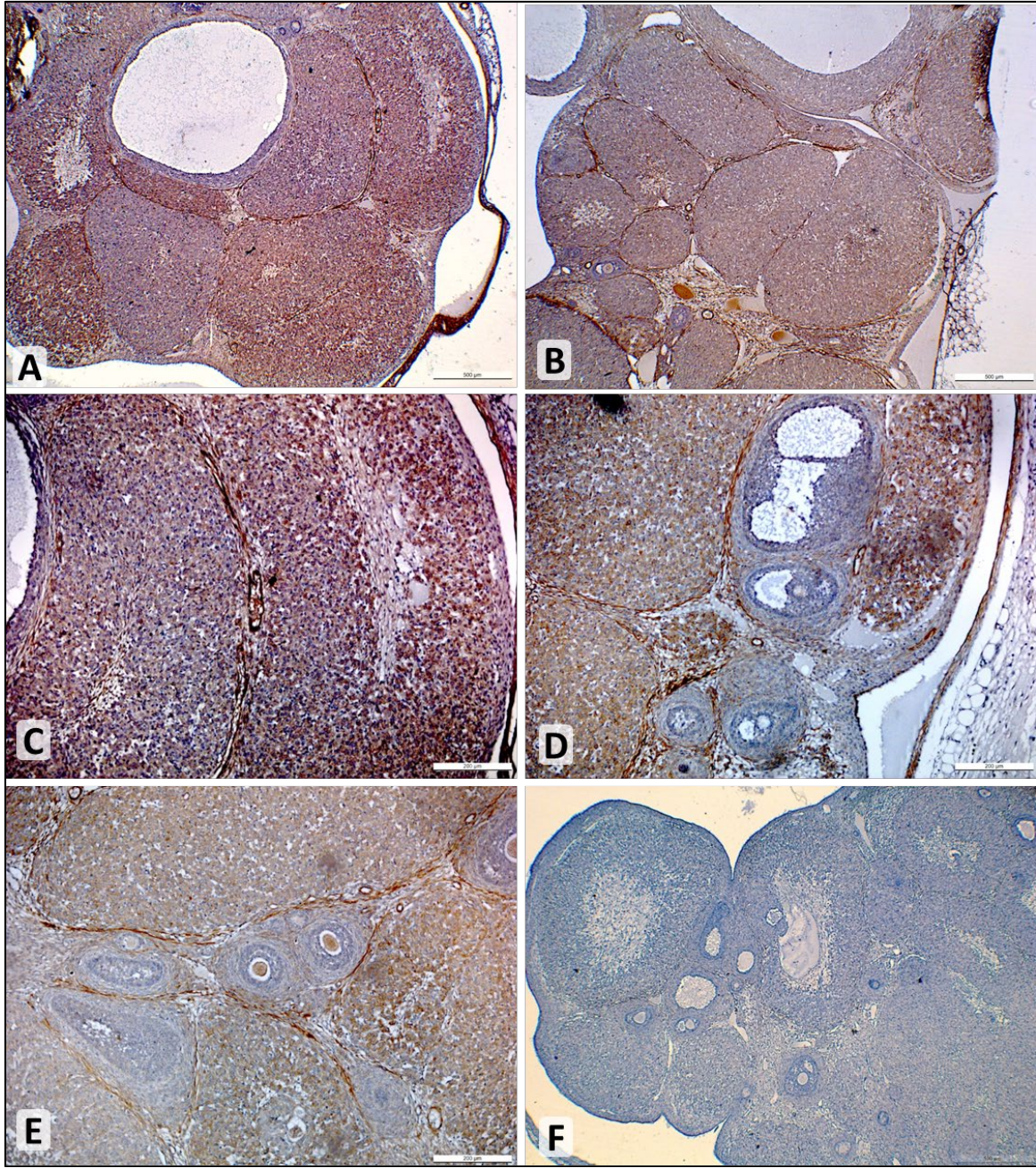
Resim 4.16. OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, korpus luteum granüloza hücrelerinde zayıf VEGFA immünoreaktivite dikkati çekmekte A- çeşitli evrelerdeki folliküller ve stroma (40x), B-olgun follikül ve korpus luteum yapıları (100x), C-çeşitli folliküller ve korpus luteum yapıları, D- korpus luteum, 200x, E- olgun follikül, 200x F- negatif kontrol (40x), DAB-Hematoksilen



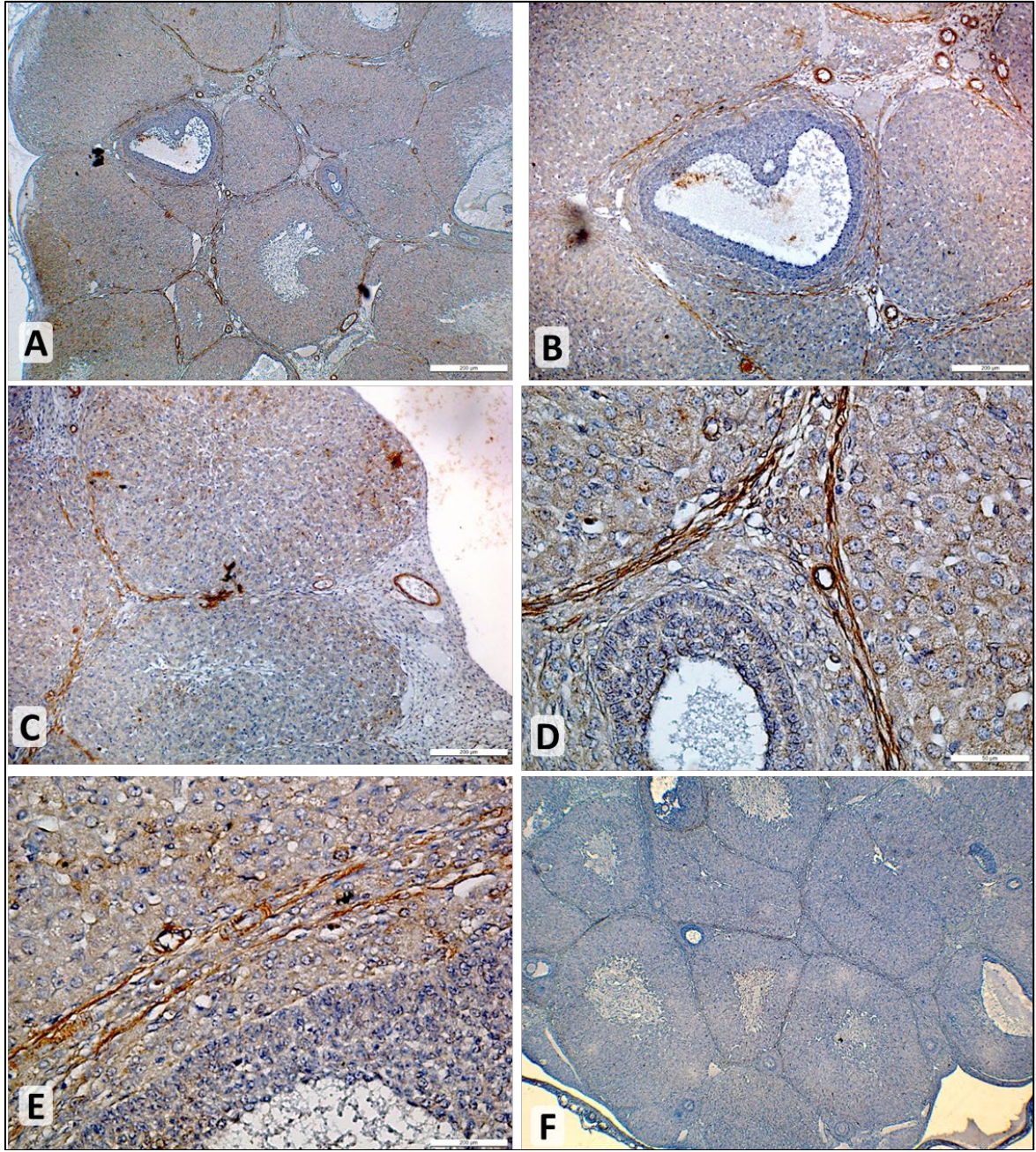
Resim 4.17. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda gelişimin değişik aşamalarındaki granüloza, teka hücrelerinde ve arterlerde VEGFR-2 immünreaktivitesi gözlenmekte



Resim 4.18. A, C- KOH grubuna ait ovaryum dokusunda değişik gelişim aşamalarındaki folliküllerini teka hücrelerinde, korpus luteumdaki granüloza lutein, teka lutein hücrelerinde orta derecede kan damarlarında kuvvetli VEGFR-2 immün reaktivitesi görülmekte, D- negatif kontrol, 40x, DAB-Hematoksilen



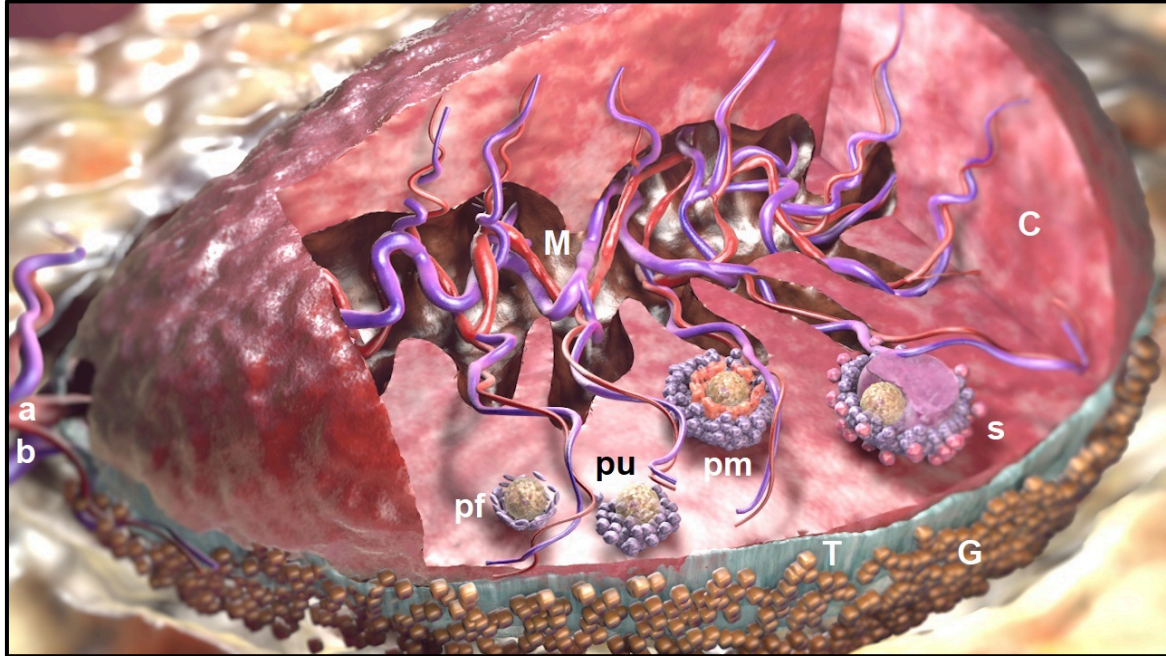
Resim 4.19. OHSS grubuna ait ovaryum dokusunda korpus luteumdaki, granüloza lutein, teka lutein hücrelerinde kan damarlarında kuvvetli VEGFR-2 immünoreaktivitesi görülmekte, A, B- kistik yapı ve korpus luteum yapıları ve folliküller ve stroma 40x, C-korpus luteum 200x, D, E- korpus luteum ve çeşitli folliküller yapıları, 100x, F- negatif kontrol 40x, DAB-Hematoksilen



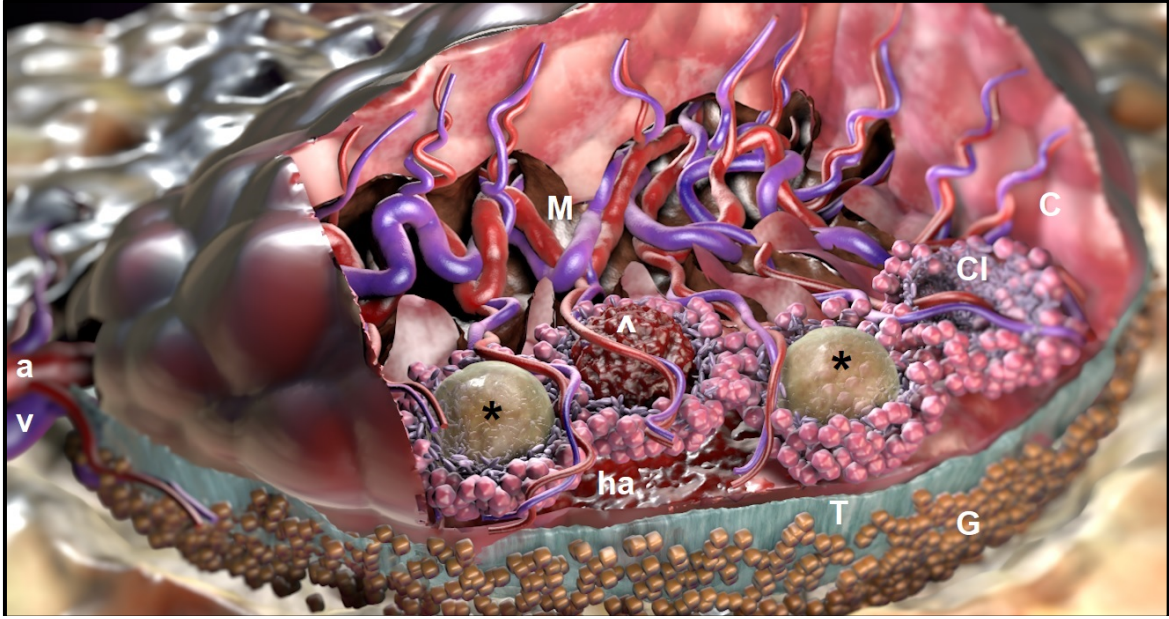
Resim 4.20. OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum kesitlerinde, OHSS grubuna göre teka-lutein, granüloza-lütein hücrelerinde, kan damarlarında azalmış VEGFR-2 immünoaktivitesi görülmekte, A- çeşitli evrelerdeki folliküller, korpus luteum yapıları, 100x, B- olgun follikül ve korpus luteum yapıları C-korpus luteum 100x, D, follikül ve kan damarı, 200x E- olgun follikül ve kan damarı, 200x, F- negatif kontrol, 40x, DAB-Hematoksilen

4.6. Histolojik Bulguların Üç Boyutlu Modellenmesi

Yöntemde belirtildiği gibi histolojik verilerden elde edilen sonuçlara göre kontrol ve ovarian hipersitimülasyon guruplarına ait ovaryum dokularının üç boyutlu modellenmesi yapıldı.



Resim 4.21. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunun üç boyutlu modellenmesi, medulla (M), tunika albuginea (T), germinal epitel (G), korteks (C), primordiyal epitel (pf), uni-laminar primer follikül (pu), multi-laminar primer follikül (pm), antral follikül (s), arteria ovarica (a), vena ovarica (b)

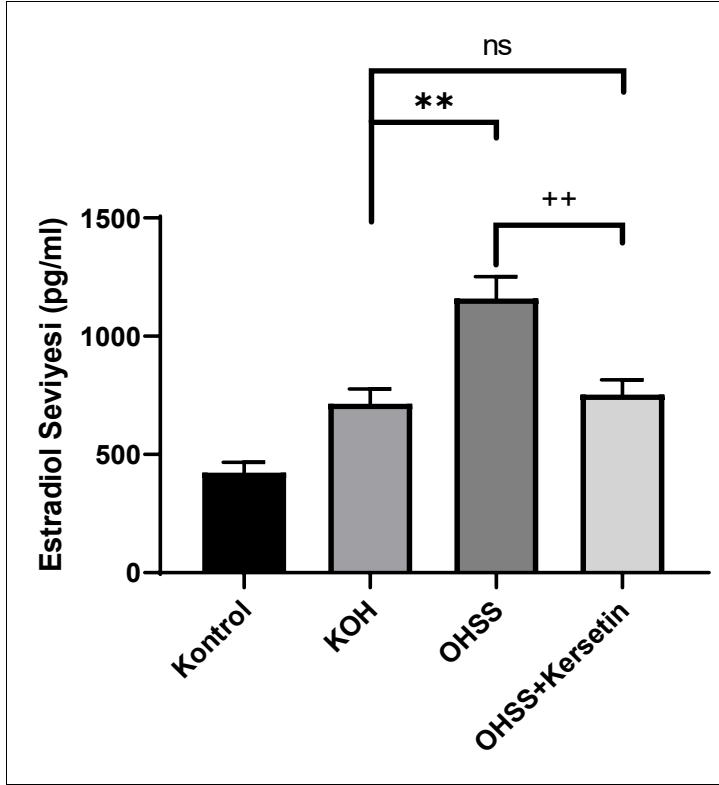


Resim 4.22. OHSS grubuna ait ovaryum dokusunun üç boyutlu modellemesi, medulla (M), hemorajik alan (ha), tunika albuginea (T), germinal epitel (G), korpus luteum (CL), korteks (C), kistik yapı (*), hemorajik kist (^), arteria ovarica (a), vena ovarica (v)

4.7. ELISA Bulguları

4.7.1. Serum Estradiol (E2) ölçüm sonuçları

Serum örnekleri kullanılarak E2 hormonunun kantitatif ölçümleri ve elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yöntemde belirtildiği şekilde yapıldı. Bu sonuçlara göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu bulundu ($p < 0,001$). En yüksek E2 değerleri OHSS model grubunda ($1159 \pm 92,53$) tespit edilirken en küçük E2 değerleri ise kontrol grubunda ($423,4 \pm 43,14$) bulundu (Kontrol-OHSS, $p < 0,001$). KOH ($714,8 \pm 61,49$) ve OHSS+Kersetin ($752,5 \pm 63,10$) gruplarının E2 değerleri ise birbirlerine yakın olarak hesaplandı (KOH-OHSS+Kersetin, $p = 0,9781$). Bunlarla birlikte Kersetin uygulamasının E2 değerini OHSS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p = 0,0052$) bir şekilde düşürdüğü saptandı (Şekil 4.11, Çizelge 4.12).

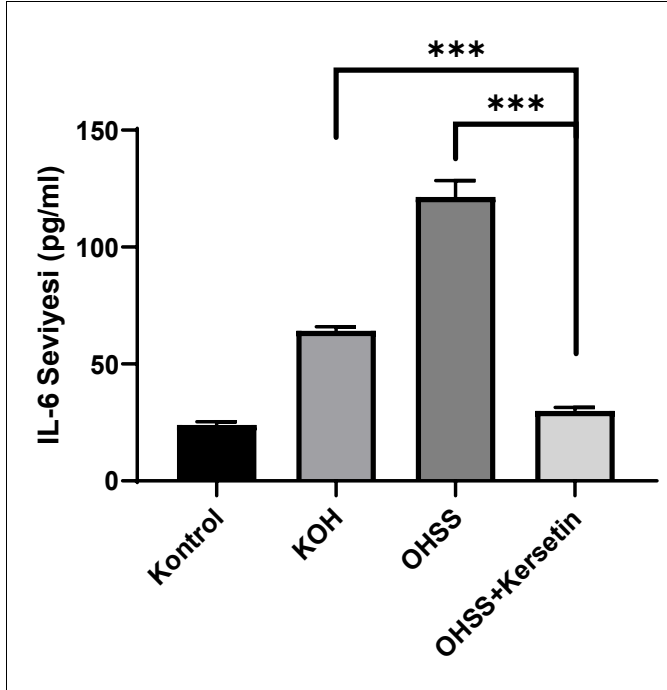


Şekil 4.9. Gruplara ait E2 ELISA analiz sonucu (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7. ** $p<0,01$, ns: anlamsız, KOH grubuna göre; ++ $p<0,01$, OHSS grubuna göre (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi)

4.7.2. Periton sıvındaki IL-6 ve VEGFA ölçüm sonuçları

IL-6 sonuçları

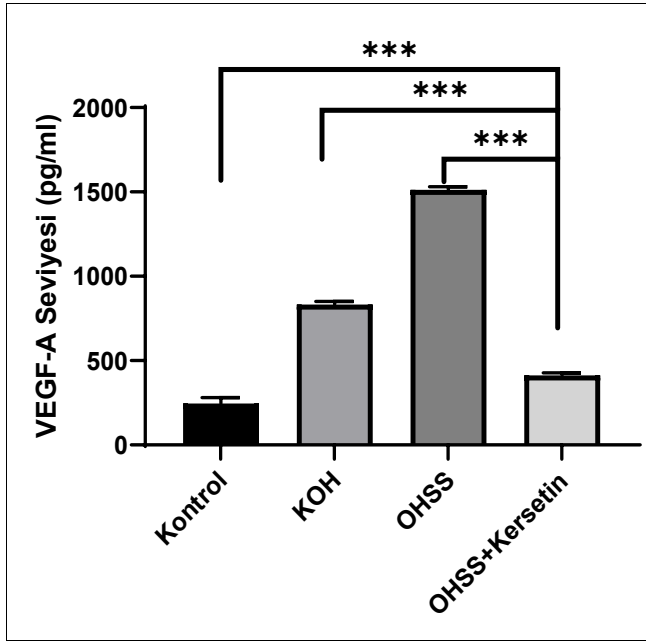
Periton sıvısı örnekleri kullanılarak IL-6 kantitatif ölçümleri ve elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yöntemde belirtildiği şekilde yapıldı. Bu analizler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu bulundu ($p<0,001$). En düşük IL-6 seviyesi kontrol grubunda bulunurken ($23,94\pm1,37$), KOH grubunda IL-6 seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) şekilde 3 kat ($64,21\pm1,78$), OHSS grubunda ise bu seviye yine kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) şekilde 6 kat ($121,5\pm6,70$) daha yüksek bulundu (Şekil 4.12). Kersetin uygulanan 4. grubun IL-6 seviyesi ise kontrole yakın ($29,94\pm1,53$) ölçülürken ($p=0,676$), KOH grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde 2 kat, OHSS grubu ile karşılaştırıldığında ise yine anlamlı ($p<0,001$) olarak 3 kat daha düşük olarak ölçüldü (Şekil 4.12, Çizelge 4.10).



Şekil 4.10. Gruplara ait IL-6 ELISA analiz sonucu (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, $n=7$, *** $p<0,001$, ns: anlamsız (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi))

VEGFA sonuçları

Periton sıvısı örnekleri kullanılarak VEGFA kantitatif ölçümleri ve elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yöntemde belirtildiği şekilde yapıldı. Bu sonuçlara göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Periton sıvısındaki en düşük VEGFA seviyesi kontrol grubunda ölçüldü ($246,0\pm35,42$). KOH grubunda ise bu seviye anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde yaklaşık olarak 2 kat ($832,7\pm18,66$) artarken, OHSS grubunda ise bu artışın anlamlı ($p<0,001$) olarak 6 kata ($1512,0\pm18,69$) kadar çıktığı tespit edildi (Şekil 4.13). OHSS+Kersetin adlı tedavi grubunda ise periton sıvısındaki VEGF seviyesi ($412,4\pm15,67$) KOH ve OHSS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde KOH grubundan 2 ve OHSS grubundan 3,5 kat daha düşük ölçülürken kontrol grubuna göre yine anlamlı ($p=0,0007$) olarak daha yüksek bulundu (Şekil 4.13, Çizelge 4.10).



Şekil 4.11. Gruplara ait VEGFA ELISA analiz sonucu (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7, ***p<0,001, ns: anlamsız (Tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey testi))

Çizelge 4.10. Gruplara ait E2, IL-6 ve VEGFA için ELISA analizi sonuçları (veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir, n=7)

Gruplar	Yapılan ELISA Analizleri		
	E2	IL-6	VEGFA
Grup 1: Kontrol	423,40 $\pm$ 43,14	23,94 $\pm$ 1,37	246,00 $\pm$ 35,42
Grup 2: KOH	714,80 $\pm$ 61,49	64,21 $\pm$ 1,78	832,70 $\pm$ 18,66
Grup 3: OHSS	1159,00 $\pm$ 92,53	121,50 $\pm$ 6,99	1512,00 $\pm$ 18,69
Grup 4: OHSS+Kersetin	752,50 $\pm$ 63,10	29,94 $\pm$ 1,53	412,40 $\pm$ 15,67
P Değerleri (ANOVA)	<0,001	<0,001	<0,001

5. TARTIŞMA

Dişi üremesi, ergenlik, ovaryan follikül gelişimi, ovulasyon, luteinizasyon, döllenme, implantasyon, gebelik, doğum ve menapoz dönemlerini içeren ve endokrin sistem tarafından kontrol edilen son derece dinamik değişimler içermektedir [190]. Bu karmaşık süreç içinde çeşitli dişi üreme sorunları da ortaya çıkabilmektedir. Bu işlev bozuklukları da 12 ay veya daha fazla zaman boyunca korunmasız cinsel ilişki veya terapötik donör inseminasyonu sonrasında başarılı bir gebeliğin sağlanamaması ile tanımlanan kadın infertilitesine yol açabilmektedir [76]. Dünya verilerine göre kadınlarda infertilite prevalansı yaklaşık %13 civarlarındadır ve bu oranda yaşla birlikte artış gözlemlenmektedir [77]. Bu infertilite sorunlarının çözümü için ovulasyon indüksiyonu, intrauterin inseminasyon ve oositlerin vücut dışında doğrudan manipülasyonunu içeren tekniklerin kullanıldığı yardımcı üreme teknikleri (YÜT) gibi çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmiştir [82]. Bu tekniklerin başında gelen in vitro fertilizasyon (IVF), YÜT'nin ilk ve hala en yaygın kullanılan türüdür. IVF uygulaması, dışarıdan gonadotropinler verilerek kontrollü over hiperstimülasyonu ile başlatılır [83]. KOH ile ovaryumdaki döngü kontrol altına alınarak doğal bir döngüden elde edilenden daha fazla sayıda uygun oosit elde edilebilir. Böylece tüm IVF süreci daha verimli hale gelir [84]. Fakat herhangi bir infertilite tedavisinde uygulanan bu ovaryan stimülasyon tekniği daha yüksek gebelik şansı sağlarken, çoklu gebelik ve OHSS gibi büyük yan etkilere de neden olabilmektedir [84].

OHSS ovaryumun medikal manipülasyonu sonucu ortaya çıkan en ciddi komplikasyondur [93]. Tam ovulasyon indüksiyonuna ihtiyaç duyan gebe kalmak isteyen ovüle olamayan hastalarda ve belli sayıda oosit alımının istendiği YÜT uygulanan kadınlarda KOH esnasında görülür. Bu nedenle, OHSS, infertilite tedavilerinin bir sonucu olarak genç sağlıklı bireyleri etkileyen, iatrojenik bir durumdur [93].

OHSS, abdominal distansiyon ve huzursuzluk, genişlemiş ovaryum, asit, artmış ovaryum vasküler geçirgenliği ve diğer komplikasyonları da içeren geniş bir belirti ve semptom yelpazesine sahiptir [93-95]. Şiddetli formu ile OHSS hayatı tehdit edici bir durumdur. Çünkü böbrek yetmezliğine ve felç ve bir ekstremitenin perfüzyonunun kaybını içeren venöz veya arteriyel tromboembolik olaylara neden olabilir [93]. Aynı zamanda anne

ölümüyle de ilişkilendirilmiştir [96]. Bunlara ek olarak OHSS, iş, yatak istirahati ve hastanede kalmanın yanı sıra ağır vakalardaki yoğun tıbbi yönetim nedeniyle önemli bir ekonomik kayba neden olmaktadır. OHSS'nin gerçek insidansının belirlenmesi, sendromun genel kabul görmüş bir tanımı olmadığı için zordur. Ayrıca, uygulanacak olan klinik yöntem (KOH), kullanılan ilaçlara ve tedavi edilen hasta tipine (risk altında olan veya altında olmayan) bağlıdır [93].

OHSS'nin patofizyolojik sürecine ovaryan renin–angiotensin, prostaglandinler, histaminler, sitokinler, pigment epitel-kaynaklı faktör ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGFA) gibi birçok sistem ve aracının dâhil olduğu öne sürülmüştür [12-14, 16, 17]. Ancak araştırmalar sonrasında VEGFA, OHSS gelişiminde en önemli faktör olarak görünmektedir. Over kaynaklı VEGF, hCG'ye cevaben aşırı salgılanır ve endotelial hücreler üzerinde kendi reseptörü olan VEGFR-2'ye bağlanma, vasküler geçirgenliğin artmasına ve OHSS'nin klinik belirtilerine yol açar [22]. VEGF'nin vasküler geçirgenliğin artışıdaki önemi, uyarılmış dişi sıçanlarda gösterilmiştir. Bu çalışma VEGF ve VEGFR-2'nin aşırı uyarılmış sıçanlarda aşırı eksprese edildiğini ve sendromda asit oluşumundan sorumlu olabilecek vasküler geçirgenlikte bir artış ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır [26].

Teoride, gonadotropinler verilerek KOH uygulanan herhangi bir hastada OHSS gelişebilmektedir [93]. OHSS'ye özgü bir tedavi mevcut değildir [34]. OHSS'nin en aza indirilmesi ve tedavisi için birçok etkili ajan getirilmiş olmasına rağmen, tamamen ortadan kaldırılamamıştır. OHSS'in en iyi tedavisi hiç oluşmamasını sağlamaktır [12]. Özetle, OHSS tedavisinin temel dayanağı destekleyici tedavilerdir [13].

Günümüzde, bitki ekstraktları, kadınlardaki üreme bozukluklarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kersetin, *Sophora japonica* L., *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel ve *Crataegus pinnatifida* bunge gibi bitkilerin çiçeklerinde, yapraklarında ve meyvelerinde yaygın olarak bulunan bir flavonoid bileşiğidir [143]. Kersetin, antioksidan potansiyele [42], kardiyovasküler koruma etkisine, anti-inflamatuar, antikanser aktiviteye [43-45], anti-diyabetik [46] etkilere ve menapoz sonrası kadınlarda kemik kaybının tekrardan kazanılmasını sağlayan etkilere sahiptir [47]. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonundan [48], lipid peroksidasyonundan [49] korur ve hücrelerde redoks

dengelesizliklerini önler [50]. Bunlarla birlikte, Uluslararası WHO Kanseri Araştırma Ajansı'na göre Kersetin, insanlar için kanserojenik olan kategoride (Grup 3) sınıflandırılmaz [147]. Ayrıca, Kersetinin klinik çalışmaları yapılarak popülasyon üzerinde hiçbir toksisitesi veya yan etkisi gözlenmediği bildirilmiştir [148].

Kersetinin yukarıdaki etkileri ile OHSS'nin temel patofizyolojik mekanizmalarındaki hem inhibisyon hem de regülasyon özelliklerinden dolayı henüz özgün bir tedavisi olmayan bu sendromun hem önlenmesi hem de tedavisi için potansiyel taşımaktadır. Ayrıca antioksidan, anti-anjiojenik, anti-inflamatuar etkileri bilinen Kersetinin literatür araştırmaları sonucunda deneysel olarak OHSS'li sıçan modellerinde kullanıldığı herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Literatür bulguları ışığı altında, önerilen bu çalışmada, ovaryan hiperstimülasyon sendromu modeli oluşturulan ratlarda Kersetinin OHSS üzerine ve ilişkili olduğu VEGF/VEGFR-2, IL-6 üzerindeki etkileri araştırıldı.

Yardımcı üreme protokolleri gereği kadınlara yüksek dozda hormon tedavisi uygulanması gerekmektedir. Fakat araştırmalar sırasında bu hormon tedavisini görmeyen üreme çağındaki infertil olmayan kadınlardan da normal doku alınmasında yaşanan kısıtlılıklar yüzünden insan ovaryum araştırmalarında zorluk çekilmektedir. Belirli hücre veya dokuları elde etmek için manipüle edilebilen veya kullanılabilen hayvan modelleri, insan hastalıklarının patofizyolojik süreçlerini araştırmak için değerli araçlar olarak kabul edilir [191]. OHSS'nin sıçan modelleri, faydalı girişimsel yöntemler geliştirmek için de değerli olabilir [34].

Biz de çalışmamızda 22 günlük, 28 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar kullanılarak OHSS modeli oluşturduk [22, 178, 179]. Bu yaş aralığının tercih edilme nedeni, erişkin olmayan sıçanların ovaryumları çoğunlukla olgunlaşmanın farklı evrelerinde folliküllerden ve ovaryumun destek hücreleri olan interstisyel hücrelerden oluşur. İnterstisyel hücreler luteinizasyona neden olan hücrelerdir ve bir miktar östrojen salgılayarak FSH'nin etkinliğine yardımcı olur. Bu çalışmada, sıçanlarda OHSS deney modeli PMSG ve hCG kullanılarak oluşturulmuştur. Bu model en sık kullanılan yöntemlerden biridir [178].

Bu araştırmada OHSS deney modeli oluşturarak OHSS’li gruba Kersetin uygulandı ve OHSS bulgularına etkileri incelendi. Bu sebep ile deney grupları arasındaki hayvan ağırlık ve değişimleri, ovaryum ağırlıkları ve hacimleri ile ovaryum histo-morfolojisi ve ovaryumda bulunan folliküller ve ilişkili yapıların yüzde oranları hesaplanarak kıyaslandı. Bunlara ilave olarak Kersetinin serumdaki E2 ve peritoneal sıvıdaki IL-6 ve VEGFA seviyelerine etkisi ELISA tekniği kullanılarak incelenirken OHSS’nin ilişkili olduğu VEGFA ve VEGFR-2 proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkileri immünohistokimyasal yöntemler ile analiz edildi.

Vücut ağırlığında artış, OHSS’nin şiddetli formunun klinik bulgularından olduğu için incelenmesi önem arz eder. Özgür ve arkadaşlarının 2018 de OHSS’li sıçanlarda resveratrolün etkilerini araştırdıkları çalışmada, sıçanların vücut ağırlık değişimlerine bakıldığında en fazla değişimin olduğu grubu OHSS olarak saptamışlarıdır [179]. Yine sıçanlarda OHSS modeli oluşturularak yapılan çalışmada, Kasap ve ark. kontrol grubuna göre anlamlı bir kilo artışı tespit etmişlerdir [192]. Bunlara ek olarak Arman ve diğerleri yine OHSS grubunda bulunan sıçanların, en fazla kilo aldıklarını bildirmişlerdir [193].

Çalışmamızda da bütün gruplardaki sıçanların ağırlıklarında zamanla birlikte artış tespit edilirken en fazla artış OHSS grubunda en az artış ise kontrol grubunda gözlemlendi. Ağırlık değişimlerini değerlendirdiğimizde ise kontrol grubu ile OHSS grubu arasındaki ağırlık değişimi istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Kersetin uygulanan tedavi grubundaki sıçanların şiddetli OHSS grubundan daha az kilo aldıkları belirlendi, fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sonuç olarak elde ettiğimiz hayvan ağırlık ve değişimleri önceki çalışmalar ile uyumluydu.

IVF uygulamalarında kullanılan KOH ile çoklu follikül gelişimi uyarılarak bir döngüde en fazla olgun oosit elde edilmesi amaçlanmaktadır. Fakat bu süreç içinde gelişebilen, şiddetli OHSS’nin en belirgin olgularından biri de ovaryumun hem ağırlığında hem de hacminde meydana gelen anormal bir artıştır. Birçok araştırmada da bu bulgular bildirilmiştir [178, 179, 187, 192, 194]. Özgür ve ark. yaptıkları çalışmada OHSS grubunun ovaryum ağırlıklarının kontrol grubuna oranla yaklaşık olarak 4,5 kat arttığı ve tedavi grubuna 60

mg resveratrolün uygulanması sonucunda da ovaryum ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir [179].

Çalışmamızda da OHSS grubuna ait ovaryum ağırlıkları, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı şekilde yaklaşık olarak 4 kat ağırlık artışı olduğu saptandı. Ayrıca tedavi grubu olan OHSS+Kersetin grubunda ovaryum ağırlıklarının OHSS model grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü.

Kasap ve arkadaşlarının 2016 da OHSS sıçan deney modeli çalışmasında şiddetli OHSS gruplarındaki sıçanların hem ovaryum ağırlıklarında hem de çaplarında kontrole göre anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir. Tedavi gruplarında Resveratrol ve Kabergolin verilmesi ile ovaryum çaplarında OHSS grubuna göre her iki grupta anlamlı bir düşüş olurken, ovaryum ağırlıklarında anlamlı düşüşe sadece Resveratrol verilen grupta rastlanmıştır [192].

OHSS tedavi araştırmalarında GnRH agonistleri ve antagonistlerinin etkileri de çalışılmıştır. Kitajima ve ark. kısa süreli ve uzun süreli GnRH agonisti uygulamasını denemişler ve hiperstimüle sıçanlarda GnRH uygulamasının ovaryum ağırlığında ciddi düşüşe yol açtığını ve bu düşüşün özellikle uzun GnRH grubunda olduğunu bildirmişlerdir [178]. Cenksöy ve arkadaşları ise OHSS modeli oluşturulan sıçanlarda GnRH antagonistinin ovaryan ağırlıkları azalttığını belirlemişlerdir [189].

Çalışmamızda da ovaryum çap ölçümleri değerlendirildiğinde yine en yüksek çap ölçümü OHSS grubunda tespit edilirken, Kersetin tedavisinin sonucunda ovaryum çapında OHSS grubuna göre anlamlı bir düşüş bulundu. Bunlara ek olarak bir doz PMSG uygulamasının ovaryum çaplarını kontrole göre anlamlı bir şekilde yükselttiği de tespit edildi.

İnsanlarda, OHSS patolojisi, çoklu korpus luteum oluşumuna ve folliküller, luteal hücrelerden kaynaklanan VEGF seviyelerinde bir artışa neden olur [183]. Scotti ve ark. 2011 de yaptıkları araştırmada GnRH-I agonisti kullanarak OHSS'li sıçanlarda korpus luteum sayısı, VEGF seviyeleri ve luteal gelişime etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, en fazla korpus luteum oranına OHSS grubunda rastlanırken, GnRH-agonistinin OHSS sıçan modelinde korpus luteum sayısını anlamlı olarak azalttığını

bildirmişlerdir [183]. Ayrıca Özgür ve ark. 2019 da yaptıkları çalışmada OHSS'li grupta korpus luteum sayısının kontrollü stimülasyon grubuna göre anlamlı olarak yaklaşık 40 kat arttığı, resveratrollu tedavi grubunda ise OHSS grubuna göre yarı yarıya düştüğünü raporlamışlardır [179]. Taşkın ve arkadaşlarının 2015 de OHSS sıçan modeli üzerinde Tosilizumab, Ranibizumab, Kabergolin (dopamin agonisti) ve GnRH-ant kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada yine en yüksek korpus luteum sayısının OHSS'li grupta gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada Tosilizumab tedavi gruplarında OHSS grubuna kıyasla anlamlı olarak korpus luteum sayısının düştüğünü bildirmişlerdir [185]. Yine Pietro ve ark. 2017 de OHSS'li sıçanlara biyoaktif lipid Sfingozin-1-Fosfat (S1P) verilerek ovaryumdaki vasküler yapılara etkilerini inceledikleri çalışmada da OHSS'li grubun en yüksek korpus luteum oranına sahip olduğu ve S1P uygulamasının tedavi grubunda anlamlı olarak bu oranı düşürdüğünü bildirmişlerdir [188].

Araştırmamızda ise literatüre uyumlu olarak en yüksek korpus luteum oranına OHSS model grubunda rastlanırken, Kersetin uygulanan OHSS+Kersetin grubunda ise bu oranının OHSS grubuna göre anlamlı biçimde azaldığını gördük.

OHSS'nin bir başka karakteristik özelliği de luteal ve hemorajik kistlerin varlığı ile genişlemiş ovaryumlardır [132, 187]. Önceki çalışmalarda OHSS'li sıçanlarının ovaryumlarında, çoklu kistik hemorajik folliküller ve teka-lutein kistleri ile önemli derecede stromal ödemin olduğu bildirilmiştir [187]. Scotti ve ark. 2014 de OHSS'li sıçanlara VEGF inhibitörü (Trap) uyguladıkları çalışmada, OHSS sıçanlarının ovaryum bölümlerinde, birçoğu kanamalı olan yüksek oranda kistik yapılar gözlemlemişlerdir. Buna karşılık, TRAP ile tedavi edilen grupta anlamlı şekilde daha az sayıda kist saptadıkları, bu da TRAP tedavisinin folliküller gelişimi iyileştirdiğini ve daha fazla sayıda follikülün kistik yapılar oluşturmak yerine atrezi geçirmesine yol açmış olabileceğini bildirmişlerdir [187]. Yine Pietro ve ark. 2017'deki araştırmasında, in vivo S1P uygulamasının tedavi uygulanmayan OHSS grubuna göre ovaryumlarda kistik yapıların oranını anlamlı şekilde düşürdüğü, luteal gelişimi etkilediği, follikülogenezi geciktirdiği ve yukarıda da belirtildiği gibi korpus luteum yüzdesinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir [188].

Çalışmamızda da yukarıdaki araştırmalarla uyumlu şekilde en fazla kistik yapı OHSS grubunda bulunurken bu grubun Kersetin uygulanan tedavi grubu ile karşılaştırıldığında kistik yapıların anlamlı şekilde azaldığı görüldü. OHSS+Kersetin grubunda KOH grubuna göre kistik yapılarda bir artma olsa da bu artış anlamlı bulunmamıştır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi Scotti ve ark. 2011'deki araştırmasında agonistin OHSS'li sıçanlarında atretik follikül sayısını, tedavi uygulanmayan hiperstimüle sıçanlara kıyasla anlamlı şekilde arttırdığını belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda ise kullanılan GnRH-I agonistlerinin luteal gelişimi değiştirebileceğini, folikülogenezi geciktirebileceğini, daha fazla sayıda follikülün atreziye ve dolayısıyla tedavi uygulanan OHSS'li sıçanlarının ovaryumlarında daha az sayıda korpus luteum bulunmasına yol açabileceğini bildirmişlerdir [183]. Yine Pietro ve ekibinin 2017 de yaptıkları çalışmada atretik follikül oranları değerlendirildiğinde en az atretik follikül OHSS'li grupta tespit edilirken, S1P uygulanan grupta bu oranın artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir [188]. Özgür ve ark. önceden bahsedilen aynı çalışmasında atretik follikül sayısının en az kontrol grubunda en fazla ise Resveratrol grubunda olduğu gösterilmiş. Bu durumun OHSS de aşırı bir follikül gelişimi olduğundan dolayı, folliküllerin çoğu artan ovulasyon sonucunda geliştiği için atreziye giden follikül sayısı azalmış ve ovule olarak korpus luteum sayısında aşırı bir artış meydana gelmiştir. VEGFA folliküllerin gelişiminde önemli olduğu çünkü anjiyogenez ve ovule olabilecek sağlıklı folliküllerin ve korpus luteumun oluşması için esastır. Tedavi de kullanılan Resveratrol VEGFA'yı baskılama özelliğinden dolayı folliküler anjiyogenez bozulmuş ve folliküllerin atreziye gitmesine neden olabilmıştır [179].

Çalışmamızda da literatüre uyumlu olarak en fazla atretik follikül yüzdesi KOH grubunda bulundu. En az atretik follikül yüzdesine ise OHSS grubunda rastlanırken Kersetin uygulanan 4. grupta OHSS grubuna göre anlamlı bir atretik follikül artışı olduğu saptandı. Tedavi grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında atretik follikül yüzdesinde artış bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Quintana ve arkadaşları 2008'de OHSS sıçan modelinde Meloksikam un COX-2 ekspresyonu ve OHSS ye etkilerine incelemişlerdir. Çalışmalarında Kontrol ve KOH

arasında ovaryum ağırlıklarında herhangi bir anlamlı fark oluşmazken, OHSS'li grupta yaşanan ovaryum ağırlıklarındaki artışa rağmen tedavi grubunda Meloksikam tarafından ovaryum ağırlıklarının baskılandığını göstermişlerdir. Antral follikül sayılarına bakıldığında ise dört grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı dikkati çekmiştir [195]. Yine Scotti ve ark. 2011'deki araştırmasında OHSS sıçan modelinde GnRH-I agonistinin ovaryum morfolojisi üzerindeki etkisini değerlendirdiklerinde herhangi bir antruma sahip olmayan follikül (primer erken ve primer geç) ve antral follikül oranlarının OHSS'li grupta en az olduğunu ve agonist uygulanan grupta ise OHSS'li gruba göre önemli ölçüde arttığını raporlamışlardır [183]. Yukarıda da bahsedilen aynı çalışmada Taşkın ve ark. farklı follikül evrelerini değerlendirdiklerinde sham grubunda preantral, antral ve tersiyer follikül sayılarının tedavi gruplarına göre daha düşük olduğunu ve sadece Tosilizumab grubunda preantral follikül sayısının OHSS gruba göre daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir [185]. Önceden de bahsedilen Pietro ve ark. S1P çalışmasında OHSS grubundaki antral follikül yüzdesi kontrol grubuna göre daha düşük bulunurken OHSS + S1P grubunda antral follikül yüzdesi tedavisiz OHSS grubuna göre artmış olduğu gösterildi. Bununla birlikte, üç deney grubu arasında preantral veya atretik follikül yüzdesinde önemli farklılıklar gözlemlenmediği söylenmiştir [188]. Özgür ve ark. aynı çalışmasında ise antral follikül sayısı bakımında tedavi grubu OHSS grubundan daha fazla sayıda antral follikül içermekte iken kontrol grubunda en az sayıda olduğunu ve ayrıca KOH grubunun ise OHSS ve kontrol gruplarına göre daha yüksek antral follikül bulunduğunu göstermişlerdir [179].

Çalışmamızdaki sonuçlara göre, OHSS oluşturulan sıçan ovaryumlarında primordiyal, erken primer, geç primer ve antral follikül yüzde oranlarının diğer gruplara göre azaldığı saptandı. Antral follikül oranları incelendiğinde bu azalma kontrol ve KOH grubuna göre anlamlı bulundu. Kersetin tedavisi OHSS ye göre antral follikül sayısında bir artış sağlasa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Primer follikül oranlarına bakıldığında ise hem erken hem de geç tiplerinde en yüksek yüzde oranlar kontrol grubunda tespit edildi. Yine antral follikül oranlarında olduğu gibi Kersetin tedavisi OHSS ye göre bir artış sağlasa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Primordiyal follikül oranı en fazla kontrol grubunda, en az ise OHSS grubunda görüldü. Primer follikül sonuçlarından farklı olarak OHSS+Kersetin grubundaki primordiyal follikül yüzde oranındaki artış OHSS'li gruba göre anlamlı olarak bulundu.

Prostaglandinler, sitokinler ve renin-anjiyotensin-aldosteron sistemindeki moleküller gibi birçok faktör OHSS etiolojisinde yer alsa da VEGF, OHSS gelişiminde ana faktör olarak değerlendirilmektedir [26]. VEGF'nin OHSS'deki rolü kapsamlı bir şekilde değerlendirildiğinde, VEGF ve izoformlarının vazoaktif özelliklere sahip olması, VEGF'in folliküler sıvıda tanımlanmış olması, VEGF'nin mRNA transkriptleri ve proteinleri granüloza-luteal hücrelerinde tespit edilmesi ve son olarak VEGF'nin kontrol hastalarına kıyasla OHSS gelişen kadınların serum ve periton sıvısında artmış olarak bulunması VEGF'nin OHSS gelişiminde potansiyel bir aracı olarak rol oynadığını göstermiştir [30, 100]. VEGF, damar geçirgenliğinde çok büyük bir rol oynamasının yanında, gelişmekte olan embriyoda ve endometrial siklus ve folliküllerin luteinizasyonu gibi yoğun şekilde anjiyogenez geçiren yetişkin dokusunda anjiyogenezin başlatılması ve gelişiminde önemli bir yer tutmaktadır [134].

Dişi üreme sistemi de ileri düzeyde fizyolojik anjiyogenez yaşanmaktadır. Ovaryum ve uterusdaki anjiyogenez, östrojen/menstrual döngüsünün devamı ve düzenlenmesi ayrıca gebeliğin oluşması ve sürdürülmesi için gereklidir [100, 135].

Bu süreçlerde görevli olan VEGF de etkisini VEGF reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirmektedir. VEGFA, esas olarak VEGFR-2 ye bağlanarak vasküler geçirgenlik, anjiyogenez ve vaskülojenizin yürütülmesinde aracılık görevi üstlenir [116, 129]. Endotel hücrelerine ek olarak sıçan, maymun ve insan ovaryum folliküllerinde ve korpus luteumda, farklı moleküler teknikler ile VEGF'nin ve VEGFR-2'nin varlığı ve üretildiği gösterilmiştir [26, 187].

Gomez ve diğerleri tarafında 2003'te dişi sıçanlara orta ve yüksek doz gonadotropinler verilerek sıçanların ovaryumlarındaki VEGF ve VEGFR-2 mRNA'larının ekspresyonlarına ve vasküler geçirgenliğine (VP) etkilerini incelemişlerdir. Analizler hCG'den 0, 24, 48 ve 96 saat sonra alınan örneklerden yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, hCG den önceki gonadotropin uygulamasının bile hem hafif uyarılan hem de OHSS'li hayvanların ovaryumlarında vasküler geçirgenliğin artmasına ve hem VEGF hem de VEGFR-2 mRNA'larının ekspresyonunun artmasına yol açtığını saptamışlardır. Ayrıca hCG uygulanması sonrasında bu parametrelerin daha da arttığını ve 48 saat sonra en yüksek

değerlerine ulaştığını göstermişlerdir. Araştırma sonrasında ise hem hafif hem de OHSS'li gruplarda VEGF ve VEGFR-2 mRNA'larının artan ekspresyonu ile artmış VP arasında doğrusal bir korelasyon bulmuşlardır. Sonra olarak da immünohistokimyasal analizler sonucunda, tüm korpus luteumdaki granüloza-lutein ve endotel hücrelerinde VEGF ve VEGFR-2'nin varlığını göstermişlerdir [26]. Aynı grubun 2002 yılındaki çalışmasında ise OHSS'li sıçanlara spesifik VEGFR-2 inhibitörü (SU5416) uygulanmıştır. Çalışma sonunda OHSS de ortaya çıkan vasküler geçirgenlikteki artışın azaldığı raporlanmıştır [27].

Özgür ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, OHSS'li sıçanların antral follikül granüloza hücrelerindeki VEGF ekspresyonunda bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda periton sıvısındaki VEGFA konsantrasyonu ölçüldüğünde OHSS+Resveratrol grubu için OHSS ve hafif uyarılmış gruplarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğunu bunun da Resveratrol tedavisi ile ilişkili azalmış VEGF aktivitesini gösterdiğini bildirmişlerdir. Tüm tedavi gruplarındaki seviyeler ise kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda yüksek peritoneal VEGFA seviyelerini artan vasküler geçirgenliğin güçlü bir belirteci olduğunu saptamışlardır [179].

Scotti ve ekibinin önceden de yukarıda bahsedilen 2014'teki çalışmasında Trap adlı VEGF inhibitörünün uygulanması sonucunda OHSS oluşturulan sıçanların ovaryumlarındaki korpus luteum ve kistik follikül sayıları azalırken korpus luteumlardaki apoptoz oranının arttığını bulmuşlardır. Ayrıca endotel hücrelerini incelediklerinde, buradaki VEGFR-2 ekspresyonu ve fosforilasyonu azalırken endotel hücreleri arası bağlantı proteinlerinde bir artış yaşandığını da bulmuşlardır [187]. Bunlara ek olarak daha önce yaptıkları çalışmada VEGF'nin peritoneal seviyelerine de bakmışlardır. Bu sonuçlara göre OHSS grubundaki VEGF seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık dört kat artarken GnRH-I agonisti ile tedavi, VEGF'nin peritoneal seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ile sonuçlandığını göstermişlerdir [183].

Çalışmamızdaki immünohistokimya boyama sonuçlarına göre VEGF'nin tüm gruplara ait ovaryumlarda eksprese olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerindeki VEGFA immünreaktivitesi değerlendirildiğinde kortekste bulunan farklı gelişim aşamalarındaki ovaryum folliküllerinin bazılarında granüloza hücrelerindeki tutulum zayıf,

teka hücrelerindeki ve stromada bulunan hücrelerdeki tutulum ise yer, yer orta derecede olduğu saptandı. KOH grubunda kontrol grubuna göre ovaryum dokusuna ait kesitlerde VEGF-A immünreaktivitesinin genel olarak artmış olduğu, özellikle kan damarlarının endotel hücrelerinde ve duvarında kuvvetli pozitif immünreaktivitenin olması dikkati çekti. Stromada, folliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde VEGF-A immünreaktivitesi ise orta derecede izlendi. OHSS grubundaki ovaryum dokusuna ait kesitlerde, ovaryum dokusunda kontrol ve KOH grubuna göre artmış bir VEGF-A immünreaktivitesi dikkat çekti. Korpus luteuma ait granüloza lutein, teka lutein hücrelerinde, kistik oluşumların duvarındaki hücrelerde, kan damarlarında kuvvetli VEGF-A immünreaktivitesi saptandı. OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum dokusuna ait kesitlerde ise, korpus luteumdaki hücrelerde ve granüloza hücrelerinde, KOH ve OHSS grubuna göre daha zayıf VEGF-A immünreaktivitesi dikkati çekti. Genel olarak KOH ve OHSS gruplarına göre bu grupta VEGF-A immünreaktivitesi azalmıştı.

Bunun yanında VEGFR-2 proteininin ifadenmesi immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde yine VEGFA gibi tüm gruplara ait ovaryumlarda eksprese olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, gelişimin değişik aşamalarındaki folliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde orta derecede VEGFR-2 immünreaktivitesi saptandı. KOH grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde değişik gelişim aşamalarındaki folliküllerin teka hücrelerinde, korpus luteum yapısındaki granüloza-lütein, teka-lütein hücrelerinde orta derecede, medulla bölgesindeki kan damarlarında kuvvetli VEGFR-2 immünreaktivitesi görüldü. OHSS grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde genel olarak kontrol ve KOH gruplarına göre artmış VEGFR-2 immünreaktivitesi görüldü. Medulladaki kan damarlarında, korpus luteumdaki granüloza-lutein, teka lutein hücrelerinde kuvvetli VEGFR-2 immünreaktivitesi saptandı. OHSS+Kersetin grubuna ait ovaryum kesitlerinde, OHSS grubuna göre granüloza-lütein, teka-lütein hücrelerinde, kan damarlarında azalmış bir immünreaktivite dikkati çekti.

İmmünohistokimyasal değerlendirmenin yanında periton sıvısındaki VEGFA seviyelerine bakıldığında en düşük VEGFA seviyesi kontrol grubunda ölçüldü. KOH grubunda ise bu seviye anlamlı bir şekilde yaklaşık olarak 2 kat artarken, OHSS grubunda ise bu artışın anlamlı olarak 6 kata kadar çıktığı tespit edildi. OHSS+Kersetin adlı tedavi grubunda ise

periton sıvısındaki VEGF seviyesi KOH ve OHSS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde KOH grubundan 2 ve OHSS grubundan 3,5 kat daha düşük ölçülürken kontrol grubuna göre yine anlamlı olarak daha yüksek bulundu.

Günümüze kadar yürütülen birçok araştırmada interlökin-6 (IL- 6) ve interlökin-8 (IL-8) gibi inflamatuvar sitokinlerin ve reseptörlerinin OHSS oluşumunda yer aldığını ortaya koymuşlardır [31]. FSH, hCG gibi gonadotropin uygulamaları sonrası bu moleküllerde artış yaşandığı ve PKC sinyal yolağının da aktifleşmesi ile OHSS oluşumuna yol açabileceği rapor edilmiştir. Wei ve ark. 2013 yılında IVF tedavisi gören kadınlardan granüloza hücrelerini izole etmiş ve in vitro hücre kültürü ortamında FSH uygulamışlardır. Araştırma sonucunda IL-6 reseptörünün ifadenmesinde artış bulunurken, ortama PKC inhibitörü eklendiğinde ise reseptör sayısında azalma olduğu gösterilmiştir [196]. Bu çalışmalar ek olarak Revel ve diğerleri şiddetli OHSS'li kadınlarda periton sıvısındaki IL-6, TNF- α ve IL-8 konsantrasyonlarını ölçmüşler ve bu değerlerin kontroller ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Serumda ise sadece IL-6 düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek olarak ölçülmüştür [108]. Özgür ve ekibinin yukarıda bahsedildiği çalışmasında aynı zamanda periton sıvısındaki IL-6 seviyeleri ölçülmüştür. Sonuç olarak kontrol grubunda ve hafif uyarılmış olan sıçan grubunda beklenildiği gibi OHSS grubundan daha düşük olarak bulunmuştur. OHSS+Resveratrol grubundaki periton sıvısı IL-6 sonuçları değerlendirildiğinde hafif uyarılmış sıçan ve OHSS'li sıçan gruplarına göre belirgin şekilde daha düşük IL-6 seviyelerinin ölçüldüğünü rapor etmişlerdir [179].

Çalışmamızda ise en düşük IL-6 seviyesi kontrol grubunda bulunurken, KOH grubunda IL-6 seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı şekilde 3 kat, OHSS grubunda ise bu seviye yine kontrol grubuna göre anlamlı şekilde 6 kat daha yüksek bulundu. Kersetin uygulanan 4. grubun IL-6 seviyesi ise kontrole yakın ölçülürken, KOH grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde 2 kat, OHSS grubu ile karşılaştırıldığında ise yine anlamlı olarak 3 kat daha düşük olarak ölçüldü.

Yüksek düzeyde 17 β -estradiol (E2) de OHSS'nin klinik özelliklerinden biridir. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) uygulamasının yapıldığı gün yüksek serum E2 seviyesi, OHSS insidansı için bir risk faktörü olarak kabul edilir. Bu nedenle serum E2, OHSS başlangıcında

vazgeçilmez bir rol oynar ve klinikte ovulasyonu indüklemek ve OHSS'yi önlemek için bazı E2 inhibisyon ilaçları kullanılmaktadır [173]. Scotti ve ekibi yukarıda da bahsedilen çalışmasında serum progesteron ve östradiol düzeylerine de bakmışlar ve GnRH-I agonisti ile tedavinin bu iki parametreyi önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir [183]. Kasap ve diğerleri de OHSS sıçan modeli üzerindeki çalışmasında serum E2 seviyesini ölçmüş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, OHSS için tedavi edilen tüm gruplar için E2 düzeylerini önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Kabergolin grubunda E2 konsantrasyonu şiddetli OHSS grubuna göre daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak Resveratrol grubunda, OHSS ve Kabergolin grubuna kıyasla E2 konsantrasyonu önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir [192].

Çalışmamızda ise en yüksek E2 değerleri OHSS model grubunda tespit edilirken, en küçük E2 değerleri ise kontrol grubunda bulundu ve OHSS+Kersetin gruplarının E2 değerleri ise birbirlerine yakın olarak hesaplandı. Bunlarla birlikte Kersetin uygulamasının E2 değerini OHSS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde düşürdüğü saptandı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yardımcı Üreme Teknikleri sırasında ortaya çıkan ve ağır klinik tablo ile seyreden OHSS'nun patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olup, ortaya çıkan bu tablo ile ilgili olarak uygulanan özgün bir tedavi yöntemi de bulunmamaktadır. OHSS'nun etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamış olsa da ovaryumlarda genişleme, boyutlarında artış, vaskülaritede artma, inflamatuvar belirteçlerin serum ve periton sıvılarında yükselmesi bilinen sonuçlarıdır.

Antioksidan, antianjiojenik, antiinflamatuvar etkileri bilinen Kersetinin literatür araştırmaları sonucunda deneysel olarak OHSS'li sıçan modellerinde kullanıldığı herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmamız Kersetinin bu alanda kullanıldığı ilk araştırmalardan biri olduğu düşünülmektedir.

OHSS de artan ovarium çap ve boyutları, ovarium yapısındaki histolojik değişiklikler, kist yapılarının varlığı, VEGF/VEGFR-2 immünreaktivitesi, periton sıvısındaki IL-6, VEGF ve serum E2 değerleri göz önüne alındığında Kersetinin oluşan tabloyu iyileştirdiği yönünde etkileri olduğu görülmüştür.

Ayrıca, bu çalışma kapsamında Kersetin molekülünün deneysel OHSS sıçan modeli üzerindeki etkilerinin ve bu araştırmada çalışılan VEGF/VEGFR-2, IL-6 ve E2 gibi etken moleküllerin ve diğer ilişkili olabilecek olan farklı moleküller ile birlikte daha farklı ve ileri moleküler tekniklerle incelenmesinin OHSS'nin patogenezinin aydınlatılmasında ve kalıcı bir tedavi oluşturulmasında yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Kersetin molekülünün farklı üreme organları üzerindeki etkilerinin farklı deneysel hayvan modelleri üzerinde daha ileri moleküler tekniklerle incelenmesinin şu anda bile destekleyici gıda olarak kullanılan ve doğal bitkisel bileşik olarak insan gıdalarında da bulunan Kersetin'in daha farklı kullanım alanlarının bulunmasına olanak sağlayacağı da düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Selter, J. Wen, T. Palmerola, K. L. Friedman, A. M. Williams, Z. and Forman, E. J. (2019). Life-Threatening Complications among Women with Severe Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 220(6), 575-e1.
2. Sutcliffe, A. G. and Ludwig, M. (2007). Outcome of assisted reproduction. *Lancet*, 370(9584), 351-359.
3. Roque, M. (2015). Freeze-all policy: is it time for that? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32, 171-176.
4. Rova, K. Passmark, H. and Lindqvist, P. G. (2012). Venous thromboembolism in relation to in vitro fertilization: an approach to determining the incidence and increase in risk in successful cycles. *Fertility and Sterility*, 97(1), 95-100.
5. Delvigne, A. and Rozenberg, S. (2003). Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Human Reproduction Update*, 9(1), 77-96.
6. Thomsen, L. and Humaidan, P. (2015). Ovarian hyperstimulation syndrome in the 21st century: The role of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger and kisspeptin. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 27(3), 210-214.
7. Humaidan, P. Nelson, S. M. Devroey, P. Coddington, C. C. Schwartz, L. B. Gordon, K. Frattarelli, J. L. Tarlatzis, B. C. Fatemi, H. M. Lutjen, P. and Stegmann, B. J. (2016). Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials. *Human Reproduction*, 31(9), 1997-2004.
8. McElhinney, B. and McClure, N. (2000). Ovarian hyperstimulation syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14, 103-122.
9. Fritz, M. and Speroff, L. (2011). *Induction of ovulation. Clinical gynecological endocrinology and infertility*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1214-1217.
10. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2016). Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: a guideline. *Fertility and Sterility*, 106(7), 1634-1647.
11. Guo, J. Zhang, D. Zhao, Y. Zhang, D. Zhang, X. Zhou, C. and Yao, S. (2016). Pharmacologic Interventions in Preventing Ovarian Hyperstimulation Syndrome: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
12. Blumenfeld, Z. (2018). The Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Vitamins and Hormones*, 107, 423-451.

13. Kwik, M. and Maxwell, E. (2016). Pathophysiology, treatment and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 28, 236-241.
14. Nelson, S. M. (2017). Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Thrombosis Research*, 151, 61-64.
15. Rizk, A. Y. Bedaiwy, M. A. and Al-Inany, H. G. (2005). N-acetyl-cysteine is a novel adjuvant to clomiphene citrate in clomiphene citrate-resistant patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 83(2), 367-370.
16. Delbaere, A. Bergmann, P. Gervy-Decoster, C. Deschodt-Lanckman, M. de Maertelaer, V. Staroukine, M. Camus, M. and Englert, Y. (1997). Increased angiotensin II in ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome: role of early pregnancy and ovarian gonadotropin stimulation. *Fertility and Sterility*, 67, 1038-1045.
17. Miller, I. Chuderland, D. Grossman, H. Ron-El, R. Ben-Ami, I. and Shalgi, R. (2016). The dual role of PEDF in the pathogenesis of OHSS: negating both angiogenic and inflammatory pathways. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(12), 4699-4709.
18. Kumar, P. Sait, S. Sharma, A. and Kumar, M. (2011). Ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 4, 70-75.
19. Shi, S. L. Peng, Z. F. Yao, G. D. Jin, H. X. Song, W. Y. Yang, H. Y. Xue, R. Y. and Sun, Y. P. (2015). Expression of CD11c+HLA-DR+dendritic cells and related cytokines in the follicular fluid might be related to pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8, 15133-15137.
20. Yarali, H. Fleige-Zahradka, B. G. Yuen, B. and McComb, P. F. (1993). The ascites in the ovarian hyperstimulation syndrome does not originate from the ovary*. *Fertility and Sterility*, 59, 657-661.
21. Field, S. L. Dasgupta, T. Cummings, M. and Orsi, N. M. (2014). Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Molecular Reproduction and Development*, 81, 284-314.
22. Ferrero, H. Garcia-Pascual, C. M. Gaytan, M. Morales, C. Simon, C. Gaytan, F. Pellicer, A. and Gomez, R. (2014). Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in an ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) animal model: implications for treatment of OHSS with dopamine receptor 2 agonists. *Fertility and Sterility*, 102(5), 1468-1476.e1.
23. Gómez, R. Simón, C. Remohí, J. and Pellicer, A. (2003). Administration of Moderate and High Doses of Gonadotropins to Female Rats Increases Ovarian Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptor-2 Expression that Is Associated to Vascular Hyperpermeability. *Biology of Reproduction*, 68, 2164-2171.

24. Yamamoto, S. Konishi, I. Tsuruta, Y. Nanbu, K. Mandai, M. Kuroda, H. Matsushita, K. Hamid, A. A. Yura, Y. and Mori, T. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecological Endocrinology*, 11, 371-381.
25. Pellicer, A. Albert, C. Mercader, A. Bonilla-Musoles, F. Remohí, J. and Simón, C. (1999). The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1 β , interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertility and Sterility*, 71, 482-489.
26. Gómez, R. Simón, C. Remohí, J. and Pellicer, A. (2003). Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod*, 68, 2164-2171.
27. Gómez, R. Simón, C. Remohí, J. and Pellicer, A. (2002). Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*, 143, 4339-4348.
28. Albert, C. Garrido, N. Mercader, A. Rao, C. V. Remohí, J. Simón, C. and Pellicer, A. (2002). The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 8, 409-418.
29. Wang, T. H. Horng, S. G. Chang, C. L. Wu, H. M. Tsai, Y. J. Wang, H. S. and Soong, Y. K. (2002). Human Chorionic Gonadotropin-Induced Ovarian Hyperstimulation Syndrome Is Associated with Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 3300-3308.
30. Abramov, Y. Barak, V. Nisman, B. and Schenker, J. G. (1997). Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 67, 261-265.
31. Chen, C. D. Wu, M. Y. Chen, H. F. Chen, S. U. Ho, H. N. and Yang, Y. S. (1999). Prognostic importance of serial cytokine changes in ascites and pleural effusion in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 72, 286-292.
32. Villasante, A. Pacheco, A. Ruiz, A. Pellicer, A. and Garcia-Velasco, J. A. (2006). Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92, 314-321.
33. Cohen, T. Nahari, D. Cerem, L. Neufeld, G. and Levi, B. Z. (1996). Interleukin 6 Induces the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 736-741.

34. Gomez, R. Gonzalez-Izquierdo, M. Zimmermann, R. C. Novella-Maestre, E. Alonso-Muriel, I. Sanchez-Criado, J. Remohi, J. Simon, C. and Pellicer, A. (2006). Low-dose dopamine agonist administration blocks vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated vascular hyperpermeability without altering VEGF receptor 2-dependent luteal angiogenesis in a rat ovarian hyperstimulation model. *Endocrinology*, 147, 5400-5411.
35. Blumenfeld, Z. (2015). Does freeze all policy eliminate OHSS??? "It ain't necessarily so...". *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32, 1571-1571.
36. Desai, B. N. Maharjan, R. H. and Nampoothiri, L. P. (2012). Aloe barbadensis Mill. formulation restores lipid profile to normal in a letrozole-induced polycystic ovarian syndrome rat model. *Pharmacognosy Research*, 4, 109-115.
37. Grant, P. (2010). Spearmint herbal tea has significant anti-androgen effects in polycystic ovarian syndrome. a randomized controlled trial. *Phytotherapy Research*, 24, 186-188.
38. Jahan, S. Munir, F. Razak, S. Mehboob, A. Ain, Q. Ullah, H. Afsar, T. Shaheen, G. and Almajwal, A. (2016). Ameliorative effects of rutin against metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *Journal of Ovarian Research*, 9, 86.
39. Chen, C. Zhou, J. and Ji, C. (2010). Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*, 87, 333-338.
40. Moutsatsou, P. (2007). The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones (Athens, Greece)*, 6, 173-193.
41. Boots, A. W. Haenen, G. and Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585, 325-337.
42. Hollman, P. C. H. and Katan (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51, 305-310.
43. Griffiths, K. Aggarwal, B. B. Singh, R. B. Buttar, H. S. Wilson, D. and Meester, F. (2016). Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases*, 4(3), 28.
44. Lewandowska, H. Kalinowska, M. Lewandowski, W. Stępkowski, T. M. and Brzóśka, K. (2016). The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 32, 1-19.
45. Shen, F. Herenyiova, M. and Weber, G. (1999). Synergistic down-regulation of signal transduction and cytotoxicity by tiazofurin and quercetin in human ovarian carcinoma cells. *Life Sciences*, 64, 1869-1876.

46. Kim, H. P. Mani, I. Iversen, L. and Ziboh, V. A. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 58, 17-24.
47. Wattel, A. Kamel, S. Mentaverri, R. Lorget, F. Prouillet, C. Petit, J.-P. Fardelonne, P. and Brazier, M. (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology*, 65, 35-42.
48. Leckey, L. C. Garige, M. Varatharajalu, R. Gong, M. Nagata, T. Spurney, C. F. and Lakshman, R. M. (2010). Quercetin and Ethanol Attenuate the Progression of Atherosclerotic Plaques With Concomitant Up Regulation of Paraoxonase1 (PON1) Gene Expression and PON1 Activity in LDLR-/- Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34, 1535-1542.
49. Kleemann, R. Verschuren, L. Morrison, M. Zadelaar, S. van Erk, M.J. Wielinga, P.Y. and Kooistra, T. (2011). Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis*, 218, 44-52.
50. Kostyuk, V. A. Potapovich, A. I. Suhan, T. O. Luca, C. and Korkina, L. G. (2011). Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 658(2-3), 248-256.
51. Yang, T. Kong, B. Gu, J. W. Kuang, Y. Q. Cheng, L. Yang, W. T. Xia, X. and Shu, H. F. (2014). Anti-apoptotic and Anti-oxidative Roles of Quercetin After Traumatic Brain Injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34, 797-804.
52. Nna, V. Usman, U. Ofutet, E. and Owu, D. (2017). Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride - induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats. *Food and chemical toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 102, 143-155.
53. Hong, Y. Yin, Y. Tan, Y. Hong, K. Jiang, F. and Wang, Y. (2018). Effect of quercetin on biochemical parameters in letrozoleinduced polycystic ovary syndrome in rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17, 1783-1788.
54. Lin, R. Liu, J. Gan, W. and Ding, C. (2007). Protective Effect of Quercetin on the Homocysteine-Injured Human Umbilical Vein Vascular Endothelial Cell Line (ECV304). *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101, 197-202.
55. Shah, K. N. and Patel, S. S. (2016). Phosphatidylinositide 3-kinase inhibition: A new potential target for the treatment of polycystic ovarian syndrome. *Pharmaceutical Biology*, 54, 975-983.

56. Naseer, Z. Ahmad, E. Epikmen, E. Uçan, U. Boyacioğlu, M. İpek, E. and Akosy, M. (2017). Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology*, 96, 136-141.
57. Capcarova, M. Petruska, P. Zbynovska, K. Kolesarova, A. and Sirotkin, A. V. (2015). Changes in antioxidant status of porcine ovarian granulosa cells after quercetin and T-2 toxin treatment. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50, 201-206.
58. Jia, Y. Lin, J. Mi, Y. and Zhang, C. (2011). Quercetin attenuates cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian follicles. *Reproductive Toxicology*, 31, 477-485.
59. Chen, Z. G. Luo, L. L. Xu, J. J. Zhuang, X. L. Kong, X. X. and Fu, Y. C. (2010). Effects of plant polyphenols on ovarian follicular reserve in aging rats This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled Second International Symposium on Recent Advances in Basic, Clinical, and Social Medicine and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 88, 737-745.
60. Mrvová, N. Škandík, M. Kuniaková, M. and Račková, L. (2015). Modulation of BV-2 microglia functions by novel quercetin pivaloyl ester. *Neurochemistry International*, 90, 246-254.
61. Ramyaa, P. Krishnaswamy, R. and Padma, V. (2014). Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells — up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF-κB and COX-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 681-692.
62. Mirossay, L. Varinská, L. and Mojžiš, J. (2017). Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 27.
63. Pratheeshkumar, P. Budhraj, A. Son, Y. O. Wang, X. Zhang, Z. Ding, S. Wang, L. Hitron, A. Lee, J. C. Xu, M. Chen, G. Luo, J. and Shi, X. (2012). Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR- 2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 7(10), e47516.
64. Zhao, D. Qin, C. Fan, X. Li, Y. and Gu, B. (2014). Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 723, 360-367.
65. Li, F. Bai, Y. Zhao, M. Huang, L. Li, S. Li, X. and Chen, Y. (2015). Quercetin Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Choroidal and Retinal Angiogenesis in vitro. *Ophthalmic Research*, 53, 109-116.
66. Maurya, A. and Vinayak, M. (2017). Quercetin Attenuates Cell Survival, Inflammation, and Angiogenesis via Modulation of AKT Signaling in Murine T-Cell Lymphoma. *Nutrition and Cancer*, 69(3), 470-480.

67. Dudek, R. W. (2014). *BRS Embryology* (Six edition). Wolters Kluwer Health, 65-100.
68. Sadler, T. W. (2010). *Langman's Medical Embryology* (Eleven edition). Lippincott William & Wilkins, 100-150.
69. Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel Histoloji* (Birinci Baskı). Ankara: İstanbul Tıp Kitabevi, 200-250.
70. Gray, H. Standring, S. Ellis, H. and Berkovitz, B.K.B. (2005). *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice* (Thirty-ninth edition). New York: Elsevier Churchill Livingstone, 1321-1326.
71. Moore, K.L. Agur, A.M.R. Dalley, A.F. and Moore, K.L. (2017). *Clinically oriented anatomy* (8th edition). Philadelphia: Wolters Kluwer Health 383-384.
72. Yıldırım, M. (2013). *Resimli Sistematiik Anatomi* (Birinci Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 552-555.
73. Çelik, Ö. (2011). *Yardımcı üreme teknikleri*. Adana: Nobel Kitabevi, 40-50.
74. Ross, M. H. and Pawlina, W. (2018). *Histology: A Text and Atlas : with Correlated Cell and Molecular Biology*. Wolters Kluwer Health, 831-844.
75. Vidal, J. D. and Dixon, D., (2018). Chapter 26 - Ovary. A.W. Suttie (editörler). *Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition)*. Boston. Academic Press, 523-536.
76. Practice Committee of American Society for Reproductive, M. (2013). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 99, 63-63.
77. Datta, J. Palmer, M. J. Tanton, C. Gibson, L. J. Jones, K. G. Macdowall, W. Glasier, A. Sonnenberg, P. Field, N. Mercer, C. H. Johnson, A. M. and Wellings, K. (2016). Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human reproduction (Oxford, England)*, 31, 2108-2118.
78. van Roode, T. Dickson, N. P. Righarts, A. A. and Gillett, W. R. (2015). Cumulative incidence of infertility in a New Zealand birth cohort to age 38 by sex and the relationship with family formation. *Fertility and Sterility*, 103, 1053-1058.e1052.
79. Brosens, I. Gordts, S. Valkenburg, M. Puttemans, P. Campo, R. and Gordts, S. (2004). Investigation of the infertile couple: when is the appropriate time to explore female infertility? *Human Reproduction*, 19, 1689-1692.
80. Gnoth, C. Godehardt, D. Godehardt, E. Frank-Herrmann, P. and Freundl, G. (2003). Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18, 1959-1966.
81. Maroulis, G. B., (1991). Effect of aging on fertility and pregnancy. *Seminars in Reproductive Medicine*, 9(3), 165-175.

82. Nathan, G. Kose, L. and Speroff, H. (1999). *Clinical Gynecologic Endocrinology and infertility* (5 th edition). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1033-1048.
83. Fritz, M. A. and Speroff, L. (2011). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility* (8 th edition). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 1439.
84. Gardner, D. K. and Simón, C. (2017). *Handbook of In Vitro Fertilization* (Fourth edition). Boca Raton: CRC Press, 143-144.
85. Çalışkan, E. and Çakıroğlu, Y., (2011). Kontrollü Over Hiperstimulasyonu Protokolleri. Ö. Çelik (editörler). *Yardımcı Üreme Teknikleri*. Ankara: Nobel Kitabevi, 271-314.
86. Bayer, S. (2017). *The Boston IVF Handbook of Infertility: A Practical Guide for Practitioners Who Care for Infertile Couples, Fourth Edition*. New York: CRC Press, 78-92.
87. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, B.A. (2008). Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives. *Fertility and Sterility*, 90, S13-S20.
88. Shoham, Z. and Howles, C. M. (2017). Drugs used for ovarian stimulation: Clomiphene citrate, aromatase inhibitors, metformin, gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone analogs, and recombinant gonadotropins. Gardner, D. K. (editörler). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. Boca Raton: CRC Press, 119-145.
89. Gardner, D. K. Weissman, A. Howles, C. M. and Shoham, Z. (2017). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques Volume 2: Clinical Perspectives* (Fifth Edition). Boca Raton: CRC Press, 350-400.
90. Bahçeci, M. ve Uluğ, U., (2011). GnRH Antagonistleri. Ö. Çelik (editörler). *Yardımcı Üreme Teknikleri*. Adana: Nobel Kitabevi, 315-322.
91. van Loenen, A. C. D. Huirne, J. A. F. Schats, R. Hompes, P. G. A. and Lambalk, C. B. (2002). GnRH agonists, antagonists, and assisted conception. *Seminars in Reproductive Medicine*, 20, 349-364.
92. Berker, B. ve Çetinkaya, Ş.E ., (2011). KOH'da Folliküler Gelişimin Monitorizasyonu. Ö. Çelik (editörler). *Yardımcı Üreme Teknikleri*. Adana: Nobel Kitabevi, 331-350.
93. Pellicer, N. Galliano, D. and Pellicer, A., (2019). Ovarian Hyperstimulation Syndrome. P. C. K. Leung ve Adashi, E. Y. (editörler). *The Ovary (Third Edition)*. Academic Press, 345-362.
94. Whelan, J. G. and Vlahos, N. F. (2000). The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 73, 883-896.
95. Golan, A. Ron-el, R. Herman, A. Soffer, Y. Weinraub, Z. and Caspi, E. (1989). Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 44, 430-440.

96. Braat, D. D. M. Schutte, J. M. Bernardus, R. E. Mooij, T. M. and van Leeuwen, F. E. (2010). Maternal death related to IVF in the Netherlands 1984–2008. *Human Reproduction*, 25, 1782-1786.
97. Schenker, J. G. and Weinstein, D. (1978). Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertility and Sterility*, 30, 255-268.
98. Işık, A. Z., (2011). Ovaryan Hiperstimulasyon Sendromu Önleme, Tedavi ve Yeni Yaklaşımlar. Ö. Çelik (editörler). *Yardımcı Üreme Teknikleri*. Adana: Nobel Kitabevi, 447-456.
99. Brinsden, P. R. (1999). *A Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction: The Bourn Hall Guide to Clinical and Laboratory Practice*. Taylor & Francis, 131-155.
100. Rizk, B. (2006). *Ovarian Hyperstimulation Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Prevention and Management*. Cambridge: Cambridge University Press, 43-70.
101. Palumbo, A. Ávila, J. and Naftolin, F. (2016). The Ovarian Renin–Angiotensin System (OVRAS). *Reproductive Sciences*, 23, 1644-1655.
102. Delvigne, A. and Rozenberg, S. (2002). Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): A review. *Human Reproduction Update*, 8, 559-577.
103. Orvieto, R. Dratviman-Storobinsky, O. Lantsberg, D. Haas, J. Mashiach, R. and Cohen, Y. (2014). Interleukin-2 and SOCS-1 proteins involvement in the pathophysiology of severe ovarian hyperstimulation syndrome-a preliminary proof of concept. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), 1-6.
104. Spangelo, B. L. Isakson, P. C. and MacLeod, R. M. (1990). Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology*, 127, 403-409.
105. Adashi, E. Y. (1996). Immune Modulators in the Context of the Ovulatory Process: A Role for Interleukin-1. *American Journal of Reproductive Immunology*, 35, 190-194.
106. Motro, B. Itin, A. Sachs, L. and Keshet, E. (1990). Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 3092-3096.
107. Geva, E. Lessing, J. B. Lerner-Geva, L. Azem, F. Yovel, I. and Amit, A. (1997). Elevated levels of interleukin-6 in the follicular fluid at the time of oocyte retrieval for in vitro fertilization may predict the development of early-form ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 68, 133-137.
108. Revel, A. Barak, V. Lavy, Y. Anteby, E. Abramov, Y. Schenker, J. J. Amit, A. Finci-Yeheskel, Z. Mayer, M. Simon, A. Laufer, N. and Hurwitz, A. (1996). Characterization of intraperitoneal cytokines and nitrites in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and sterility*, 66(1), 66-71.

109. Andus, T. Gross, V. Holstege, A. Weber, M. Ott, M. Gerok, W. and Schölmerich, J. (1992). Evidence for the production of high amounts of interleukin-6 in the peritoneal cavity of patients with ascites. *Journal of Hepatology*, 15, 378-381.
110. Kutteh, W. H. and Kutteh, C. C. (1992). Quantitation of tumor necrosis factor- α , interleukin- β , and interleukin-6 in the effusions of ovarian epithelial neoplasms. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167, 1864-1869.
111. Orvieto, R. and Ben-Rafael, Z. (1998). Ovarian hyperstimulation syndrome: a new insight into an old enigma. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 5, 110-113.
112. Friedlander, M. A. de Mola, J. R. L. and Goldfarb, J. M. (1993). Elevated levels of interleukin-6 in ascites and serum from women with ovarian hyperstimulation syndrome *. *Fertility and Sterility*, 60, 826-833.
113. Kleespies, A. Guba, M. Jauch, K. W. and Bruns, C. J. (2004). Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 87, 95-104.
114. Ferrara, N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280, C1358-C1366.
115. Yancopoulos, G. D. Davis, S. Gale, N. W. Rudge, J. S. Wiegand, S. J. and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242-248.
116. Zhuang, G. and Ferrara, N., (2015). The VEGF receptor family. (editörler). *Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies*. Springer, 821-841.
117. Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25, 581-611.
118. Ferrara, N. Houck, K. Jakeman, L. and Leung, D. W. (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews*, 13, 18-32.
119. Senger, D. R. Galli, S. J. Dvorak, A. M. Perruzzi, C. A. Harvey, V. S. and Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (New York, N.Y.)*, 219, 983-985.
120. Groh, A. Jahn, K. Gröschl, M. Hillemacher, T. Kornhuber, J. Bleich, S. Frieling, H. and Heberlein, A. (2019). <i>Short Communication</i>: Interaction of Nerve Growth Factor (NGF) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Healthy Individuals. *Disease Markers*, 2019, 7510315.
121. Mercurio, A. M. (2019). VEGF/Neuropilin Signaling in Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 490.

122. Bikfalvi, A. (2004). Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology*, 68, 1017-1021.
123. Roskoski, R., Jr. (2008). VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375, 287-291.
124. Kendall, R. L. and Thomas, K. A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 10705-10709.
125. Terman, B. I. Dougher-Vermazen, M. Carrion, M. E. Dimitrov, D. Armellino, D. C. Gospodarowicz, D. and Böhlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187, 1579-1586.
126. Roskoski Jr, R. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 62, 179-213.
127. Zhu, X. and Zhou, W. (2015). The Emerging Regulation of VEGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 159-159.
128. Karkkainen, M. J. and Petrova, T. V. (2000). Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, 19, 5598.
129. Yazır, Y. (2007). Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf) Reseptörleri ve Fonksiyonlar. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 29, 128-136.
130. Phillips, H. S. Hains, J. Leung, D. W. and Ferrara, N. (1990). Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology*, 127, 965-967.
131. Ravindranath, N. Little-Ihrig, L. Phillips, H. S. Ferrara, N. and Zeleznik, A. J. (1992). Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology*, 131, 254-260.
132. Rizk, B. Aboulghar, M. Smits, J. and Ron-El, R. (1997). The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction Update*, 3, 255-266.
133. Neufeld, G. Cohen, T. Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, 13, 9-22.
134. Stephen Charnock-Jones, D. Sharkey, A. M. Rajput-Williams, J. Burch, D. Paul Schofield, J. Fountain, S. A. Boocock, C. A. and Smith, S. K. (1993). Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biology of Reproduction*, 48, 1120-1128.

135. Kofler, N. Naiche, L. A. Zimmerman, L. D. and Kitajewski, J. K. (2019). Inhibition of Jagged-Specific Notch Activation Reduces Luteal Angiogenesis and Causes Luteal Hemorrhaging of Hormonally Stimulated Ovaries. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 2, 325-332.
136. Gordon, J. D. Mesiano, S. Zaloudek, C. J. and Jaffe, R. B. (1996). Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 353-359.
137. Müller, K. Ellenberger, C. and Schoon, H. A. (2009). Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. *Research in Veterinary Science*, 87, 421-431.
138. Gaafar, S. El-Gezary, D. and El Maghraby, H. (2014). Early onset of cabergoline therapy for prophylaxis against ovarian hyperstimulation syndrome; a potentially safer and more effective protocol. *Fertility and Sterility*, 102, e308.
139. Rollene, N. L. Amols, M. H. Hudson, S. B. A. and Coddington, C. C. (2009). Treatment of ovarian hyperstimulation syndrome using a dopamine agonist and gonadotropin releasing hormone antagonist: a case series. *Fertility and Sterility*, 92, 1169.e1115.
140. Fatemi, H. Popovic-Todorovic, B. Humaidan, P. Kol, S. Banker, M. Devroey, P. and García-Velasco, J. (2014). Severe ovarian hyperstimulation syndrome after gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist trigger and “freeze-all” approach in GnRH antagonist protocol. *Fertility and Sterility*, 101, 1008-1011.
141. Abotaleb, M. Samuel, S. M. Varghese, E. Varghese, S. Kubatka, P. Liskova, A. and Busselberg, D. (2018). Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers (Basel)*, 11.
142. Peterson, J. and Dwyer, J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18, 1995-2018.
143. Russo, M. Spagnuolo, C. Tedesco, I. Bilotto, S. and Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*, 83, 6-15.
144. Sirotkin, A. V. Hrabovszká, S. Štochmalová, A. Grossmann, R. Alwasel, S. and Halim Harrath, A. (2019). Effect of quercetin on ovarian cells of pigs and cattle. *Animal Reproduction Science*, 205, 44-51.
145. Nishimuro, H. Ohnishi, H. Sato, M. Ohnishi-Kameyama, M. Matsunaga, I. Naito, S. Ippoushi, K. Oike, H. Nagata, T. Akasaka, H. Saitoh, S. Shimamoto, K. and Kobori, M. (2015). Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, 7, 2345-2358.
146. Williams, R. J. Spencer, J. P. E. and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.

147. Ożarowski, M. Mikołajczak, P. Ł. Kujawski, R. Wielgus, K. Klejewski, A. Wolski, H. and Seremak-Mrozikiewicz, A. (2018). Pharmacological effect of quercetin in hypertension and its potential application in pregnancy-induced hypertension: review of in vitro, in vivo, and clinical studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (2018), 7421489.
148. Tang, S. M. Deng, X. T. Zhou, J. Li, Q. P. Ge, X. X. and Miao, L. (2020). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, 109604.
149. Donnini, S. Finetti, F. Lusini, L. Morbidelli, L. Cheynier, V. Barron, D. Williamson, G. Waltenberger, J. and Ziche, M. (2006). Divergent effects of quercetin conjugates on angiogenesis. *British Journal of Nutrition*, 95, 1016-1023.
150. D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 106, 256-271.
151. De Souza, R. F. and De Giovani, W. F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9, 97-104.
152. Heijnen, C. G. M. Haenen, G. R. M. M. Minou Oostveen, R. Stalpers, E. M. and Bast, A. (2002). Protection of Flavonoids Against Lipid Peroxidation: The Structure Activity Relationship Revisited. *Free Radical Research*, 36, 575-581.
153. Hanasaki, Y. Ogawa, S. and Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 845-850.
154. Heijnen, C. Haenen, G. Van Acker, F. Van der Vijgh, W. and Bast, A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicology in Vitro*, 15, 3-6.
155. Ansari, M. A. Abdul, H. M. Joshi, G. Opii, W. O. and Butterfield, D. A. (2009). Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1–42): relevance to Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 269-275.
156. Begum, A. N. and Terao, J. (2002). Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocyte deformability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 265-272.
157. McAnulty, S. R. McAnulty, L. S. Nieman, D. C. Quindry, J. C. Hosick, P. A. Hudson, M. H. Still, L. Henson, D. A. Milne, G. L. and Morrow, J. D. (2008). Chronic quercetin ingestion and exercise-induced oxidative damage and inflammation. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33, 254-262.
158. Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 937-942.

159. Yoon, J. S. Chae, M. K. Lee, S. Y. and Lee, E. J. (2012). Anti-inflammatory effect of quercetin in a whole orbital tissue culture of Graves' orbitopathy. *British Journal of Ophthalmology*, 96, 1117-1121.
160. Leyva-López, N. Gutierrez-Grijalva, E. P. Ambriz-Perez, D. L. and Heredia, B. J. (2016). Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 921.
161. Jeong, D. Yang, W. S. Yang, Y. Nam, G. Kim, J. H. Yoon, D. H. Noh, H. J. Lee, S. Kim, T. W. and Sung, G. H. (2013). In vitro and in vivo anti-inflammatory effect of *Rhodomyrtus tomentosa* methanol extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 205-213.
162. Mueller, M. Hobiger, S. and Jungbauer, A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*, 122, 987-996.
163. Ribeiro, D. Freitas, M. Tomé, S. M. Silva, A. M. Laufer, S. Lima, J. L. and Fernandes, E. (2015). Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. *Inflammation*, 38, 858-870.
164. Egert, S. Bosy-Westphal, A. Seiberl, J. Kürbitz, C. Settler, U. Plachta-Danielzik, S. Wagner, A. E. Frank, J. Schrezenmeir, J. and Rimbach, G. (2009). Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition*, 102, 1065-1074.
165. Zheng, J. Wu, J. Chen, J. Liu, J. Lu, Y. Huang, C. Hu, G. Wang, X. and Zeng, Y. (2016). Therapeutic effects of quercetin on early inflammation in hypertriglyceridemia-related acute pancreatitis and its mechanism. *Pancreatology*, 16, 200-210.
166. Panicker, S. R. Sreenivas, P. Babu, M. S. Karunakaran, D. and Kartha, C. C. (2010). Quercetin attenuates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in glucose primed aortic endothelial cells through NF- κ B and AP-1. *Pharmacological Research*, 62, 328-336.
167. Mkhize, N. V. P. Qulu, L. and Mabandla, M. V. (2017). The effect of quercetin on pro-and anti-inflammatory cytokines in a prenatally stressed rat model of febrile seizures. *Journal of Experimental Neuroscience*, 11, 1179069517704668.
168. Li, X. Chen, Y. Wang, L. Shang, G. Zhang, C. Zhao, Z. Zhang, H. and Liu, A. (2016). Quercetin alleviates pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(7), e5326.
169. Scambia, G. Panici, P. B. Ranelletti, F. O. Ferrandina, G. de Vincenzo, R. Piantelli, M. Masciullo, V. Bonanno, G. Isola, G. and Mancuso, S. (1994). Quercetin enhances transforming growth factor β 1, secretion by human ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 57, 211-215.

170. Dian, L. Yu, E. Chen, X. Wen, X. Zhang, Z. Qin, L. Wang, Q. Li, G. and Wu, C. (2014). Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles. *Nanoscale Research Letters*, 9, 2406-2406.
171. Maso, V. Calgarotto, A. K. Franchi, G. C. Nowill, A. E. Filho, P. L. Vassallo, J. and Saad, S. T. O. (2014). Multitarget Effects of Quercetin in Leukemia. *Cancer Prevention Research*, 7, 1240-1250.
172. Rivera, A. R. Castillo-Pichardo, L. Gerena, Y. and Dharmawardhane, S. (2016). Anti-breast cancer potential of quercetin via the Akt/AMPK/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *PLoS ONE*, 11, e0157251.
173. Zhai, J. Liu, J. Cheng, X. Li, S. Hong, Y. Sun, K. Chen, Z. Du, Y. and Li, W. (2017). Zinc finger gene 217 (ZNF217) Promoted Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) through Regulating e 2 Synthesis and Inhibiting Thrombospondin-1 (TSP-1). *Scientific Reports*, 7, 3245.
174. Yang, F. Jiang, X. Song, L. Wang, H. Mei, Z. Xu, Z. and Xing, N. (2015). Quercetin inhibits angiogenesis through thrombospondin-1 upregulation to antagonize human prostate cancer PC-3 cell growth in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 35, 1602-1610.
175. Zhao, X. Wang, Q. Yang, S. Chen, C. Li, X. Liu, J. Zou, Z. and Cai, D. (2016). Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *European Journal of Pharmacology*, 781, 60-68.
176. Jia, L. Huang, S. Yin, X. Zan, Y. Guo, Y. and Han, L. (2018). Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction. *Life Sciences*, 208, 123-130.
177. Ożarowski, M. Mikołajczak, P. Kujawski, R. Wielgus, K. Klejewski, A. Wolski, H. and Seremak-Mrozikiewicz, A. (2018). Pharmacological Effect of Quercetin in Hypertension and Its Potential Application in Pregnancy-Induced Hypertension: Review of In Vitro, In Vivo, and Clinical Studies. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 7421489.
178. Kitajima, Y. Endo, T. Manase, K. Nishikawa, A. Shibuya, M. and Kudo, R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone agonist administration reduced vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and vascular permeability of the ovaries of hyperstimulated rats. *Fertility and Sterility*, 81(1), 842-849.
179. Ozgur, S. Oktem, M. Altinkaya, O. S. Oktem, E. Cenksoy, C. Erdem, O. Elbeg, S. Helvacı, A. Erdem, A. and Erdem, M. (2018). The effects of resveratrol on ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 57(3), 383-388.
180. Haleagrahara, N. Radhakrishnan, A. Lee, N. and Kumar, P. (2009). Flavonoid quercetin protects against swimming stress-induced changes in oxidative biomarkers in the hypothalamus of rats. *European Journal of Pharmacology*, 621, 46-52.

181. Jahan, S. Abid, A. Khalid, S. Afsar, T. Qurat Ul, A. Shaheen, G. Almajwal, A. and Razak, S. (2018). Therapeutic potentials of Quercetin in management of polycystic ovarian syndrome using Letrozole induced rat model: a histological and a biochemical study. *Journal of Ovarian Research*, 11(1), 1-10.
182. Woodruff, T. K. D'Agostino, J. Schwartz, N. B. and Mayo, K. E. (1988). Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science*, 239, 1296-1299.
183. Scotti, L. Irusta, G. Abramovich, D. Tesone, M. and Parborell, F. (2011). Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist affects corpus luteum vascular stability and development and induces luteal apoptosis in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335, 116-125.
184. Pala, S. Atilgan, R. Ozkan, Z. S. Kavak, S. B. Ilhan, N. Akpolat, N. and Sapmaz, E. (2015). Effect of varying doses of tamoxifen on ovarian histopathology, serum VEGF, and endothelin 1 levels in ovarian hyperstimulation syndrome: an experimental study. *Drug Design Development and Therapy*, 9, 1761-1766.
185. Taskin, M. I. Topcu, O. Yay, A. Erken, G. Balcioglu, E. Adali, E. and Hismiogullari, A. A. (2015). Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model: comparison of the efficacy of tocilizumab with that of ranibizumab, cabergoline, and a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Gynecological Endocrinology*, 31, 949-954.
186. Sheahan, A. V. Biankin, A. V. Parish, C. R. and Khachigian, L. M. (2018). Targeted therapies in the management of locally advanced and metastatic pancreatic cancer: a systematic review. *Oncotarget*, 9, 21613-21627.
187. Scotti, L. Abramovich, D. Pascuali, N. Irusta, G. Meresman, G. Tesone, M. and Parborell, F. (2014). Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 392-401.
188. Pietro, M. Pascuali, N. Scotti, L. Irusta, G. Bas, D. May, M. Tesone, M. Abramovich, D. and Parborell, F. (2017). In vivo intrabursal administration of bioactive lipid sphingosine- 1-phosphate enhances vascular integrity in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular Human Reproduction*, 23(6), 417–427.
189. Cenksoy, C. Cenksoy, P. O. Erdem, O. Sancak, B. and Gursoy, R. (2014). A potential novel strategy, inhibition of vasopressin-induced VEGF secretion by relcovaptan, for decreasing the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in the hyperstimulated rat model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 174, 86-90.

190. Tamura, H. Takasaki, A. Taketani, T. Tanabe, M. Lee, L. Tamura, I. Maekawa, R. Aasada, H. Yamagata, Y. and Sugino, N. (2014). Melatonin and female reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40, 1-11.
191. Abedal-Majed, M. A. and Cupp, A. S. (2019). Livestock animals to study infertility in women. *Animal Frontiers*, 9, 28-33.
192. Kasap, E. Turan, G. A. Eskicioglu, F. Cengiz, H. Gur, E. B. Sivrikoz, O. N. Genc, M. and Yilmaz, O. (2016). Comparison between resveratrol and cabergoline in preventing ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Gynecological Endocrinology*, 32, 634-640.
193. Akman, L. Sahin, G. Erbas, O. Aktug, H. Akdogan, A. Goker, E. N. T. Taskiran, D. and Tavmergen, E. (2015). Comparison of montelukast and cabergoline for prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: in an experimental rat model. *Gynecological Endocrinology*, 31, 369-373.
194. Chuderland, D. Ben-Ami, I. Kaplan-Kraicer, R. Grossman, H. Ron-El, R. and Shalgi, R. (2013). The role of pigment epithelium-derived factor in the pathophysiology and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98, 66.
195. Quintana, R. Kopcow, L. Marconi, G. Young, E. Yovanovich, C. and Paz, D. A. (2008). Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Fertility Sterility*, 90, 1511-1516.
196. Wei, L. Chou, C. Chen, M. Rose-John, S. Kuo, M. Chen, S. and Yang, Y. (2013). The role of IL-6 trans-signaling in vascular leakage: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome in a murine model. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(3):E472-84.

EKLER

EK-1. Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 18/03/2019-E.35743



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Suna ÖMEROĞLU, İsmail TÜRKOĞLU, Tuncay Veysel PEKER, Mürşide Ayşe DEMİREL, Müşerref Şeyma CEYHAN'dan oluşan G.Ü.ET-19.017 kod numaralı ve "*Deneyisel Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu Modelinde Kersetinin Yapısal ve Vasküler Değişiklikler Üzerine Etkisinin İncelenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-19.017 and entitled "*Investigation of Effect of Quercetin on Structural and Vascular Changes in Experimental Ovarian Hyperstimulation Syndrome Model*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 28

Ek: 1 Liste

EK-1. (devam) Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 08/03/2019		TOPLANTI SAYISI : 02	
ADI-SOYADI			
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

EK-2. Etik Kurul Sertifikası

 **XIV. DENEY HAYVANLARI
UYGULAMA VE ETİK KURSU**
30 EKİM – 07 KASIM 2013

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, İsmail TÜRKOĞLU

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile
Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yerleştirme ve
DeneySEL Araştırmalar Merkezi tarafından
30 Ekim - 7 Kasım 2013 tarihleri arasında düzenlenen
Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XIV'e katılarak,
Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve
bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Türkoğlu, İsmail
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Ü. Tıp Fak Histoloji-Embriyoloji	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Ü. Tıp Fak Histoloji-Embriyoloji	2015
Lisans	A.İ.B.Ü. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji	2009
Lise	Ataköy Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-Devam ediyor	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Teknoloji, Bilgisayar oyunları, Kitap, Doğa yürüyüşü



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

