



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OHSS MODELİNDE KİSSPEPTİN-54
UYGULAMASININ GRANÜLOZA HÜCRELERİNDEKİ VEGF
VE PEDF SEVİYELERİNE ETKİSİ**

HAZIRLAYAN: HÜLYA BİRİNCİ
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

MANİSA-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OHSS MODELİNDE KİSSPEPTİN-54
UYGULAMASININ GRANÜLOZA HÜCRELERİNDEKİ VEGF
VE PEDF SEVİYELERİNE ETKİSİ**

HAZIRLAYAN: HÜLYA BİRİNCİ
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

PROF. DR. KEMAL ÖZBİLGİN
PROF. DR. NECİP KUTLU
PROF. DR. MEHMET YÜNCÜ
PROF. DR. FERAL ÖZTÜRK

MANİSA-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

HÜLYA BİRİNCİ



TEŞEKKÜR

Bu tez TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından 218S918 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Doktora tez çalışmamın ortaya çıkmasında ve gerçekleşmesinde büyük özveri ve katkıları bulunan, doktora eğitimim süresince her daim yol gösteren, sabır ve anlayışla manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda destek veren değerli hocalarım Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU ve Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca her zaman beni destekleyen, arkamda duran, bilgi ve deneyimlerini aktaran çok değerli hocam Gaziantep Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ'ye,

Sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Uzm. Bio. Başak SİMİTÇİOĞLU ve Arş. Gör. Şeyda Nur BERK'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımları bulunan asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Hilal KABADAYI ENSARİOĞLU ve Arş. Gör. Dr. Tuna ÖNAL'a,

Doktora eğitimimin her anında sevgisi ve saygısıyla yanımda olan, tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, acı tatlı her anımı paylaştığım, hayat yolculuğunda birlikte yürüdüğüm yol arkadaşım Arş. Gör. Mustafa ÖZTATLICI'ya,

Beni bu günlere getiren, büyük fedakarlıklarla beni yetiştiren, hayatımdaki en değerli varlıklarım canım ANNEM, BABAM ve KARDEŞLERİM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız.

HÜLYA BİRİNCİ

KISALTMALAR VE SİMGELER

AC	: Adenilat Siklaz
AKT	: Protein Kinaz B
AMH	: Antimüllerien Hormon
ARC	: Arkuat çekirdek
AVPV	: Anteroventral paraventriküler çekirdek
bFGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP15	: Kemik Morfogenik Protein-15
BMP2	: Kemik Morfogenik Protein-2
BMP4	: Kemik Morfogenik Protein-4
BMP7	: Kemik Morfogenik Protein-7
BMP8	: Kemik Morfogenik Protein-8
cAMP	: siklik Adenozin Monofosfat
Cx37	: Konneksin 37
Cx43	: Konneksin 43
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK1/2	: Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Protein Kinazlar 1 ve 2
FIGLA	: Germ Hattındaki Faktör alfa
FOXL2	: Forkhead box L2
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GDF-9	: Büyüme Farklılaşma Faktörü-9
GIFT	: Gamet İntrafallopian Transfer
GnRH	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
GnRH_a	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon agonisti
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF	: İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü
IL-1	: İnterlökin-1
IL-2	: İnterlökin-2
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8

IUI	: İnteruterin İnseminasyon
IVF	: İnter vitro Fertilizasyon
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
KISS1R	: Kisspeptin Reseptörü
KL	: Kit Ligand
KOH	: Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon
LH	: Luteinleştirici Hormon
LHR	: Luteinleştirici Hormon Reseptörü
LOD	: Laparoskopik Ovaryan Drilling
LPA	: Lizofosfatidik asit
mTOR	: Rapamisin Memeli Hedefi
OHSS	: Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu
OMI	: Oosit Maturasyon İnhibitörü
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEDF	: Pigment Epiteli Kaynaklı Faktör
PI3K	: Fosfatidil inositol 3-OH-kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PKOS	: Polikistik Over Sendromu
POF	: Prematüre Ovaryan Yetmezlik
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDF-1	: Stromal Türevli Faktör-1
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
TSC1	: Tuberoz Skleroz Kompleksi 1
TSC2	: Tuberoz Skleroz Kompleksi 2
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR1	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 1
VEGFR2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
VPF	: Vasküler Geçirgenlik Faktörü
YÜT	: Yardımlı Üreme Teknikleri
ZIFT	: Zigot İnterfallopian Transfer

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTIMA VE SİMGELER	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
RESİM DİZİNİ	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	6
4.1. OVARYUM	6
4.1.1. Anatomisi	7
4.1.2. Histolojisi	8
4.1.3. Fizyolojisi	13
4.2. OVARYUM GELİŞİMİ VE OOGENEZ	16
4.3. FOLİKÜLOGENEZ	18
4.4. İNFERTİLİTE	22
4.4.1. Kadın İnfertilitesi	23
4.4.2. İnfertilite Tedavisi	26
4.5. KONTROLLÜ OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON	27
4.6. OVARYAN HİSPERSTİMÜLASYON SENDROMU	30
4.6.1. Tanımı	30
4.6.2. Sınıflandırılması	31
4.6.3. Patofizyolojisi	33
4.6.4. Risk Faktörleri	38

4.6.5. Önlenmesi	40
4.7. KİSSPEPTİNLER	44
4.7.1. Kisspeptinlerin Ovaryum ile İlişkisi	46
4.7.2. Kisspeptinler ve Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu	49
5. GEREÇ VE YÖNTEM	50
5.1. DENEYSEL OHSS MODELİ OLUŞTURULMASI.....	50
5.2. ÇALIŞMA GRUPLARI	50
5.3. KAN ÖRNEKLERİNİN ELISA İLE ANALİZİ	52
5.3.1. Serumların Eldesi	52
5.3.2. ELISA ile FSH Analizi	53
5.3.3. ELISA ile LH Analizi	53
5.4. SOL OVARYUM DOKULARININ HİSTOLOJİK ANALİZİ	54
5.4.1. Sol Ovaryum Dokularının Alınması ve Parafin Doku Takibi	54
5.4.2. Sol Ovaryum Dokularından Kesitlerin Alınması	54
5.4.3. Sol Ovaryum Dokularının Morfolojik Analizi	55
5.4.4. Sol Ovaryum Dokularının Hacminin Hesaplanması	56
5.4.5. Sol Ovaryum Dokularının Folikül Sayılarının Hesaplanması	57
5.4.6. Sol Ovaryum Dokularının İmmünohistokimyasal Analizi.....	58
5.5. SAĞ OVARYUM DOKULARINDAN ALINAN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDEN KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR) ANALİZİ	59
5.5.1. Granüloza Hücrelerinin Eldesi	59
5.5.2. Granüloza Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	59
5.5.3. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	60
5.5.4. qRT-PCR Analizi	61
5.6. SAĞ OVARYUM DOKULARINDAN ALINAN OOSİTLERİN İMMÜNOFLORESAN ANALİZİ	62
5.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	63
6. BULGULAR	64
6.1. DENEYSEL GRUPLARIN OLUŞTURULMASI	64
6.2. VÜCUT AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	66

6.3. OVARYUM AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	67
6.4. ELISA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	69
6.4.1. FSH Analizi Sonuçları	69
6.4.2. LH Analizi Sonuçları	69
6.5. HİSTOLOJİK ANALİZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ..	70
6.5.1. Ovaryum Morfolojilerinin Değerlendirilmesi	70
6.5.2. Ovaryum Hacimlerinin Değerlendirilmesi	73
6.5.3. Ovaryum Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi	73
6.5.4. Ovaryumların İmmünohistokimyasal Analizlerinin Değerlendirilmesi...	76
6.5.4.1. VEGF	77
6.5.4.2. PEDF	84
6.5.4.3. PKA	92
6.5.4.4. PKC	99
6.6. GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN qRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	108
6.6.1. VEGF Bulguları	108
6.6.2. PEDF Bulguları	109
6.6.3. PKA Bulguları	111
6.6.4. PKC Bulguları	112
6.7. OOSİT İMMÜNOFLORESAN BOYAMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	113
7. TARTIŞMA	115
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	128
9. KAYNAKLAR	130
10. EKLER	145
11. ÖZGEÇMİŞ	148

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Ovaryum anatomisi	7
Şekil 2. Ovaryan foliküllerin şematik gösterimi. a. Primordiyal folikül, b. Geç primer folikül, c. Sekonder folikül, d. Graaf folikülü	11
Şekil 3. Ovaryumun şematik gösterimi	13
Şekil 4. Menstrual döngünün günleri ve etkili hormon düzeyleri	16
Şekil 5. Kemirgenlerde primordiyal folikül aktivasyonunun düzenlenmesi	20
Şekil 6. Oogenez ve foliküler gelişim aşamaları	22
Şekil 7. OHSS patofizyolojisi	31
Şekil 8. hCG aracılı PEDF ve VEGF sinyalizasyonunun şematik gösterimi	38
Şekil 9. Kisspeptin tipleri	45
Şekil 10. Kisspeptin nöronlarının östrojen ile düzenlenmesi. Kp: Kisspeptin ARC: Arkuat çekirdek AVPV: Anteroventral periventriküler çekirdek	48
Şekil 11. Ovaryan alan hesabı için kullanılan şablon (Örnek gösterimdir)	56
Şekil 12. Tüm grupların vücut ağırlığı değişimi grafiği (n=6). Sham grubu deney protokolü esnasında en fazla kilo alan grup olurken; stimüle edilmiş kontrol grubu en az kilo alan grup olarak belirlendi. OHSS grubu kontrol grubuna göre daha fazla kilo alırken KK ve UK gruplarından daha düşük kilo değişimi gösterdi. OHSS ve KK grupları arasındaki kilo değişimi farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken; OHSS ve UK grupları arasındaki kilo değişim farkları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. * p<0,033, **p<0,002, ***p<0,0001	67
Şekil 13. Tüm grupların ovaryum ağırlığı grafiği. Ovaryum ağırlığının, sham grubunda en düşük, OHSS grubunda ise en yüksek olduğu belirlendi. Kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol grubu ile OHSS, KK ve UK grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu saptandı. **p<0,002, ***p<0,0001	68
Şekil 14. Tüm gruplara ait VEGF Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. P<0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * p<0,033, **p<0,002, ***p<0,0001	109

Şekil 15. Gruplara ait PEDF Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. $P < 0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0001$
.....110

Şekil 16. Gruplara ait PKA Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. $P < 0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * $p < 0,033$, ** $p < 0,002$
.....111

Şekil 17. Gruplara ait PKC Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. $P < 0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * $p < 0,033$, ** $p < 0,002$
.....113



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Hastalık ile ilişkili infertilite nedenleri	24
Tablo 2. OHSS sınıflandırması ve klinik belirtileri	32
Tablo 3: Deney grupları ve deney protokolü	52
Tablo 4. Parafin doku takibi protokolü	55
Tablo 5. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı	60
Tablo 6. cDNA sentez basamakları	60
Tablo 7. qRT-PCR için kullanılan primerler	61
Tablo 8. qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı	61
Tablo 9. qPCR amplifikasyon basamakları	62
Tablo 10. Tüm grupların vücut ağırlığı değişimi (ortalama \pm std sapma)	66
Tablo 11. Tüm grupların ovaryum ağırlıkları (ortalama \pm std sapma)	68
Tablo 12. Tüm deney gruplarına ait FSH ve LH için ELISA analizi sonuçları (ortalama \pm std sapma)	70
Tablo 13. Tüm deney gruplarına ait ovaryum hacim sonuçları (ortalama \pm std sapma)	73
Tablo 14. Tüm deney gruplarına ait folikül sayıları (% ortalama \pm std sapma)	76
Tablo 15. Tüm gruplara ait VEGF immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama \pm std sapma)	84
Tablo 16. Tüm gruplara ait PEDF immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama \pm std sapma)	92
Tablo 17. Tüm gruplara ait PKA immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama \pm std sapma)	99
Tablo 18. Tüm gruplara ait PKC immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama \pm std sapma)	107
Tablo 19. Tüm gruplara ait VEGF relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)	109

Tablo 20. Tüm gruplara ait PEDF relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)	110
Tablo 21. Tüm gruplara ait PKA relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)	112
Tablo 22. Tüm gruplara ait PKC relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)	113



RESİM DİZİNİ

- Resim 1.** Tüm gruplara ait fallop tüplerinin ve ovaryumların görüntüleri. Sham grubu (A), Kontrol grubu (B), OHSS grubu (C), KK grubu (D), UK grubu (E). Ok başları: Fallop tüpleri. Oklar: Ovaryumlar65
- Resim 2.** Sham (A-B), Kontrol (C-D), OHSS (E-F), KK (G-H) ve UK (I-J) gruplarına ait ovaryum kesitlerinin Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri. Kırmızı ok başı: Primordiyal folikül. Sarı ok: Erken primer folikül. Kırmızı ok: Geç primer folikül. Siyah ok başı: Sekonder folikül. Siyah ok: Graaf folikülü. Sarı yıldız: korpus hemorajikum. Siyah yıldız: Korpus luteum. Mavi ok başı: Atretik folikül. Sarı ok başı: Kistik folikül. Mavi yıldız: Teka eksterna. Mavi ok: Genişlemiş kan damarları. Ölçek A,C,E,G,I 100µm; B,D,F,H,J 50µm72
- Resim 3.** Sham grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm81
- Resim 4.** Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm81
- Resim 5.** OHSS grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm82
- Resim 6.** KK grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm82
- Resim 7.** UK grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm83
- Resim 8.** Sham grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm89
- Resim 9.** Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm89
- Resim 10.** OHSS grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm90
- Resim 11.** KK grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm90
- Resim 12.** UK grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm91

Resim 13. Sham grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	96
Resim 14. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	97
Resim 15. OHSS grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	97
Resim 16. KK grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	98
Resim 17. UK grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	98
Resim 18. Sham grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	104
Resim 19. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	104
Resim 20. OHSS grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	105
Resim 21. KK grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	105
Resim 22. UK grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm	106
Resim 23. Kontrol (A-C), Sham (D-F), OHSS (G-I), KK (J-L) ve UK (M-O) gruplarına ait oositlerin faz kontrast (A, D, G, J, M), DAPI (B, E, H, K, N) ve α-tubulin (C, F, I, L, O) görüntüleri. Yeşil: α-tubulin. Mavi: Çekirdek. Ölçek: 100 µm	114

Tezin başlığı: Deneysel OHSS Modelinde Kisspeptin-54 Uygulamasının Granüloza Hücrelerindeki VEGF ve PEDF Seviyelerine Etkisi

Öğrencinin adı: Hülya BİRİNCİ

Danışmanı: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Anabilim Dalı: Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: OHSS modeli oluşturulmuş sıçanlarda, Kisspeptin-54'ün, ovaryum morfolojisine ve VEGF, PEDF, PKA ve PKC seviyelerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İmmatür dişi Sprague-dawley sıçanları (n=30, 25 günlük, 30-40gr) rastgele 5 gruba (kontrol, sham, OHSS modeli, kısa süreli kisspeptin-54 uygulanmış OHSS modeli ve uzun süreli kisspeptin-54 uygulanmış OHSS modeli) ayrıldı. Serum LH ve FSH seviyeleri ELISA ile belirlendi. Sağ ovaryumlardan oositler ve granüloza hücreleri izole edilerek VEGF, PEDF, PKA, PKC için qRT-PCR analizi yapıldı. Oositler alfa-tübülin için immünofloresan yöntem ile boyandı. Sol ovaryum dokuları morfolojik olarak ve VEGF, PEDF, PKA, PKC için immünohistokimyasal yöntemler ile değerlendirildi.

Bulgular: OHSS grubunda, fallop tüplerinde dilatasyon, ovaryumlarda anormal ağırlık ve hacim artışı gözlemlendi. Kısa ve uzun süreli Kisspeptin-54 uygulanan gruplarda etkilerin azaldığı belirlendi. OHSS grubunda, gelişmekte olan foliküllerin ve korpus luteumların azaldığı, kistik ve atretik foliküllerin arttığı gözlenirken, Kisspeptin-54 uygulanan gruplarda, gelişen folikül sayılarının ve korpus luteumun arttığı, atretik ve kistik foliküllerin azaldığı saptandı. OHSS grubundaki granüloza hücrelerinde VEGF, PKA, PKC seviyeleri mRNA ve protein düzeyinde artış gösterirken, PEDF seviyelerinin düştüğü belirlendi. Kisspeptin-54 uygulanan gruplarda bu etkilerin iyileştiği bulundu. Oositlerin tüm gruplarda immatür olduğu, olgun oositlerin kesimden önce ovulasyona uğradığı gözlemlendi. Uzun tedavi protokolünün kısa tedavi protokolünden daha etkili olduğu belirlendi.

Sonuçlar: Kisspeptin-54'ün OHSS bulgularını azaltan etkilere sahip olduğu belirlendi. Kisspeptin-54'ün OHSS riskli kadınlarda oosit matürasyonunu tetikleyebilen bir aracı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kisspeptin-54, OHSS, PEDF, VEGF, PKA, PKC

Title: Effect of Kisspeptin-54 Treatment on VEGF and PEDF Levels in Granulosa Cells in Experimental OHSS Model

Student name: Hülya BİRİNCİ

Supervisor: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Department: Histology and Embryology

2. ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to investigate the effect of Kisspeptin-54 on ovarian morphology and VEGF, PEDF, PKA and PKC levels in OHSS rat model.

Material and method: Immature female Sprague-dawley rats (n=30, 25 days old, 30-40gr) were randomly divided into 5 groups (control, sham, OHSS model, short-term kisspeptin-54 administrated OHSS model and long-term kisspeptin-54 administrated OHSS model). Serum LH and FSH levels were determined by ELISA. qRT-PCR analysis was performed for VEGF, PEDF, PKA, PKC in isolated oocytes and granulosa cells from right ovaries. Oocytes were stained with an immunofluorescence method for alpha-tubulin. Left ovarian tissues were evaluated morphologically and by immunohistochemical methods for VEGF, PEDF, PKA, PKC.

Results: In OHSS group, dilatation in fallopian tubes, abnormal increase in weight and volume in ovaries were observed. It was determined that effects decreased in short- and long-term Kisspeptin-54 administrated groups. It was observed that while developing follicles and corpus luteums decreased, cystic and atretic follicles increased in OHSS group, developing follicle and corpus luteum increased and atretic and cystic follicles decreased in Kisspeptin-54 administrated groups. It was found that VEGF, PKA, PKC levels increased in mRNA and protein levels, while PEDF levels decreased in granulosa cells in OHSS group. It was indicated that these effects improved in Kisspeptin-54 groups. It was observed that oocytes were immature in all groups and mature oocytes were ovulated before sacrifice. It was determined that long-term Kisspeptin-54 administrated group was more effective than short-term administration.

Conclusions: It was determined that Kisspeptin-54 had reducing of OHSS symptoms. Kisspeptin-54 is thought to be an agent that can be trigger oocyte maturation in women at risk of OHSS.

Key words: Kisspeptin-54, OHSS, PEDF, VEGF. PKA, PKC

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS), Yardımlı Üreme Teknikleri (YÜT) sırasında kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunun (KOH) hayatı tehdit eden iyatrojenik bir komplikasyonudur. Luteal faz (erken başlayan OHSS) veya erken hamilelik (geç başlayan OHSS) sırasında ortaya çıkabilmektedir. KOH, YÜT başarı oranını arttırmak için birden fazla ovaryan follikülü üretmeyi amaçlamaktadır. Sendrom, bulguların şiddetine ve semptomlarına göre sınıflandırılmaktadır. OHSS'nin hafif, orta, şiddetli ve klinik olmak üzere 4 sınıfı bulunmaktadır. Hafif OHSS vakalarında karın şişkinliği ve hafif asit gözlenirken orta OHSS vakalarında ultrasonda asit belirtisi, orta derecede karın ağrısı ve bulantı/kusma gözlenmektedir. Şiddetli OHSS vakalarında ise klinik asit, oligoüri, 0,45'ten yüksek hematokrit değeri, hiponatremi, hipoozmolarite ve hiperkalemi vardır. Klinik OHSS vakalarında da gergin karın, geniş hidrotoraks, 0,55'ten yüksek hematokrit değeri, tromboembolizm, akut solunum güçlüğü gözlenmektedir. Veriler, tüm in vitro fertilizasyon (IVF) sikluslarında hafif OHSS insidansının % 20-33, orta OHSS insidansının % 3-6 ve şiddetli ve klinik OHSS insidansının % 0,1-% 2 olduğunu bildirmektedir. Orta, şiddetli ve yaşamı tehdit eden OHSS'nin klinik bulguları, anjiyotensin ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) gibi vazoaktif maddelerin fazlaca üretilmesine bağlı kılcal membranın geçirgenliğinin artması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu anjiyojenik faktörler ile intravasküler sıvı, interstisyel alanlara geçiş yapar, kan basıncı düşer. Bu da karında asit, plevral efüzyon, hipotansiyon, çoklu organ yetmezliği, akut böbrek yetmezliğine bağlı oligüri ve tromboemboli ile sonuçlanmaktadır. Ovaryum büyüklüğündeki artış ve çok sayıda luteal kistin varlığı OHSS'nin erken dönemlerinde adneksiyal torsiyona neden olabilmektedir.

OHSS'nin önlenmesi için GnRH agonistlerinin (GnRHa) kullanımı, düşük doz İnsan koryonik Gonadotropin (hCG) uygulaması, luteal fazda steroid desteği, kisspeptin uygulaması ve rekombinant insan LH uygulaması gibi metodların kullanıldığı araştırmalar yer almaktadır. Günümüzde araştırmacılar, OHSS'yi önlemek

için, oosit olgunlaştırma işleminde hCG yerine GnRHa kullanımını önermektedir. Bununla birlikte, OHSS'nin, GnRHa'yı kullanan çok yüksek riskli bireylerde de görülebildiği raporlanmıştır. Klinik çalışmalarda kullanılan diğer bir ortak strateji, embriyo kriyoprezervasyonudur. Bu yöntem endojen hCG'nin yol açtığı OHSS'in geç formunun önüne geçmek için yararlı olmasına rağmen, eksojen hCG uygulamasının neden olduğu erken OHSS gelişimini engelleyememektedir. Bu nedenle, OHSS belirsiz bir mekanizma ile potansiyel olarak ölümcül bir durumdur ve OHSS'ye ve önlenmesine aracılık eden mekanizmalarla ilgili yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

VEGF, 38-46 kDa'luk heparin bağlayan homodimerik glikoproteindir. PDGF ailesine aittir ve ovaryumdaki granüloza hücrelerinden salgılanan ana proanjyogenik faktördür. Buna ek olarak, VEGF, histaminden 5000 kat daha güçlü olan bir vasküler geçirgenlik arttırıcısıdır ve OHSS insidansında önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, VEGF, nitrik oksit ve bağlantı proteinlerini düzenleyerek ve vasküler geçirgenliği arttırarak OHSS yi tetikleyebilmektedir. Yapılan bir çok çalışma granüloza hücrelerinden salınan VEGF'nin OHSS gelişimindeki rolünü baz almaktadır. Oosit maturasyonu artışı için kullanılan hCG veya Luteinleştirici hormon (LH), granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri üzerinden Protein Kinaz A (PKA) ve Protein Kinaz C (PKC)'yi aktive etmektedir. hCG'nin uzun bir yarılanma ömrü (5-7 gün) vardır. Bu nedenle tek doz verildiğinde bile uzun süreli bir etki göstermektedir. Korpus luteum 1 haftaya kadar uyarılır ve bu yolak sonucunda da granüloza hücrelerinden VEGF ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. VEGF ekspresyonundaki artış ise endotel hücrelerindeki VEGF reseptör 2 (VEGFR2)'nin uyarımını arttırarak sonuçta OHSS gelişimine neden olmaktadır. VEGF inhibisyonunun OHSS ile ilişkili ovaryan değişimlerini önlediği rapor edilmiştir.

Pigment Epiteli Kaynaklı Faktör (PEDF), 50 kDa'luk bir glikoproteindir. Serin proteaz inhibitörlerinin üyesidir ve fizyolojik bir antianjiyogenik faktör olduğu bildirilmiştir. Antianjiyogenik etkisini, proanjyogenik faktörleri doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek göstermektedir. Yapılan çalışmalar, PEDF'nin proanjyogenik faktör olan VEGF'yi de inhibe ettiğini rapor edilmiştir. hCG uygulamasından sonra granüloza hücrelerinde PEDF ve VEGF'nin ters orantılı olarak eksprese edildiği; VEGF seviyesinin artarken, PEDF seviyesinin azaldığını gösterilmiştir.

Kisspeptinler, Kiss-1 olarak adlandırılan gen tarafından transkribe edilen bir öncül proteinden türeyen, hipotalamo-hipofizyer-gonadal aksı etkileyerek puberte ve fertilitede önemli roller aldıkları düşünülen, farklı aminoasit uzunluklarındaki nöropeptidler olarak bilinmektedirler. Kisspeptinlerin farklı türleri, amino asitlerin sayısına göre ayırt edilir. Bunlar kisspeptin-54, 14, 13 ve 10'dur. Farklı kisspeptinlerin değişik türlerde birbirinden farklı etki gösterdikleri yapılan çalışmalarda görülmektedir. Kemiricilerde kisspeptin 54'ün, in-vivo olarak diğer kisspeptin türlerinden daha güçlü etki gösterebileceği bildirilmiştir. Kisspeptin-54 hipotalamustaki nöronlardan salgılanan bir nöropeptittir ve GnRH üretimini uyarır. Kisspeptin-54'ün intravenöz infüzyonu ile erkeklerde plazma LH seviyelerinde % 200, FSH'da % 18 ve testosteron seviyelerinde % 13 lük artışa neden olmaktadır. Kisspeptin-54 ün kadınlarda subkutanöz enjeksiyonu ile hem LH hem de FSH düzeylerinde artış gözlenmektedir. Yüksek OHSS riski taşıyan IVF hastalarına kisspeptin-54 verildiğinde hastaların % 95'inde oosit maturasyonunun gerçekleştiği ve OHSS gelişmediği bildirilmiştir. Kisspeptin-54'ün GnRH üretimine etki mekanizması bilinmesine rağmen OHSS vakalarında kisspeptin-54 uygulamasının VEGF ve PEDF üzerine etkileri henüz açıklanamamıştır.

Bu çalışmada, Kisspeptin-54'ün OHSS tedavisinde kullanımının, oosit maturasyonu, ovaryum morfolojisi, VEGF, PEDF, PKA ve PKC seviyeleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. OVARYUM

Dişi üreme sistemi iç genital ve dış genital organlardan oluşmaktadır. İç genital organlar iki adet ovaryum, iki adet fallop tüpü, uterus ve vajina; dış genital organlar ise klitoris, vestibül, labium majör, labium minör ve mons pubistir. Dişi üreme sisteminin temel fonksiyonu türlerin devamlılığının sağlanmasıdır ve bu sistem, karmaşık hormonal, nöral ve fizyolojik faktörlerin kontrolü altındadır (Gartner ve Hiatt 2012).

Üreme hayatı boyunca, dişi üreme organları, her ay hem yapısal hem de fonksiyonel değişikliklere uğramaktadır. Bu değişimlerin oluşturduğu süreç menstrual döngü denilmektedir. Olgunlaşmakta olan bireyde görülen ilk menstrual döngü menarş adını alır. Menstrual döngüler düzensiz hale geldiğinde veya artık tamamen ortadan kalktığında bu süreç menopoz olarak adlandırılır (Eroschenko 2008).

Ovaryumlar, üst pelvik kavitede yer alan oval yapılı, badem şekilli organlardır. En temel fonksiyonları şunlardır:

1. Dişi gametinin üretilmesi
2. Östrojen ve progesteron sentezi
3. Üreme organlarının postnatal kontrolü
4. İkincil cinsiyet özelliklerinin gelişimi (Kierszenbaum ve Tres 2015)

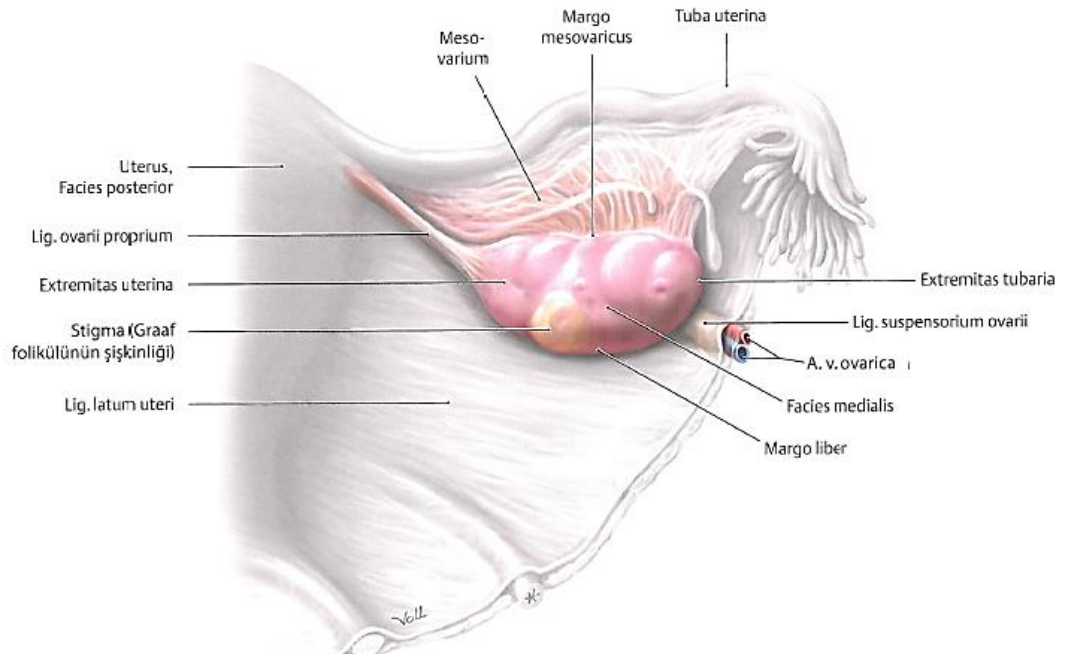
Ovaryumlar, birbiri ile ilişkili 2 süreçten sorumludur. Bunlardan ilki oogenezdır ve oositlerin üretimi anlamına gelmektedir. İkincisi ise steroidogenezdır ve steroid hormonların üretimi anlamına gelmektedir (Ross ve Pawlina 2016).

Ovaryumlar tarafından salgılanan iki temel steroid hormon östrojen ve progesterondur. Östrojen, iç ve dış genital organların büyümesi ve olgunlaşmasını ve

puberte ile birlikte ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesini sağlamaktadır. Ayrıca östrojen, meme bezi üzerine etki ederek duktal ve stromal büyümeyi ve yağ dokusunun birikimini uyarmaktadır. Progesteron, özellikle uterusun endometriyum tabakasına etki ederek sekretuar değişimleri uyarmakta ve uterusu gebeliğe hazırlamaktadır. Buna ek olarak, meme bezindeki lobüler proliferasyonu tetikleyerek meme bezini laktasyona hazırlamaktadır (Ross ve Pawlina 2016).

4.1.1. Anatomisi

Ovaryumlar, abdomenin sağ ve sol alt taraflarında bulunan badem şekilli bir çift organdır. Fallop tüplerinin yakınında, fossa ovarica içerisinde bulunmaktadır. Mezovarium ile ligamentum latum uterinumun arka yüzüne, ligamentum ovarii proprium ile de uterus yan duvarlarına bağlıdır (Şekil 1). Ovaryumun ön kısmında umbilikal ligament; arka kısmında ise üreter ve internal iliyak arter bulunmaktadır. Ovaryum, süspensör ligament ile pelvik duvara bağlıdır. Süspensör ligament, ovaryan arteri, veni, parasempatik ve sempatik sinir pleksuslarını taşımaktadır (Schünke ve ark. 2009; Chung ve ark. 2015; Gibson ve Mahdy 2019;).



Şekil 1. Ovaryum anatomisi (Schünke ve ark. 2009)

Ovaryum 2 cm genişliğinde, 3,5 cm uzunluğunda ve 1 cm kalınlığındadır. Ovaryum hacmi kadın yaşlandıkça değişim göstermektedir. Üreme çağındaki

kadınlarda hacim en yüksek seviyede iken menopoz ile birlikte ovaryum hacmi küçülmektedir (Gibson ve Mahdy 2019).

Ovaryumun kanlanması, hem ovaryan arter ile sağlanmaktadır. Ovaryan arter, abdominal aortadan köken almaktadır ve süspansör ligament içerisine girmektedir ve uterin arterin dallarıyla anastomoz yapmaktadır. Ovaryumun drenajı ovaryan venler ile gerçekleşmektedir. Sağ ovaryan ven inferior vena kavaya; sol ovaryan ven ise sol renal vene katılmaktadır (Chung ve ark. 2015).

4.1.2. Histolojisi

Ovaryum, tek katlı yassı veya kübik olabilen germinal epitel ile çevrili bir organdır. Germinal epitelin altında sıkı düzensiz bağ dokusu yapısında tunika albuginea adı verilen bir kapsül bulunur (Gartner ve ark. 2011). Tunika albugineanın hemen altında ovaryum histolojik 2 tabaka sergilemektedir. Dış tabaka korteks, iç tabaka ise korteksin sardığı medulladır. Korteks ovaryan foliküllerden zengin iken medulla yüksek düzeyde damarlanma gösteren bağ dokusundan oluşmaktadır. Korteks ile medulla birbirinden net çizgilerle ayrılmamaktadır (Gartner ve Hiatt 2012).

Korteks farklı gelişim aşamalarındaki ovaryan foliküllerden oluşmaktadır. Bu foliküller primordiyal, primer, sekonder ve graaf (tersiyer) foliküllerdir. Ovaryumun korteksinde, içerisinde primer oositlerin yer aldığı primordiyal foliküller bulunmaktadır. Her bir primer oosit, mayoz bölünmenin profaz 1 evresindedir. Primer oositlerin etrafında foliküller hücreler adı verilen yassı epitel hücre tabakası ile çevrilidir. Foliküler hücreler mayoz-önleyici madde denenen bir faktör salgılayarak primer oositin 1. mayoz bölünmeyi tamamlamasını engeller (Gartner ve Hiatt 2012). En olgun folikül graaf folikülüdür ve ovulasyonla sekonder oositin atılması ile geride kalan kan hücreleri ve bağ dokusunun yeniden düzenlenmesiyle yerini korpus hemorajikum, korpus luteum ve korpus albikansa bırakmaktadır (Ross ve Pawlina 2016).

Primordiyal foliküller: Foliküler gelişimin en erken basamağındaki foliküllerdir. Merkezi bir primer oosit ile onu sarak tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşmaktadır. İlk olarak fetal gelişimin 3. ayında görülmektedirler. Bu foliküllerin erken büyümesi, gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Olgun bir ovaryumda, tunika

albugineanın hemen altında, korteksin en periferinde yerleşiktirler. Foliküller hücreler desmozomlar aracılığı ile birbirlerine bağlıdır ve etraflarındaki stromadan bazal lamina ile ayrılmaktadırlar. Bu foliküldeki oositin çapı yaklaşık 30 µm'dir ve bir veya daha fazla çekirdekçik ve ince kromatin iplikleri içeren geniş eksentrik bir çekirdeğe sahiptir. Ooplazma adı verilen oosit sitoplazması Balbiani cisimcikleri içermektedir (Şekil 2a) (Ross ve Pawlina 2016).

Primer foliküller: Gelişim aşamasındaki foliküllerin ilkidir. Primordiyal folikül gelişirken hem oositte hem foliküler hücrelerde hem de folikülü çevreleyen stromada birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. Öncelikle foliküler hücreler çoğalır ve tek katlı kübik hale gelir. Bu aşamadaki folikül erken primer folikül olarak adlandırılmaktadır. Bu sırada oositin çapı artmaktadır. Oosit büyüdükçe spesifik proteinler salgılamaya başlar ve bu proteinler oositin etrafında hücre dışı bir kılıfı yani zona pellusidayı oluşturmaktadır. Histolojik kesitlerde zona pellusida homojen ve refraktil görülmektedir. İnsanlarda, oosit ile tek katlı kübik foliküler hücreler arasında yer alan zona pellusida 3 farklı zona pellusida glikoprotein sınıfından meydana gelmektedir. Bunlar ZP-1, ZP-2 ve ZP-3'tür. ZP-1'in fonksiyonu henüz bilinmemektedir. ZP-2'nin ikincil spermatozoa-bağlayıcı protein olarak işlev gösterdiğine inanılmaktadır. ZP-3 en önemli protein olup, spermatozoa bağlayıcı reseptördür ve akrozom reaksiyonunu indüklemektedir. Bu değişimlere ek olarak oosit plazma membranının hemen altında kortikal granüller adı verilen veziküller görülmektedir. Bu granüller proteaz içerirler ve fertilizasyon sırasında oositin salgılanmaktadır (Şekil 2b) (Ross ve Pawlina 2016).

Erken primer folikülde foliküler hücreler hızlı mitoz bölünme gerçekleştirerek çok katlı kübik hale gelmektedir. Bu aşamadaki foliküllere geç primer folikül; foliküler hücrelere ise granüloza hücreleri denir. Granüloza hücreleri arasında oluklu bağlantılar (gap junction) oluşmaktadır (Ross ve Pawlina 2016). Buna ek olarak zona pellusidaya komşu granüloza hücreleri filopodya denen uzantılar ile primer oositin mikrovillusları da zona pellusida içerisinde birbirleriyle oluklu bağlantılar aracılığıyla bağlantı kurmaktadır (Gartner ve Hiatt 2012). Primer folikül gelişirken folikülün etrafındaki bağ dokusu stromal hücreleri, bir bağ dokusu kılıfı oluşturmaya başlamaktadır. Bu kılıfa teka folikülü denir. Teka folikülü daha sonra 2 tabaka halinde düzenlenmektedir: bunlar teka interna ve teka eksternadır. Teka interna, granüloza hücrelerinin bazal laminasının hemen dışındaki salgı hücrelerinin bulunduğu, yüksek damarlanma

gösteren tabakadır. Teka interna hücreleri Luteinleştirici hormon (LH) reseptörleri içermektedir. LH uyarımına bağlı olarak bu hücreler östrojen öncülü androjenleri üretmektedir. Teka eksterna, teka internanın dışında yer almaktadır. Bu tabaka temel olarak düz kas hücreleri ve bağ dokusu yapısındadır. Teka eksterna çevre stromal dokuyla devamlılık göstermektedir (Ross ve Pawlina 2016).

Sekonder (antral) folikül: Primer folikül, boyutu arttıkça korteksin derinine inmeye başlamaktadır. Folikül uyarıcı hormon (FSH) gelişimi uyarmaktadır. Granüloza hücreleri 6-12 tabakalı hale geldiğinde bu hücreler arasında sıvı dolu boşluklar (Call-Exner cisimcikleri) oluşmaya başlamaktadır. Bu aşamadaki folikül sekonder folikül adını almaktadır. Sekonder folikülün içerisindeki boşluklarda hiyaluronandan zengin foliküler sıvı birikmektedir. Bu küçük sıvı dolu boşluklar ileriki safhalarda birleşerek antrum denen tek bir boşluğu oluşturmaktadır. Antrumun oluşması, granüloza hücrelerinin primer oosite göre yeniden organize olmasına yol açmaktadır. Oosit ile folikül duvarı arasında yerleşik olan granüloza hücreleri kumulus ooforus; oositin etrafındaki ilk sırada yer alan granüloza hücreleri ise korona radiata adını almaktadır. Sekonder foliküldeki oosit folikül içerisinde eksentrik bir konum alır ve yaklaşık 125 µm çapa sahiptir. Bu boyuta ulaştıktan sonra oosit daha ileri bir büyüme göstermemektedir. Bunun nedeni granüloza hücreleri tarafından salgılanan oosit matürasyon inhibitörü (OMI)'dür (Şekil 2c) (Kierszenbaum ve Tres 2015; Ross ve Pawlina 2016).

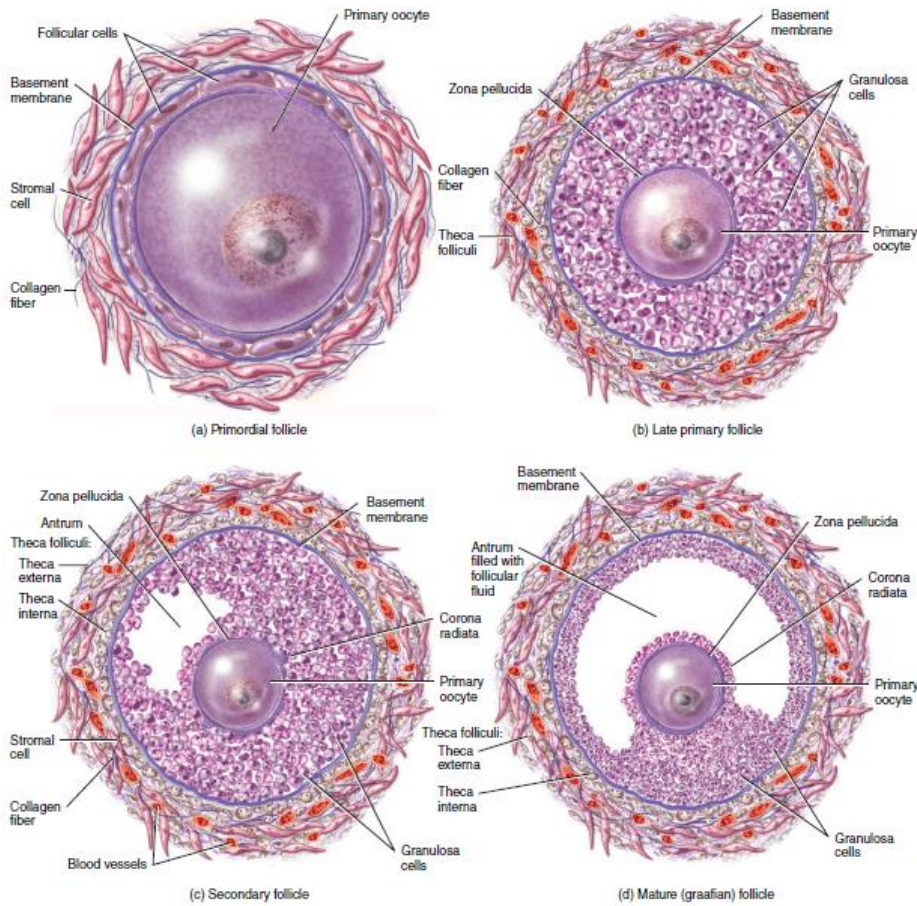
Graaf (Matür) folikülü: En büyük folikül tipidir. Foliküler gelişim devam ettikçe, folikül içerisindeki antrum iyice genişlemekte ve folikül çapı 10-20 mm'ye ulaşmaktadır. Granüloza hücre proliferasyonu yavaşlamaktadır ve oositin etrafında tek sıra korona radiata gözlenmektedir. Graaf folikül aşamasında, folikül etrafındaki teka tabakaları da daha belirgin hale gelmektedir. Teka interna hücrelerinin içlerinde lipid damlacıkları görülmektedir (Şekil 2d) (Kierszenbaum ve Tres 2015; Ross ve Pawlina 2016).

Foliküler atrezi: Birçok primer folikül matürasyon sürecine başlamaktadır ancak genel olarak sadece bir folikül gelişimini tamamlayabilmektedir. Kalan foliküller apoptoz ile atrezi sürecine girmektedir. Foliküller primer folikülden itibaren herhangi bir aşamada atreziye uğrayabilmektedir fakat folikül boyutu arttıkça atretik folikül oranı da artmaktadır. Atretik foliküller, camsı membran adı verilen kalınlaşmış ve

katlanma gösteren bazal membran ile karakterizedir. Aynı zamanda katlanmış zona pellusida ve apoptotik fragmentler içeren oosit de gözlenebilmektedir (Kierszenbaum ve Tres 2015).

Ovulasyon

Hipofiz bezinden salgılan LH seviyesinin ve lokal olarak mayoz-uyarıcı maddenin artması, ovulasyondan hemen önce primer oositin 1. mayoz bölünmeyi tamamlayarak 2. mayoz bölünmenin metafaz aşamasına geçmesini sağlamaktadır. Artık oosit sekonder oosit adını almakta ve 1. kutup cisimciğini de barındırmaktadır (Gartner ve ark. 2011). Bu basamakta, graaf folikülü ovaryum yüzeyinde stigma denen bir çıkıntı yapmaktadır. Teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik aktivite, graaf folikülünün yırtılmasını ve sekonder oositin atılmasını kolaylaştırmaktadır. Atılan oosit fallop tüpü içerisine girmektedir. Bu süreç ovulasyon olarak adlandırılmaktadır (Kierszenbaum ve Tres 2015).



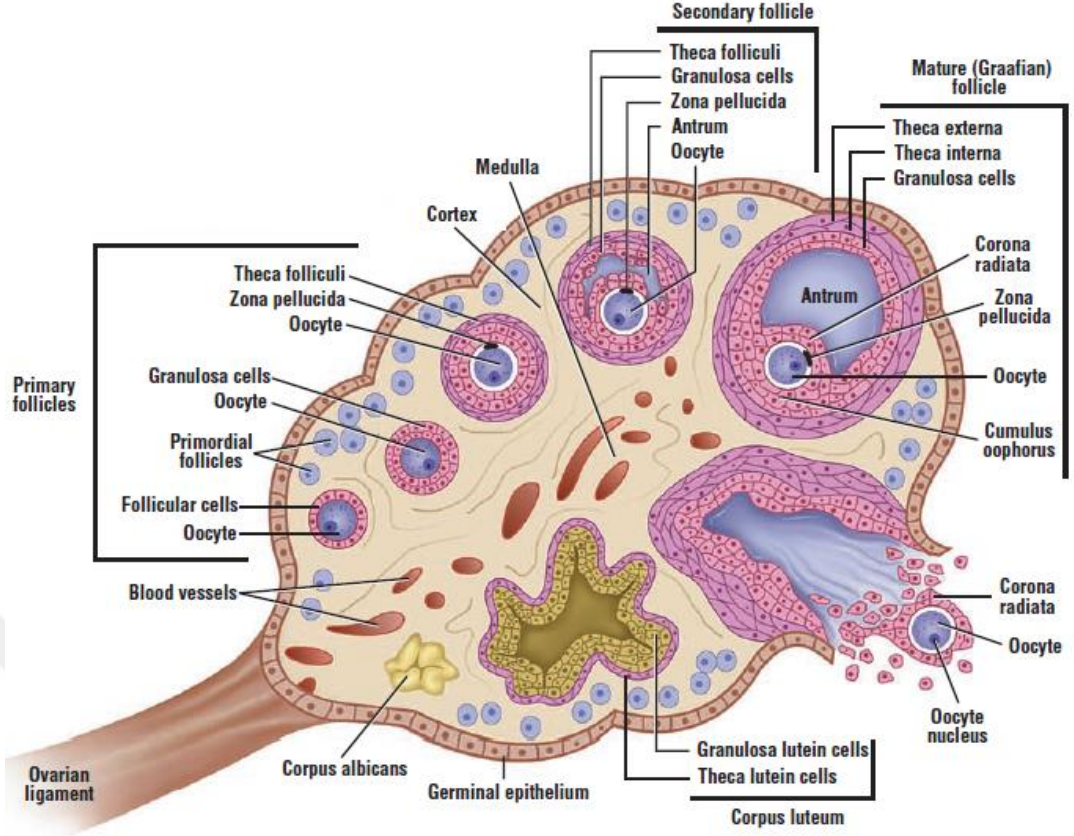
Şekil 2. Ovaryan foliküllerin şematik gösterimi. a. Primordiyal folikül, b. Geç primer folikül, c. Sekonder folikül, d. Graaf folikülü (Tortora ve Derrickson 2017)

Kadınlarda ortalama menstrual döngü 28 gündür. Bazı döngüler daha kısa bazıları daha uzun olabilmektedir ancak her şekilde ovulasyon menstruasyon başlangıcından 14 gün önce olmaktadır (Gartner 2017).

Ovulasyondan sonra, graaf folikülün kalıntıları büzüşüp katlanmaya başlamaktadır. Foliküler boşluk içerisinde kan dolmaktadır ve artık bu yapı korpus hemorajikum olarak adlandırılmaktadır. Folikül içindeki kan makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir. Yüksek LH, östrojen, insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF) I ve II, insan koryonik gonadotropin (hCG) ve prolaktin korpus hemorajikumu korpus luteuma dönüştürmektedir. Korpus luteumda, granüloza hücreleri modifiye hale gelerek granüloza lutein hücrelerine; teka interna hücreleri modifiye hale gelerek teka lutein hücrelerine farklanmaktadır (Gartner 2017).

Granüloza lutein hücreleri, geniş, soluk boyanan hücrelerdir. Sitoplazmalarında lipid damlacıkları bulunmaktadır. Bu hücreler, progesteron üretiminin yanında teka-lutein hücreleri tarafından üretilen androjenleri de östrojene dönüştürmektedirler. Korpus luteumun periferinde yer alan lutein hücreleri, koyu boyanan hücrelerdir ve bazı progesteronları ve androjenleri üretmektedirler (Şekil 3) (Gartner 2017).

Granüloza lutein ve teka lutein hücrelerinin ürettiği progesteron ve östrojen, LH ve FSH salgısı durdurarak başka foliküllerin gelişimini önleyerek ikinci bir ovulasyon olmamasını sağlamaktadır. Eğer gebelik gerçekleşmez ise, menstruasyon korpus luteumu; gebelik gerçekleşir ise gebelik korpus luteumu oluşmaktadır. Gebelik korpus luteumu, gebelik ile oluşan plasentadan salgılanan hCG yardımıyla devamlılığını yaklaşık 3 ay korumaktadır. Gebelik veya menstruasyon korpus luteumu, görevini tamamladıktan sonra dejenere olmaktadır. Bu aşamada, dejenere korpus luteum makrofajlar ile fagosite edilir, fibroblastlar yerleşir ve kollajen sentezler. Bu süreçler sonunda da korpus albicans oluşmaktadır. Bir süre sonra korpus albicans rezorbsiyona uğramaktadır ve kalıntıları, ovaryum yüzeyinde skar dokusu olarak görülmektedir (Gartner 2017).



Şekil 3. Ovaryumun şematik gösterimi (Eroschenko 2008)

4.1.3. Fizyolojisi

Ovaryum, salgıladığı hormonlar ve bağlantıda olduğu hipotalamus ve hipofiz ile dişilerde cinsiyet gelişimi ve üreme fonksiyonlarını kontrol etmektedir. Puberte ile birlikte (9-12 yaşlarında), hipofiz daha fazla FSH ve LH salgılamaya başlamaktadır. Bu artış hem ovaryan hem de menstrüal döngünün başlamasını sağlamaktadır. (Hall 2016).

Dişi üreme sistemi, üç ayrı hormonal grubun etkisi altındadır (Hall 2016). Bunlar:

1. Hipotalamus kökenli hormon: Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH)
2. Hipofiz bezi kökenli gonadotropinler: GnRH hormonuyla uyarılan FSH ve LH
3. Ovaryum kökenli hormonlar: FSH ve LH hormonları ile uyarılan Östrojen ve progesteron

GnRH, 10 amino asitlik bir peptidtir ve hipotalamustaki arkuat çekirdekte yer alan nöronlar tarafından sentezlenmektedir. Nöronlarda üretilen bu peptid, hipotalamik-hipofizyer portal sistem aracılığı ile hipofiz bezindeki gonadotrop hücrelerden FSH ve LH salınımını uyarmaktadır. Puberte öncesinde, hipotalamustan belirgin miktarda GnRH salgılanmamaktadır. Puberte ile birlikte salgı miktarı artış göstermekte ve sıklaşmaktadır. Menstrual döngü boyunca, yaklaşık olarak her 90 dakikada bir GnRH salgılanmaktadır (Hall 2016).

Menstruasyon döngüsü boyunca gonadotropinlere bağılı olarak ovaryan değişimler gerçekleşmektedir. Bu gonadotropinler FSH ve LH'tır. FSH ve LH glikoprotein yapısındadır (Hall 2016).

Kadınlarda, ardışık 3 farklı ovaryan döngü bulunmaktadır (Kierszenbaum ve Tres 2015):

a. Foliküler evre: Bu evre folikülogenezi ifade etmektedir ve 28 günlük menstrual döngünün 6.-13. günlerini kapsamaktadır.

b. Ovulatuvar evre: Olgun graaf folikülden oositin atılmasıdır. LH seviyesinin artışıyla stigmadan oosit atılarak fallop tüpüne girmektedir. Menstrual döngünün 14. günüdür.

c. Luteal evre: Korpus luteumun oluşum aşamasıdır. Menstrual döngünün 15.-28. günlerini kapsamaktadır.

a. Foliküler evre: Menstrual döngünün başındaki ilk birkaç gün FSH ve daha az seviyede LH artışı olmaktadır. FSH, ovaryumdaki 6-12 primer folikülün gelişimini uyarmaktadır. Granüloza hücreleri FSH uyarısıyla prolifer olmaktadır. Aynı zamanda teka interna hücreleri de uyarılarak androjen sentezlemeye başlamaktadır. Bu androjenler granüloza hücreleri tarafından östrojene dönüştürülmektedir. Granüloza hücreleri östrojen ile birlikte progesteron da sentezleyerek bu iki hormonu foliküler sıvıya vermektedir. Foliküler sıvıda artan östrojen, granüloza hücrelerinin daha fazla FSH reseptörü ifade etmesine neden olmaktadır. Bu pozitif geri besleme mekanizmasıyla granüloza hücreleri FSH'a daha duyarlı hale gelmektedir (Hall 2016).

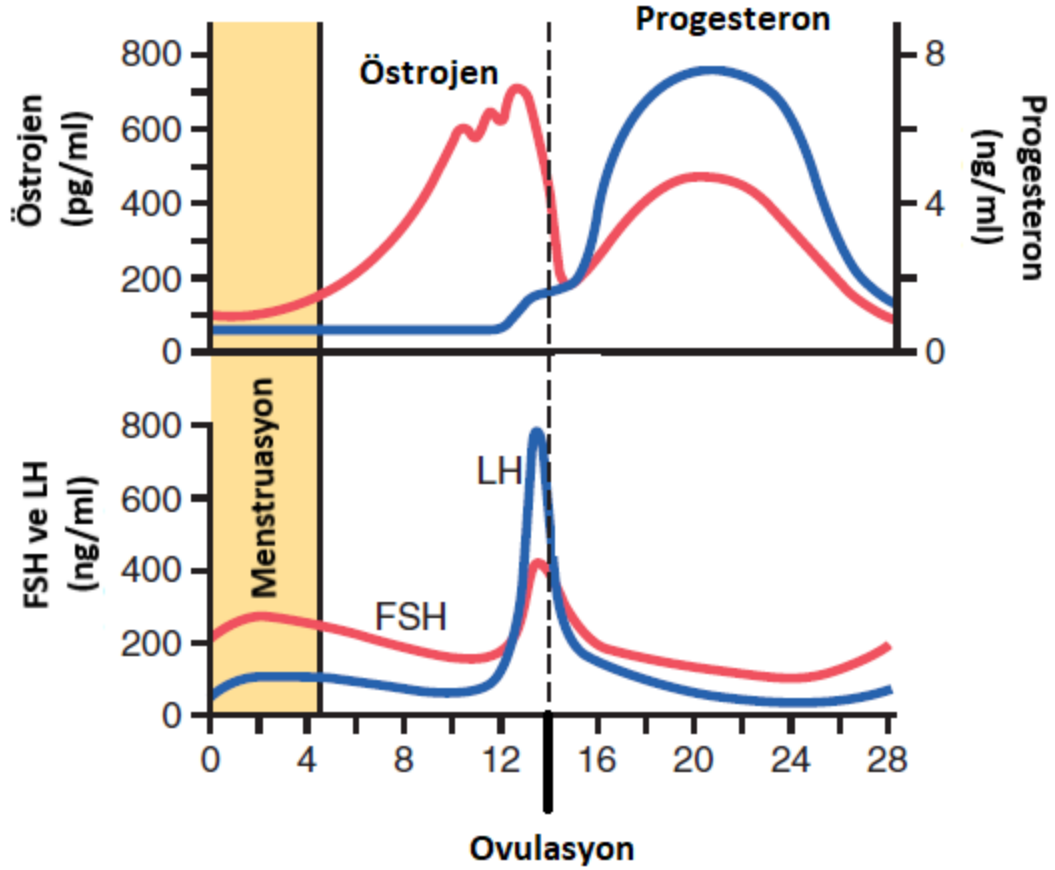
FSH ve östrojen, granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerini de arttırmaya başlamaktadır. Menstrual döngünün 7-10. günlerinde sadece 1 folikül ileri olgunlaşma

sürecine devam ederken diğer 5-11 folikül atreziye uğramaktadır. Atrezinin nedeni, yüksek seviyedeki östrojenin hipotalamus üzerinde negatif geri besleme etkisi göstererek FSH salgısının azaltmasıdır (Hall 2016).

b. Ovulatuvar evre: Normal 28 günlük bir menstrual döngüde 14. günde ovulasyon gerçekleşmektedir. Ovulasyondan 2 gün önce, LH seviyesi 6-10 katına çıkmaktadır ve Ovulasyondan 16 saat önce en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. LH artışı, granüloza hücrelerinden salgılanan progesteronu arttırırken, östrojeni azaltmaktadır (Hall 2016).

c. Luteal evre: Ovulasyondan sonraki luteal fazda, yüksek düzeydeki LH, oositin atıldığı foliküldeki granüloza ve teka hücrelerinin farklılaşarak salgı yapan hücre özellikleri kazanmalarını sağlamaktadır. Bunun sonucunda da korpus luteum oluşmaktadır. Korpus luteum yüksek düzeyde progesteron ve daha az düzeyde östrojen üretmektedir. Gebelik oluşur ise progesteron gebeliğin sürdürülmesine yardımcı olmaktadır (Hall 2016).

Gebeliğin oluşmadığı durumda, korpus luteumdan salgılanan östrojen ve inhibin, hipotalamus-hipofiz üzerindeki negatif geri besleme mekanizmalarıyla FSH ve LH'ın düşmesine neden olmaktadır. Azalan FSH ve LH korpus luteum dejenerasyonunu indüklemektedir ve menstrual döngünün 26. Gününde dejenerasyon tamamlanmaktadır. Korpus luteumun kaybolmasıyla, östrojen, progesteron ve inhibinde ani bir azalma olmaktadır. Bu ani azalma hipotalamus-hipofiz üzerindeki negatif etkinin kalmasına, menstruasyon kanamasına ve ardından yeni bir döngünün başlamasına yol açmaktadır (Şekil 4) (Hall 2016).



Şekil 4. Menstrual döngünün günleri ve etkili hormon düzeyleri (Hall 2016)

4.2. OVARYUM GELİŞİMİ VE OOGENEZ

Gonadlar, başlangıçta bir çift genital kabartı olarak ortaya çıkmaktadır. Epitelin çoğalması ve altında bulunan mezenkimin yoğunlaşması ile meydana gelirler. Gelişimin 6. haftasına kadar germ hücreleri genital kabartılarda görülmemektedir. Erken gelişim döneminde, yolk kesesinin duvarında epiblast kökenli primordiyal germ hücreleri gözlenmektedir. Primordiyal germ hücre oluşumu, ekstraembriyonik ektodermden salgılanan kemik morfogenezik protein-4 ve -8 (BMP4 ve BMP 8) ve visseral endodermden salgılanan BMP2 ile sağlanmaktadır (Rimon-Dahari ve ark. 2016). Bu hücreler, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca hareket ederler ve beşinci haftanın başında genital kabartılara ulaşmaktadırlar. Primordiyal germ

hücreleri genital kabartılara gelmeden hemen önce, kabartılardaki epitel hücreleri çoğalmaya başlamayarak alttaki mezenkım dokusuna geçmektedir. Burada primitif seks kordonlarını oluşturmaktadırlar. Bu kordonlar yüzel epiteline bağlıdır (Sadler 2011).

XX kromozomuna sahip embriyoda, *Sry* geninin olmaması, WNT4 ve RSPO1 transkripsiyon faktörlerinin aktif hale gelmesini ve böylece dişi ovaryumunun gelişmesini sağlamaktadır (Rimon-Dahari ve ark. 2016). Böylece, primitif seks kordonları, düzensiz hücre gruplarına ayrılmaktadır. Bu hücre grupları, gonadın medullar kısmını işgal ettikten sonra kaybolmaktadır. Daha sonra bu hücrelerin yerini Vasküler stromal doldurmaktadır. Dişi gonadın yüzey epiteli çoğalmaya devam etmektedir. Yedinci haftada, bu hücreler alttaki mezenkime ilerler ve böylece kortikal kordlar oluşmaktadır. Gelişimin 3. ayının sonunda bu hücre kordları bir veya daha fazla primordiyal germ hücresinin etrafını sarmaktadır. Germ hücreleri oogonyumu oluştururken, etraflarındaki hücreler foliküler hücreleri meydana getirmektedir (Sadler 2011).

Oogenez, oogonyumun olgun oosite farklılaşma sürecidir. Bu süreç insanlarda prenatal dönemde gerçekleşmektedir. Gonadlarda bulunan oogonyumlar, gelişimin 3. ayının sonunda mitoz bölünme geçirerek sayılarını arttırmaktadır. Bu oogonyumlardan bazıları 1. mayoz bölünmenin profaz 1 aşamasına girmektedir. Bu aşamadaki oogonyumlar artık primer oosit adını almaktadır. Sonraki birkaç ay boyunca mitoz bölünme devam etmektedir. Gelişimin 5. ayında germ hücrelerinin sayısının 7 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Bu aşamada germ hücre ölümleri başlamaktadır. Gelişimin 7. ayında hemen hemen tüm oogonyumlar dejenere olmakta ve tüm primer oositler 1. mayoz bölünmenin profaz 1 evresine girmektedir. Bu primer oositlerin her biri yassı foliküler hücreler ile çevrilidir ve sonuçta primordiyal folikül oluşmaktadır (Sadler 2011).

Doğuma yakın bir zamanda, primer oositler profaz 1'e başlamaktadır ancak profaz 1'in diploten aşamasında kalmaktadır. Diploten aşamasındaki bu duraklama, foliküler hücreler tarafından salgılanan oosit matürasyon inhibitörü aracılığıyla olmaktadır. Yenidoğanda, primer oosit sayısı 600.000-800.000 iken; pubertede bu sayı 40.000'dir. Üreme yaşı boyunca 500'den daha az oosit ovulasyona uğramaktadır. Menstruasyon döngüsünde LH en yüksek seviyeye ulaştığında, primer oosit 1. mayoz bölünmeyi

tamamlayarak 2. mayoz bölünmenin metafaz evresinde kalmaktadır. Bu aşamada 2 kardeş hücre meydana gelmektedir. Bunlardan birincisi sekonder oosit iken diğeri 1. kutup cisimciğı adını almaktadır. Eğer fertilizasyon gerçekleşirse, sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayabilmektedir (Şekil 6) (Sadler 2011; Sánchez ve Smitz 2012).

4.3. FOLİKÜLOGENEZ

Folikülogenez, primordiyal folikülden itibaren primer folikül, sekonder folikül ve graaf folikülünün gelişim aşamalarını içine alan gelişimsel süreci ifade etmektedir. Bu süreç karmaşık moleküler ve hormonal mekanizmalar ile denetlenmektedir.

1. Primordiyal folikül aktivasyonu

Primordiyal foliküller temel üreme üniteleri olarak kabul edilmektedir. Çünkü gelişen foliküllere ve dolayısıyla menstruasyona neden olmaktadır. Folikülogenezin ilk basamağı primordiyal folikülün aktivasyonudur. Yapılan birçok çalışma ile primordiyal folikülün oluşumunu etkileyen faktörler gösterilmiştir. Germ hattındaki faktör alfa (FIGLA) transkripsiyon faktörünün doğumda primordiyal folikülün oluşumu için gerekli olduğu ve bu proteinin yokluğunda yenidoğan faredeki oositlerin hayatta kalamadığı bildirilmiştir (Soyal ve ark. 2000). Başka bir çalışmada, foliküler hücrelerde ifade edilen Forkhead box L2 (FOXL2) transkripsiyon faktörünün, somatik hücrelerin primer oosit etrafında organize olması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Uda ve ark. 2004). Prematüre ovaryan yetmezliği olan kadınlarda, FIGLA ve FOXL2 proteinlerinde mutasyonların olduğu ve bu proteinlerin primordiyal folikül gelişimi için gerekli olduğu rapor edilmiştir (Harris ve ark. 2002; Udar ve ark. 2003; Zhao ve ark. 2008).

Oosit, ilişkili foliküler hücreler, bitişik interstisyel hücreler ve çevresindeki diğer foliküller arasındaki parakrin iletişim, primordiyal folikül aktivasyonunu kontrol etmektedir. Fare çalışmalarıyla elde edilen bilgiler, aktivasyonu ve foliküler büyüme oranını oositin kontrol ettiğini göstermektedir. Oosit, en az iki ana sinyal yolunun düzenlenmesinden sorumludur. İlk olarak, folikül aktivasyonunu sınırlandırmak için

Fosfatidil İnositol 3-OH-kinaz (PI3K)-Protein Kinaz B (AKT)-Foxo3a sinyali gerekmektedir (Sullivan ve Castrillon 2011). Bu sinyal yolağında Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN) işlev görmektedir. Oositlerdeki PTEN kaybı, primordiyal foliküllerin global aktivasyonuna neden olur ve folikül aktivasyonunu önlemek için PTEN aracılı PI3K sinyal yolağı inhibisyonunun gerekli olduğu gösterilmiştir (Reddy ve ark. 2008). Benzer şekilde hem oositlerde hem de granüloza hücrelerinde ifade edilen bir transkripsiyon faktörü olan Foxo3a null fareler, postnatal olarak global primordiyal folikül aktivasyonuna uğramaktadır (Castrillon ve ark. 2003).

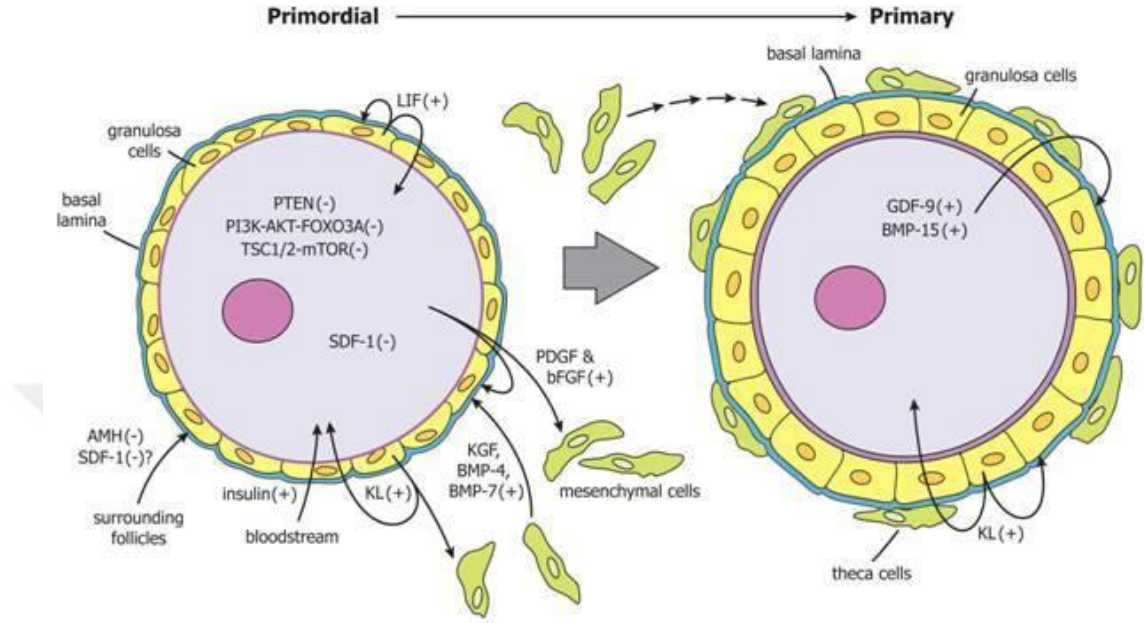
Rapamisin Memeli Hedefi (mTOR) sinyal yolağı da folikül aktivasyonunu düzenlemektedir. Tuberoz Skleroz Kompleksi proteinleri (TSC1 ve TSC2), oositlerde mTOR sinyalini inhibe ederek primordiyal foliküllerin aktivasyonunu önlemektedir (Adhikari ve ark. 2009). Bu iki sinyal yoluna ek olarak, oositler tarafından salgılanan bir kemokin olan Stromal Türevli Faktör-1 (SDF-1)'in folikül aktivasyonunu inhibe etmek için otokrin/parakrin etki gösterdiği bildirilmiştir (Holt ve ark. 2006).

Homeobox transkripsiyon faktörleri olan LHX8 ve NOBOX, birçok oosit geninin ifadesini düzenlemektedir. Bu genler arasında Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF) ailesinin üyeleri olan Büyüme Farklılaşma Faktörü-9 (GDF-9) ve BMP15 yer almaktadır. Oosit türevli GDF-9 ve BMP15, primer folikül aşamasında granüloza hücrelerinin çoğalmasını indüklemektedir. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) ve Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF), oosit türevli faktörlerdir ve granüloza hücre proliferasyonunu ve Kit ligand (KL) salgısını uyarmaktadır. Granüloza hücrelerinden salgılanan KL, oosit üzerindeki c-kit tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak oosit matürasyonunu uyarmaktadır (Parrott ve Skinner 1999; Yoshida ve ark. 1997). Bu bağlanma Foxo3a'nın inaktivasyonunu sağlayarak primordiyal folikül aktivasyonuna neden olmaktadır (Liu ve ark. 2006; Reddy ve ark. 2005).

Stromal hücrelerden salgılanan faktörler de primordiyal folikül aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF), BMP4 ve BMP7 stromal hücrelerden salgılanmaktadır ve primordiyal folikülden primer foliküle geçişi arttırmaktadır (Nilsson ve Skinner 2003; Kezele ve ark. 2005; K-F Lee ve ark. 2001).

Primordiyal foliküllerin çevresindeki diğer foliküller de aktivasyonu düzenlemektedir. Büyüyen diğer foliküllerden salgılanan Antimüllerien hormon (AMH), primordiyal folikül gelişimini negatif yönde etkileyerek ovarian rezervin

korunmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 5) (Carlsson ve ark. 2006; Holtve ark. 2006; Durlinger ve ark. 1999).



Şekil 5. Kemirgenlerde primordiyal folikül aktivasyonunun düzenlenmesi (Williams ve Erickson 2012)

2. Primer folikül gelişimi

Primer folikül gelişimindeki en önemli olaylar, FSH reseptörünün ifadesi, oositin büyümesi ve farklılaşmasıdır. FSH, aktivin, siklik Adenozin Monotriphosfat (cAMP) ve TGF, granüloza hücrelerinden FSH reseptörlerinin ifadesini sağlamaktadır (Findlay ve Drummond 1999).

Primer folikül aşamasında oosit çapı 25-120 µm arasındadır. Bu aşamada zona pellusida oluşmaktadır. Bu oluşumda, FIGLA ve NOBOX'un merkezi rol oynadığı bildirilmiştir (Choi ve Rajkovic 2006; Joshi ve ark. 2007). Granüloza hücrelerinden salgılanan KL de oosit büyümesini arttırarak folikül gelişimini desteklemektedir (Packer ve ark. 1994).

Oosit ve granüloza hücreleri arasındaki oluklu bağlantılar da primer folikül gelişimine katkı sağlamaktadır. Konneksin-37 (Cx37) oosit tarafından salgılan oluklu

bağlantı proteini. Konneksin-43 (Cx43) ise granüloza hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Grazul-Bilska ve ark. 1997; Simon ve ark. 1997). Oosit ve granüloza hücreleri arasında Cx37 ve Cx43 heterotipik oluklu bağlantılar oluşurken, granüloza hücreleri arasında Cx43 homotipik oluklu bağlantıları oluşmaktadır. Bu bağlantılar aracılığı ile oosit gelişimi için gerekli düzenleyici moleküllerin ve besinlerin aktarımı sağlanmaktadır (Eppig 1994; Carabatsos ve ark. 2000).

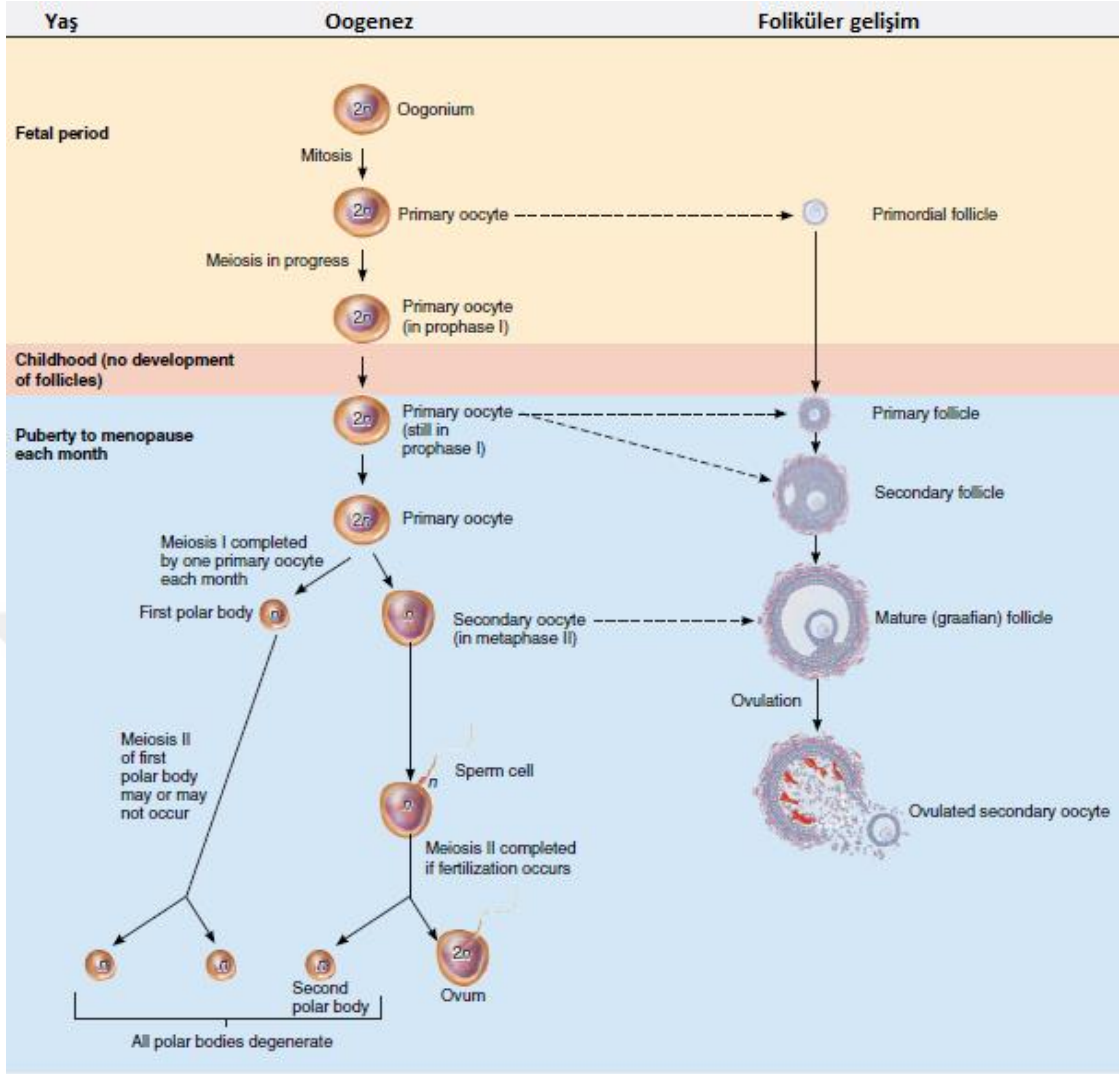
3. Sekonder folikül gelişimi

Sekonder folikül gelişimi, oosit etrafında çok katlı granüloza hücrelerinin ve sıvı dolu küçük boşlukların oluşmasıyla karakterizedir. Yapılan bir çalışmada, gelişimin bu aşamasında GDF-9 ve BMP15'in etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre, bu faktörlerin olmadığı fare ve koyunlarda, sekonder folikül aşamasına geçilemediği gösterilmiştir. Sekonder folikül oluştuktan sonra oosit artık hacim artışı göstermemektedir (Chang ve ark. 2002).

4. Graaf folikülü gelişimi

Graaf folikül oluşumunun temel özelliği folikül içerisinde büyük bir boşluğun ve bu boşluk içerisinde foliküler sıvının var olması ile birlikte oositin folikülün bir kutbunda yer almasıdır (Williams ve Erickson 2012). Yapılan çalışmalar, antrum oluşumunda Cx37 ve KL'nin rol oynadığını göstermektedir. Bu proteinlerin yokluğunda antrum oluşamamakta ve infertilite ortaya çıkmaktadır (Simon ve ark. 1997; Yoshida ve ark. 1997).

Antrum oluştuktan sonraki adım dominant folikülün gelişmesidir. Graaf folikül aşamasında çoğu foliküldeki granüloza hücre mitozu yavaşlarken, bir foliküldeki mitoz hızı oldukça yüksek oranlara çıkmaktadır. Baskın folikül oluşumunu etkileyen diğer bir faktör ise plazma FSH düzeyidir. FSH düzeyindeki ilk artış folikülogenezi uyarırken ikinci yükselme baskın folikül seçilimini uyarmaktadır. FSH'taki ikinci yükseliş, antrumdaki FSH konsantrasyonunu arttırarak foliküler sıvı hacminin daha da büyümesine neden olmaktadır. Böylece en iyi gelişen folikülden oosit ovulasyona uğramaktadır (Şekil 6) (Williams ve Erickson 2012).



Şekil 6. Oogenez ve foliküler gelişim aşamaları (Tortora ve Derrickson 2017)

4.4. İNFERTİLİTE

İnfertilite, bir yıllık düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin olmaması olarak tanımlanmaktadır (Starc ve ark. 2019). Günümüzde infertilite, yaygın bir problemdir ve dünya çapında üreme yaşındaki çiftlerin % 8 ile % 12'sini etkilediği tahmin edilmektedir. Dünyada bölgelere göre değişiklik gösteren bu oran Güney Asya, Orta ve Doğu Avrupa, Orta Doğu ve Kuzey Afrika gibi bazı bölgelerde % 30'lara ulaşmaktadır. Bu oranlar göz önüne alındığında dünya genelinde 186 milyondan fazla çiftin infertilite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Inhorn ve Patrizio 2015).

İnfertilite sadece kadına, sadece erkeğe veya her ikisine bağlı olabilmektedir. Cinsiyete bağlı infertilite oranları ülkelerin gelişmişlik seviyesine göre değişmektedir. Fransa merkezli bir çalışmada, infertilite olgularının yaklaşık % 34'ü kadın kaynaklı, % 20'si erkek kaynaklı, % 39'unun da hem erkek hem de kadın kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (Boyar 2013). Başka bir çalışmaya göre ise erkek kaynaklı infertilite oranı % 20-30, kadın kaynaklı infertilite % 20-30, her ikisine bağlı infertilite oranı ise % 50 olarak ifade edilmiştir (Vander Borgh ve Wyns 2018).

İnfertilite, primer ve sekonder olmak üzere iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Primer infertilite, hiçbir zaman klinik gebelik teşhisi konmamış çiftlerin sahip olduğu infertilite tipidir. Sekonder infertilite ise, klinik gebelik teşhisi olmayan ancak daha önce klinik gebelik tanısı konmuş çiftler için geçerli terimdir (Zegers-Hochschild ve ark. 2017). İnfertilite oranlarını gösteren 1990-2010 yılları arasındaki bir çalışmada, 48,5 milyon infertil çiftten 19,2 milyonunun primer infertiliteye, 29,3 milyonunun ise sekonder infertiliteye sahip olduğu bildirilmiştir (Mascarenhas ve ark. 2012; Starc ve ark. 2019).

İnfertilite birçok hastalığa bağlı olabilmektedir. Bu genel hastalıklar Tablo 1'de özetlenmiştir. Bu hastalıkların görülmediği ancak gebe olamayan ve infertil sayılan kadınlar açıklanamayan infertilite olgusunu taşımaktadırlar (Roupa ve ark. 2009).

4.4.1. Kadın infertilitesi

Kadınlarda infertilite, 35 yaş altı kadınların 1 yıllık, 35 yaş üstü kadınların 6 aylık düzenli ve korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalamaması olarak ifade edilmektedir (Merritt ve ark. 2019). Dünyada sıkça karşılaşılan kadın infertilitesi sekonder infertilitedir. Bunun nedenleri, güvenli olmayan kürtaj yapılması ve düşük sonrası veya doğum sonrası meydana gelen enfeksiyonlardır (Vander Borgh ve Wyns 2018).

Kadın primer infertilitesinin temel nedenleri anovulasyon ile ovaryum disfonksiyonu (% 25-35), tubal hastalıklar (% 20-25), endometriozis (% 10-20), uterus ile ilişkili hastalıklar (fibroidler, adezyonlar; % 5-10) ve açıklanamayan infertilitedir (% 20-30) (Szamatowicz ve Szamatowicz 2020). Bu nedenlerle birlikte yaş çevresel faktörler ve beslenme de infertiliteye yol açabilen nedenler arasındadır (Deyhoul ve ark. 2017).

Tablo 1. Hastalık ile ilişkili infertilite nedenleri (Vander Borgh ve Wyns 2018)

Kadın ile ilişkili hastalıklar
Prematüre ovaryan yetmezlik (POF)
Polikistik over sendromu (PKOS)
Endometriozis
Uterin fibrozlar
Endometriyal polipler
Erkek ile ilişkili hastalıklar
Testiküler eksiklikler
Post- testiküler başarısızlıklar
Her iki cinsiyet ile ilişkili hastalıklar
Hipogonadotropik gonadizm
Hiperprolaktinemi
Silier fonksiyon bozukluğu
Kistik Fibröz
Enfeksiyon
Sistemik hastalıklar
Çevresel faktörler

Anovulasyon, folikül gelişimi sonrasında oositin ovaryumdan atılma aşamasında gözlenen başarısızlıktır. Anovulasyona bağlı kadın infertilite oranı oldukça yüksektir. Hiperprolaktinemi, hipogonadotropik hipogonadizm, hipergonadotropik hipogonadizm ve PKOS anovulasyona yol açan hastalıklardır. Prolaktin hormonunun kanda anormal seviyede yüksek olması hiperprolaktinemiye yol açmaktadır ve bunun sonucunda GnRH sentezi inhibe olmaktadır. Böylece hipofizden FSH ve LH salgısı azalarak anovulasyon meydana gelmektedir. İnfertil kadınlarda hiperprolaktinemi oranı % 5'tir. Hipogonadotropik hipogonadizm ve hipergonadotropik hipogonadizm de FSH ve LH salgılarını etkileyen rahatsızlıklardır ve bu hormonların değişimi infertilite nedenleri

arasında yer almaktadır (Vander Borgh ve Wyns 2018; Brugo-Olmedo ve ark. 2001; Olooto ve ark. 2012).

Heterojen bir durum olan PKOS, kadınların % 5-10'unu etkileyen, kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur (Franks 2008). Ovulasyon bozukluğunun yanı sıra implantasyon potansiyeli de PKOS varlığında azalmaktadır (Hart 2016). Obezitenin, PKOS ve metabolik/ovulatuvar fonksiyon bozukluğuna yol açtığı düşünülmektedir ve kilo kaybının ovulasyonu düzelttiği ve hiperandrojenizmi azalttığı bulunmuştur (Crosignani ve ark. 2003).

İnfertilitede tubal ve peritoneal faktörler arasında endometriozis, pelvik adezyonlar, genellikle chlamidia'ya bağlı pelvik inflamatuvar hastalıklar, tubal oklüzyon ve tubal disfonksiyon bulunmaktadır. Tubal faktörler peritoneal faktörlerle benzer prevalansa sahiptir ve primer infertilitenin en temel nedenleri arasındadır (Olooto ve ark. 2012). Endometriozis infertilite ile ilişkili patolojik bir pelvik inflamatuvar süreçtir. Endometriozise bağlı infertilite ile ilişkili mekanizmalar adezyon ve fibrozise bağlı anatomik bozulmalardan endokrin anormalliklerine ve immünolojik bozukluklara kadar uzanmaktadır. Endometriozis varlığında embriyonun implantasyon potansiyeli azalmaktadır. Üreme çağındaki kadınlarda endometriozis gerçek prevalansı belirsizliğini korumaktadır (Olooto ve ark. 2012). Popülasyon temelli çalışmalarda tahmini genel endometriozis prevalansı % 0,8 ile % 6 arasında değişmektedir; bununla birlikte, infertil kadınlarda prevalans % 20 ile % 50 arasında değişmektedir, ancak zaman periyotları ve hastaların yaşı ile önemli farklılıklar göstermektedir (Tanbo ve Fedorcsak 2017).

Uterus faktörleri arasında dikkat çekici olanlar, anormal uterus şekli ve intrauterin septum, polipler, leiomyom ve Asherman sendromu gibi malformasyonlardır. Uterustaki benign fibroid 30'lu yaşlardaki kadınlarda oldukça yaygındır. Büyük miyomlar uterus yüzeyinin yapısını bozarak, fallop tüpünü bloke ederek, uterus boşluğunun şeklini bozarak veya serviksin pozisyonunu değiştirerek infertiliteye neden olabilmektedir (Olooto ve ark. 2012).

Doğurganlık yaşla birlikte azalmaktadır. Kadın doğurganlığı 18 ve 24 yaşları arasında en üst seviyede iken, 27 yaşından sonra düşmeye başlamaktadır. Ovaryum rezervi açısından, tipik bir kadın, 30 yaşında ovaryum rezervinin % 12'sine, 40 yaşında ise ovaryum rezervinin % 3'üne sahiptir. Ovaryum rezervinin % 81'i sadece yaşa bağlı

olarak değişmektedir ve bu da yaşı kadınlarda infertilitede en önemli faktörlerden biri haline getirmektedir (Wallace ve Kelsey 2010; Olooto ve ark. 2012).

Kalori kısıtlamasının ve aşırı egzersizin ovulasyon sıklığı, zayıf endometriyal gelişimi ve amenorede azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Hart 2016). Alkol ve sigara kullanımının da infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir. Sigara kullanımı, folikülogenez, endometriyel reseptivite, anjiyogenez ve uterus miyometriyumunu etkilemektedir (Dechanet ve ark. 2011). Yapılan bir çalışmaya göre, sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre infertil olma olasılığı % 60 daha fazladır. Sigara içmek, IVF ile canlı doğum yapma olasılığını % 34 azaltmakta ve düşük riskini % 30 arttırmaktadır (Olooto ve ark. 2012).

Stress ve kimyasal ajanlara (pestisitler, organik çözücüler, silikonlar vb.) maruziyet infertiliteyi etkileyen çevresel faktörlerdir (Olooto ve ark. 2012).

4.4.2. İnfertilite Tedavisi

İnfertilite tedavisi, infertilitenin nedenine, süresine, çiftlerin yaşına ve kişisel tercihlerine bağlıdır. Çifte infertilitenin bazı nedenlerinin düzeltilemeyeceği açıklanmalıdır. Tedavi için finansal, fiziksel ve zaman taahhüdü gerekmektedir. Çiftin sağlığı belirlendikten ve değerlendirildikten sonra çifte aşağıdaki tedavi yöntemleri açıklanabilir (Olooto ve ark. 2012):

İntrauterin inseminasyon (IUI): Açıklanamayan infertilite ve minimal endometriozis ve hafif erkek faktörlü infertilite problemleri olan kadın vakalar için kullanılabilir. Burada toplanan ve konsantre edilen sağlıklı spermler yumurtlama zamanı boyunca doğrudan uterusu yerleştirilir. IUI'nin zamanlaması normal döngü ile veya doğurganlık ilaçları kullanılarak koordine edilebilir.

IVF: IVF'de, bir kadından çok sayıda olgun oosit toplanır ve laboratuvar ortamında erkeğin spermiyle aynı ortama konularak döllenme sağlanır. Daha sonra, döllenmiş embriyolar fertilizasyondan 3-5 gün sonra uterusu implante edilmektedir.

Zigot Intrafallopian Transfer (ZIFT) ve Gamet Intrafallopian Transfer (GIFT): ZIFT'de döllenmiş oosit doğrudan fallop tüpüne aktarılmaktadır. GIFT'te ise

fallop tüpüne sperm ve oosit karışımı yerleştirilmektedir ve orada döllenme meydana gelmektedir.

İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI): ICSI'de tek bir sağlıklı sperm doğrudan olgun bir oosit içerisine enjekte edilir. ICSI, semenin kalitesiyle ilgili bir sorun olduğunda veya çok az sperm olduğunda veya daha önce IVF döngüleri başarsız olduğunda kullanılmaktadır. Bununla beraber günümüzde en sık tercih edilen yöntem ICSI'dir.

Yardımlı Hatcing: Bu teknik sayesinde, embriyonun uterusu implantasyonu, embriyonun dış katmanlarının bozulması ile desteklenmektedir. Bu yöntem, embriyonun sorunsuz implant yapmasına yardımcı olmaktadır.

Donör Oosit ve Spermeleri: Yardımlı  reme teknolojisi çoğunlukla evli çiftin oositlerini ve spermelerini kullanmaktadır, ancak oosit ve spermelerle ilgili ciddi sorunlar olduğunda, verimi artırmak için spermeler veya hatta embriyo bir başkasından alınmaktadır.

Taşıyıcı Gebelik: Uterusu olmayan veya uterusu fonksiyonel olmayan bir kadın, kendi oositi ve eşinin spermisi ile oluşturulan embriyonun taşıyıcı anne vasıtasıyla taşınmasına karar verebilmektedir.

Evlat edinme: Bu, açıklanamayan birden fazla IVF başarsızlık döngüsü olan çiftler için bir seçenek olabilmektedir.

4.5. KONTROLLÜ OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON

Yardımlı  reme teknikleri (YÜT) erkek ve kadın infertilitesini tedavi etmek için kabul edilen, spontan olarak gebelik elde edemeyen çiftlerin, gebelik elde edebilmeleri için yapılan tüm işlemleri kapsayan ileri tekniklerdir ( zpuat 2017). YÜT uygulamalarından biri olan IVF, oosit ve spermelerin uygun laboratuvar koşullarında bir araya getirilerek d llenmelerini sağlayan işlemlerin bütünüdür (Delilbaşı 2008). Dünya genelinde 8 milyon bebek IVF uygulamalarıyla dünyaya gelmiştir (Ratna ve

ark. 2020). Günümüzde yapılan IVF uygulamalarının temeli kontrollü ovaryan hiperstimülasyondur.

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH), kaliteli embriyo eldesi için tek döngüde birden fazla folikül ve dolayısıyla birden fazla olgun oosit gelişimini uyarma tekniğidir (Howie ve Kay 2018). YÜT uygulamalarında hastadan birden fazla oosit elde edebilmek hem en kaliteli oositi seçmek hem de birden fazla embriyo üreterek en kaliteli bir veya iki embriyoyu transfer ederek başarı şansını arttırmak için KOH kritik önem taşımaktadır (Howie ve Kay 2018). Oosit kalitesini ve canlı doğum oranlarını arttırmak, düşük ovaryum rezervi olan hastalarda ovaryan yanıtı iyileştirmek ve herhangi bir komplikasyon riskini azaltmak için çeşitli KOH protokolleri geliştirilmiştir. GnRH agonist veya antagonistleri kullanılarak, hipofizyer downregülasyon sağlanarak veya downregülasyon olmadan farklı gonadotropinlerin kullanıldığı farklı tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Her hastaya uyabilen tek bir protokol olmadığından seçilen tedaviler kadının yaşını, ovaryum rezervini, hormonal durumunu, endometriozis, PKOS ve ovaryum kisti gibi ilişkili durumları ve varsa daha önceki IVF siklusunda cevapları göz önüne alınarak kişiselleştirilmelidir. Ek olarak, KOH protokolü, tedavi masrafları ve kadının tercihi açısından çiftlerle birlikte değerlendirilerek seçilmelidir. Bazı kadınlar daha hızlı olması nedeniyle kısa protokolü tercih edebilirken, bazıları endometriozis ile ilişkili ağrının kontrolü bakımından uzun protokolün denenmesini isteyebilmektedir (Gürkan ve ark. 2017).

IVF döngüsü, GnRH agonistleri kullanılarak hipofiz downregülasyonu ile başlamaktadır. Bunlar hipofiz fonksiyonunu engelleyerek erken endojen LH dalgalanmasını önlemektedir ve IVF başarı oranlarını iyileştirmektedir. Downregülasyon olmadan erken ovulasyon, döngülerin % 35'inde gerçekleşmektedir. Downregülasyon, ince bir endometriyum ve ultrasonda sessiz ovaryumlar ile doğrulanmaktadır. Downregülasyona ulaşmanın farklı yolları vardır.

GnRH agonistleri, GnRH reseptörleriyle etkileşen dekapeptidlerdir. Aminoasit sekansındaki bazı aminoasitlerin farklı yerleşimiyle doğal GnRH'a göre yarı ömrü (2-4 dakika) ve yeteneği artmış moleküllerdir. GnRH agonistlerinin kullanımı, prematüre LH pikini engelleyerek, foliküler aktivasyonu yükselterek ve elde edilen oosit sayısını arttırarak siklus iptal oranlarını azaltmaktadır, bu yolla da KOH'u optimize etmektedir (Gürkan ve ark. 2017). En yaygın yöntem olan GnRH agonistleri uzun protokolde

kullanılmaktadır ve foliküler fazın ortasında bu protokole başlanmaktadır. Başlangıçtaki uyarıcı etkiden sonra, agonistler GnRH reseptörlerini baskılamaktadır ve sonraki olayları inhibe etmektedir. Sürekli stimülasyon hipofiz bezini duyarsızlaştırarak gonadotropinlerin salınımını azaltmaktadır (Howie ve Kay 2018).

GnRH antagonistleri, GnRH reseptörlerine yarışmalı olarak bağlanarak gonadotropin sekresyonunda ani, hızlı ve geri dönüşümlü inhibisyona neden olmaktadır. GnRH antagonistleri gibi antagonistler de aminoasit sıralamasındaki değişimler ile elde edilmektedir. Akut baskılatıcı etkilerinden dolayı GnRH antagonistleri prematüre LH pikini engellemek amacıyla tedavi sürecine, foliküler fazın herhangi bir aşamasında başlanabilmektedir. Verilişlerini takiben hızlı ve geri dönüşümlü olarak FSH ve LH salınımını inhibe etmektedirler (Kahyaoğlu 2019; Gürkan ve ark. 2017).

GnRH agonist veya antagonistlerinden sonra gonadotropinler ile foliküler gelişim başlatılmaktadır. Önceleri, insan üriner menopozal gonadotropinleri kullanılmıştır, ancak bunlar kontaminasyon ajanları ve LH ve FSH'ın değişken konsantrasyonlarını içerdiğinden alternatifler aranmıştır. Daha sonra, rekombinant FSH ve LH geliştirilmiştir (Nardo ve ark. 2013). Rekombinant FSH, 2011 yılında yayınlanan bir derlemede, idrar kaynaklı gonadotropinler ile karşılaştırılmış ve canlı doğum hızı veya ovaryan hiperstimülasyon sendromu oranlarında klinik olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Gonadotropin seçiminin ilaca ulaşılabilirlik ve maliyetlere bağlı olması önerilmektedir (van Wely ve ark. 2011).

GnRH agonistleri LH salınımını baskıladığından, sonraki LH eksikliği foliküler olgunlaşmayı önleyebilmektedir ve IVF başarısını azaltabilmektedir. LH desteği, rekombinant LH ile sağlanabilmektedir veya üriner insan menopozal gonadotropininden saflaştırılan FSH ile kombine edilebilir. Bununla beraber 2018 yılında yapılmış başka bir derlemeye göre ise rekombinant LH'ın gebelik oranını artırabildiği, ancak canlı doğum hızında iyileşme olmadığını gösteren bazı kanıtlar gösterilmiştir (Howie ve Kay 2018).

Doğal bir döngüde LH'ın ani yükselişi, oositin metafaz II'ye geçmesini, baskın folikülün yırtılmasını ve korpus luteumun oluşmasını sağlamaktadır. IVF protokolünde bu aşama, yapısal olarak LH'a benzer olduğu için genellikle hCG enjeksiyonuyla indüklenmektedir. Yapılan bir çalışmada, rekombinant ve üriner hCG

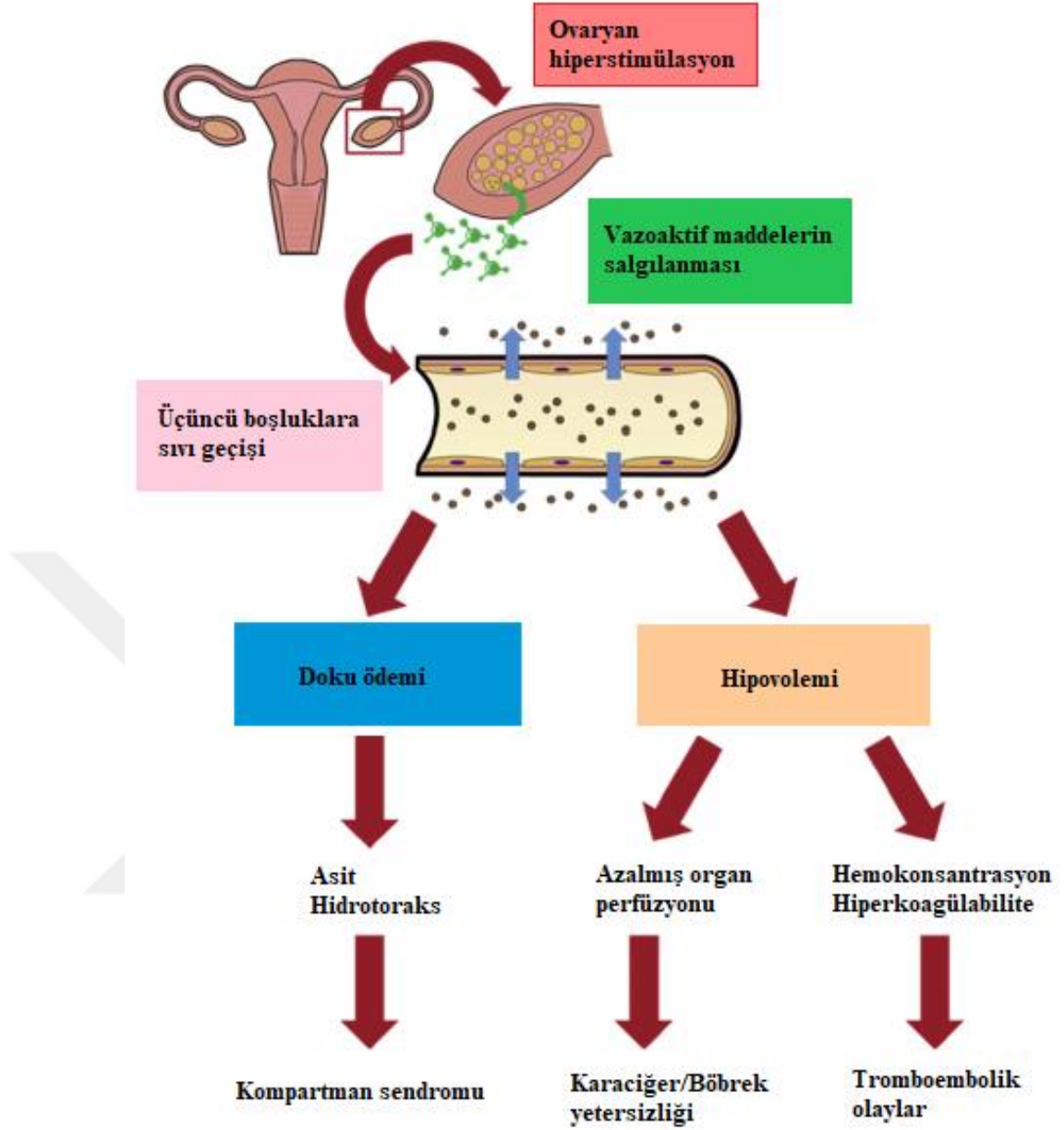
karşılaştırılmış ve hCG kullanıldığında oosit sayısının arttığı gösterilmiştir (Youssef ve ark. 2016). En sık kullanılan matürasyon yöntemi olmasına rağmen hCG'nin, Ovaryan hiperstimülasyon sendromuna neden olduğunu bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur (Çetin ve ark. 2017).

4.6. OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON SENDROMU

4.6.1. Tanımı

Ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS), infertilite tedavisinde kullanılan KOH'un iyatrojenik bir komplikasyonudur. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre şiddetli OHSS oranı % 0,2-1 arasındadır (Çetin ve ark. 2017). Bu oran 18. Avrupa IVF Gözlem Raporu'na göre 2014 yılında % 0,3 olarak tespit edilmiştir (De Geyter ve ark. 2018). Sendrom, intravasküler alandan ekstravasküler alana sıvı geçişi ile karakterizedir. Sıvı geçişleri ilk etapta abdominal boşluğa olurken, daha ileri vakalarda plevral ve perikardiyal alanlara da olabilmektedir. Kadınlarda erken luteal fazda veya erken gebelik döneminde oluşabilmektedir. Genellikle, ovulasyonun uyarılmasından birkaç gün sonra belirtiler ortaya çıkmaktadır (Şekil 7) (Delvigne ve Rozenberg 2002; Çetin ve ark. 2017).

OHSS'nin başlangıç formunda, ovaryumların boyutunda artış ve abdominal rahatsızlıklar görülmektedir. Sonrasında, ovaryumlar kistik hale gelmekte ve abdominal şişkinlik, ağrı, mide bulantısı, kusma ve bazen de ishal ortaya çıkmaktadır. İleri evrelerde, sadece vajinal ultrason ile belirlenebilen asit veya klinik boyutlara ulaşan asit gözlenmektedir. Protein açısından zengin bu ekstravasküler sıvı, peritonda, plevrada ve hatta perikardiyak boşlukta birikmektedir. İntravasküler hacmin azalmasına ve hemokonsantrasyon, vazokonstriktör ve antinatriüretik faktörlerin artmasına, ciddi hipoalbuminemi ve bazen hipovolemi, oligüri ve elektrolit dengesizliğine neden olmaktadır. Tromboembolik fenomen OHSS'nin nihai komplikasyonudur ve sonuçta çoklu organ yetmezliği (renal, hepatik ve respiratuvar sistem başarısızlığı) ile ölüme sonuçlanabilmektedir (Delvigne ve Rozenberg 2002; Blumenfeld 2018).



Şekil 7. OHSS patofizyolojisi (Timmons ve ark. 2019)

4.6.2. Sınıflandırılması

OHSS sınıflandırmalarının amaçları iki yönlüdür: (i) tahmin etme ve önleme becerilerini geliştirmek için OHSS'nin farklı şiddet aşamaları ve derecelerinin insidansını karşılaştırmak ve (ii) yönetim şemalarını standart ve optimize hale getirerek tedaviyi kişiselleştirmek. Bu nedenler doğrultusunda OHSS hafif, orta, şiddetli ve kritik olmak üzere 4 sınıfa ayrılmıştır. Veriler, tüm IVF sikluslarında hafif OHSS insidansının % 20-30, orta-şiddetli OHSS insidansının % 1-5 ve kritik OHSS

insidansının % 01-2 olduğu bildirilmiştir. OHSS sınıflandırması ve klinik belirtileri Tablo 2’de özetlenmiştir (Çetin ve ark. 2017; Blumenfeld 2018).

Tablo 2. OHSS sınıflandırması ve klinik belirtileri

Sınıf	Klinik belirtiler
Hafif	Karın şişkinliği Hafif bulantı-kusma Diyare 5cm’den küçük çaplı ovaryumlar
Orta	Hafif formun belirtilerine ek olarak karında asit varlığı
şiddetli	Orta formun belirtilerine ek olarak; Klinik asit şiddetli karın ağrısı şiddetli bulantı-kusma Kilo alımı artışı Plevral effüzyon şiddetli dispne Oliguri/Anüri Senkop Venöz tromboz
Kritik	şiddetli formun belirtilerine ek olarak; Akut böbrek yetmezliği Aritmi Perikardiyal effüzyon Tromboemboli Massif hidrotoraks Sepsis Akut Respiratuvar Distres Sendromu

4.6.3. Patofizyolojisi

Kesin patofizyolojik mekanizmalar açık bir şekilde aydınlatılmamış olsa da OHSS'nin klinik belirtilerinden sorumlu altta yatan mekanizma, kan damarlarının kılcal geçirgenliğinde bir artış gibi görünmektedir. Bu artmış vasküler geçirgenlik, akut hemodinamik anormallikler ve geniş klinik semptomlar ile ilişkili olarak sıvının intravasküler boşluktan ekstravasküler alanlara ve vücut boşluklarına hızlı ve yoğun bir şekilde geçmesine neden olmaktadır. OHSS'nin patofizyolojik sürecine çeşitli sistemlerin ve araçların dahil olduğu ileri sürülmüştür. Başlıca nedenler şunlardır (Nastri ve ark. 2010; Blumenfeld 2018):

- Ovaryan renin-anjiyotensin sistemi
- LH ve hCG
- Histaminler
- Sitokinler
- Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)
- Pigment Epiteli Kaynaklı Faktör (PEDF)

Ovaryan renin-anjiyotensin sistemi

Plazma renin aktivitesi ile OHSS'nin şiddeti arasında doğrudan bir korelasyon yirmi yıldan uzun bir süre önce tanımlanmıştır. Prorenin, başlıca böbrekteki jukstaglomerüler hücrelerde sentezlenmektedir. Ek olarak ovaryum, plasenta ve diğer dokular tarafından da üretilmektedir. Anjiyotensinojen, renin tarafından anjiyotensin I'e dönüştürülmektedir. Anjiyotensin I, anjiyotensin dönüştürücü enzim ile anjiyotensin II'ye dönüştürülmektedir. Menstrual döngüde proreninin LH ve progesteron ile korelasyon gösterdiğini belirtilmiştir. Menstrual döngünün ortasındaki LH artışına paralel olarak prorenin artışı ve orta luteal fazda progesteron artışına paralel olarak aktif renin artışı olmaktadır. Plazmadaki prorenin ayrıca KOH uygulamasındaki hCG indüksiyonundan sonra yaklaşık 10 kat artmaktadır. OHSS'li kadınlarda anjiyotensin II'nin foliküler sıvı ve abdominal asit konsantrasyonu, plazma konsantrasyonundan daha yüksektir ve şiddetli OHSS durumunda plazma anjiyotensin dönüştürücü enzimin de yükseldiği bildirilmiştir (Nastri ve ark. 2010; Palumbo ve ark. 2016; Blumenfeld 2018).

LH ve hCG

hCG, yaklaşık 36 kDa'lık bir glikoproteindir. Özel fizyolojik rollere sahip 4 farklı hCG birimi bulunmaktadır ve ortak α ve β alt birimlerini paylaşmaktadır. Bunlar plasental hCG (tipik), hiperglikolize hCG (h-hCG), hipofizyer hCH (p-hCG) ve kanser hücreleri tarafından salgılanan hiperglikolize β -alt birimdir. Tipik hCG ve p-hCG, hormonal fonksiyona sahipken, hiperglikolize analogları otokrin/parakrin etki göstererek daha lokal görevler üstlenmektedir (Borisova ve ark. 2017).

hCG, LH ile aynı LHR reseptörüne bağlanmaktadır. LHR, G-protein eşlikli bir reseptördür. hCG'nin reseptör afinitesi LH'tan daha yüksektir ve yarılanma ömrü LH'tan daha fazla olduğundan reseptör uyarımı daha uzun sürelidir (Borisova ve ark. 2017).

Ovaryumlardaki LHR, teka ve granüloza hücre yüzeylerinde yer almaktadır. Bu reseptör, LH veya hCG varlığında sinyal iletimini 2 yolak ile sağlamaktadır. Bunlardan ilki Fosfolipaz C, Protein Kinaz C (PKC) ve Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Protein Kinazlar 1 ve 2 (ERK1/2) aktivasyonudur. Uyarılan diğer yolakta ise Adenilat Siklaz (AC) işlev görmektedir. AC'nin aktivasyonu, Protein Kinaz B (AKT), Protein Kinaz A ve ERK1/2 molekülleriyle sinyal akışını sağlamaktadır. Sonuçta, steroidogenez ve gen ifadeleri regüle edilmektedir (Borisova ve ark. 2017).

Yapılan çalışmalar, OHSS'nin ana nedeninin, mevcut IVF protokollerinde oosit olgunlaşmasını indüklemek için hCG kullanımınıdır. Normal menstrual döngüde oosit olgunlaşması için fizyolojik uyarıcı, yaklaşık 48 saatlik bir süreye sahip LH dalgalanmasıdır. hCG, uygulandıktan sonra bir haftaya kadar dolaşımda kalan LH benzeri aktiviteye sahiptir ve bu nedenle ovaryumların aşırı stimülasyonuna ve OHSS oluşumuna neden olmaktadır (Abbara ve ark. 2015).

Histaminler

Hayvan modelinde OHSS'nin antihistaminik preparatlar uygulanarak tavşanlarda bloke edilebildiği bildirilmiştir. Antihistaminik ile tedavi edilen hayvanlarda hiperstimüle ovaryumların kontrol grubuna göre daha hızlı gerilediği gözlenmiştir. Bu deneysel çalışmalar umut verici sonuçlar vermesine rağmen, daha sonraki çalışmalar OHSS'nin indüklendiği tavşanlar ve kontroller arasındaki histamin düzeylerinde hiçbir fark olmadığını göstermiştir (Dauod ve Schenker 2018).

Sitokinler

Bazı immün sistem ürünleri OHSS patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir. Bazı sitokinler, geç foliküler olgunlaşma, ovulasyon, korpus luteum fonksiyonu ve embriyo implantasyonu sırasında meydana gelen inflamatuvar süreçle ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, Tümör nekroz faktörü α (TNF- α), İnterlökin-1 (IL-1), -2 (IL-2), -6 (IL-6) ve -8 (IL-8)'in vasküler geçirgenlik değişimlerini uyardığı bildirilmiştir. IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyeleri OHSS hastalarının periton sıvısında kontrollere göre anlamlı derecede artmıştır. IL-6 ayrıca anjiyogenez sürecine de katılmaktadır (Pellicer ve ark. 2019).

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

OHSS gelişimini sağlayan gerçek faktör bir dizi ön koşulu yerine getirmelidir. İfadesi hCG ile arttırılmalı ve OHSS vakalarında daha yüksek olmalıdır. Vasküler geçirgenlik üzerinde belirgin ve güçlü bir etkiye sahip olmalıdır ve bu faktörün inhibisyonu OHSS'nin klinik belirtilerini inhibe etmelidir (Pellicer ve ark. 2019).

Günümüzde hCG'nin etkilediği faktör, tümör hücreleri tarafından salgılandığında önemli ölçüde vasküler geçirgenliğe neden olabilmesi nedeniyle başlangıçta Vasküler Geçirgenlik Faktörü (VPF) olarak tanımlanan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) olarak kabul edilmektedir. Histamin ile karşılaştırıldığında, VEGF endotel geçirgenliğini 50.000 kat arttırmaktadır (Roberts ve Palade 1995).

İnsan VEGF geni 6p12 kromozomu üzerinde yer almaktadır ve sekiz eksondan oluşmaktadır. VEGF geni, kemirgenlerde ve insanlarda aynı ekzon yapısını göstermektedir, aralarında % 95 protein homolojisi vardır (Burchardt ve ark. 1999). VEGF, 38-46 kDa'luk heparin bağlayan homodimerik glikoproteindir. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) ailesine aittir ve ovaryumdaki granüloza hücrelerinden de salgılanan ana proanjyogenik faktördür (Pellicer ve ark. 2019). Sıçan ovaryumundaki hibridizasyon çalışmaları, çoğunlukla LH dalgalanmasından sonra VEGF mRNA ifadesinin önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Phillips ve ark. 1990).

VEGF biyolojik etkilerini, tirozin kinaz reseptör ailesine (VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (Flk1/KDR)) ait olan ve endotelial hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak gerçekleştirmektedir. VEGFR-2, vasküler geçirgenlik, anjiyogenez ve vaskülogenezin düzenlenmesinde rol oynarken, VEGFR-1, endotelial hücreler

arasındaki sıkı bağlantıların oluşumunu ve korunmasını kontrol etmektedir (Shalaby ve ark. 1995). Ek olarak VEGFR-1, mRNA öncülünün alternatif splicing ile çözünür bir reseptör (sVEGFR-1) olarak üretilmektedir (Kendall ve ark. 1996). Bu reseptörün VEGF'yi bağlamak için VEGF-1 ve VEGF-2 reseptörleri ile rekabet ettiği ve vasküler geçirgenliği engellemek için VEGFR-2 ile heterodimerize olduğu görülmektedir (Roeckl ve ark. 1998).

VEGF'nin KOH hastalarında hCG ile arttığına dair birçok kanıt mevcuttur. Gonadotropin stimülasyonunu KOH olarak uygulayan bazı deneyler, ovaryumların genişlediğini, abdominal asit artışının bulunduğunu ve ovaryan VEGF, VEGFR-2 mRNA ve protein seviyelerinin arttığını göstermiştir. hCG uygulaması tüm bu parametreleri maksimum düzeye çıkarmıştır. Bu etkiler çevre dokulara değil ovaryuma özgüdür. Bununla birlikte overektomize hayvanlarda asit oluşmamıştır (Gomez ve ark. 2003; Gómez ve ark. 2011).

Scotti ve ark (2014), 36 sıçan kullandıkları çalışmalarında deneysel OHSS oluşturulan sıçanlarda, VEGF inhibitörü olan TRAP ile VEGF'yi inhibe etmişlerdir ve sonuçta OHSS'nin erken belirtileri olan progesteron ve östrojen seviyelerindeki artışın ve ovaryumdaki kistik yapılardaki artışın azaldığını göstermişlerdir (Scotti ve ark. 2014).

Endotelial hücre-hücre bağlantıları VEGF'nin hedefleridir. Artmış VEGF düzeyleri ile birlikte kaderin ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir. Ek olarak endotelial hücrelerde konformasyonel değişimler ve buna bağlı vasküler geçirgenlik artışı saptanmıştır (Villasante ve ark. 2007). Tüm bu bulgulara dayanarak OHSS patogenezinin temel bileşeninin VEGF artışı olduğu kabul edilmektedir (Bar-Joseph ve ark. 2016).

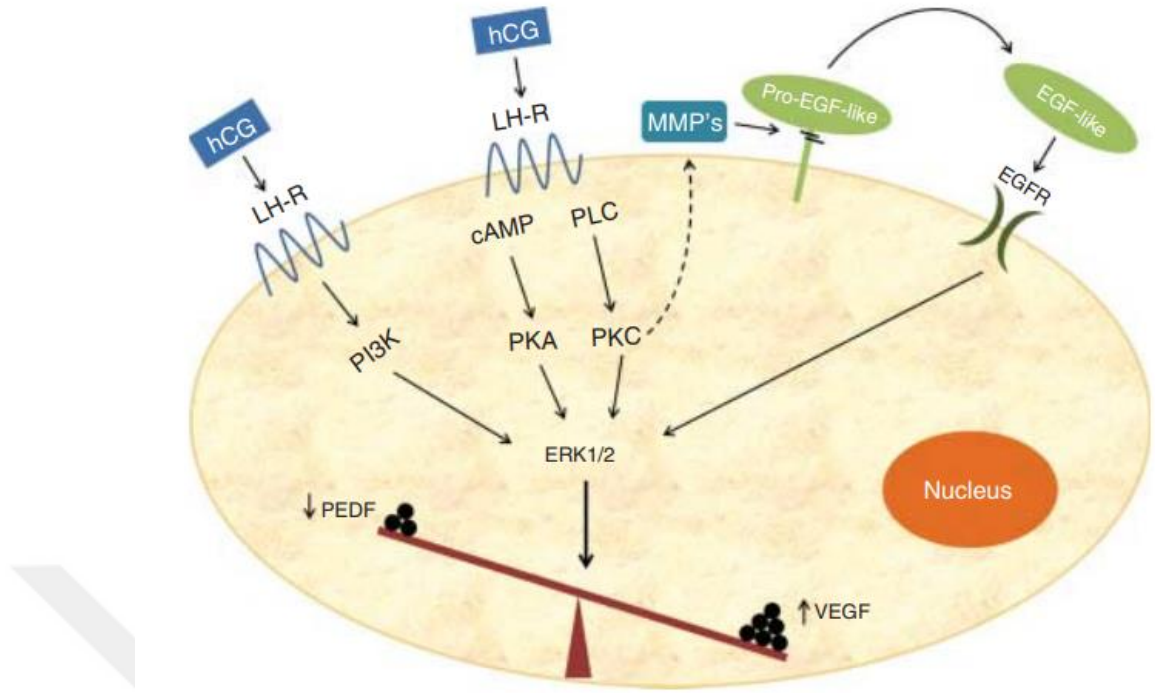
Pigment Epiteli Kaynaklı Faktör (PEDF)

Son birkaç yılda PEDF, OHSS patofizyolojisinin yeni bir faktörü ve olası aracısı olarak ortaya çıkmıştır. PEDF, 50kDa'luk bir glikoproteindir. Serin proteaz inhibitörleri ailesine ait, nörotrofik ve immünomodulator özelliklere sahip doğal bir anjiyogenez inhibitörüdür PEDF, proanjiyogenik faktörlerin aktivitesini inhibe etmektedir ve VEGF'nin endotelial hücreler üzerindeki etkilerini inhibe edebilmektedir. Bir grup araştırmacı, PEDF'nin hormonlara bağlı olarak granüloza

hücrelerinde ifade edildiğini ve salgılandığını bulmuşlardır (Chuderland ve ark. 2013; Craword ve ark. 2013; Miller ve ark. 2015; Bar-Joseph ve ark. 2016; Miller ve ark. 2016).

Chuderland ve ark granüloza hücrelerinde ve fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, hCG'nin, *in vivo* ve *in vitro* PEDF ekspresyonunu azalttığını ve PEDF ekspresyonunun, VEGF ekspresyonunun zıt yönlü çalıştığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, PEDF ve VEGF arasındaki dengenin ovaryumun fizyolojik fonksiyonunu düzenlediği ve bu iki antagonistik regülatör arasındaki hassas dengenin kısmen hCG veya LH tarafından modüle edilebildiğini belirtmişlerdir (Chuderland ve ark. 2013).

Granüloza hücrelerindeki LH sinyal yolağı iyi bilinmektedir. LH, G-protein eşlikli LH reseptörüne bağlanarak hücre içindeki PKA ve PKC yolağını aktive etmektedir. Ayrıca, LH ile stimülasyon, kısmen PKA ve PKC'nin de aracılığıyla, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) benzeri büyüme faktörleri ile EGF reseptörünün transaktivasyonunu indüklemektedir. Bar-Joseph ve ark yaptıkları çalışmada, PEDF'nin hCG ile azaldığını; bu azalmanın PKA ve PKC yolakları üzerinden olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada, PKA ve PKC'nin inhibisyonunun, PEDF azalmasını önlediğini; PKC agonisti verildiğinde ise PEDF'nin azalma gösterdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, hCG'nin PEDF seviyesini azaltırken, VEGF seviyesini arttırdığı ve bu yolağın PKA ve PKC aracılı olduğu rapor edilmiştir (Şekil 8) (Bar-Joseph ve ark. 2016).



Şekil 8. hCG aracılı PEDF ve VEGF sinyalizasyonunun şematik gösterimi (Bar-Joseph ve ark. 2016)

4.6.4. Risk Faktörleri

Çok sayıda risk faktörü OHSS gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bunlar:

- Genç yaş
- Daha önceki OHSS öyküsü
- PKOS
- Bazal serum AMH düzeyinin >3,3ng/ml olması ve >8 adet antral folikül varlığı
- Folikül sayısı (>10mm üzeri >20 adet folikül)
- Yüksek veya hızla yükselen serum östrojen konsantrasyonu.
- IVF’de toplanan oosit sayısı (bu sayı arttıkça risk artmaktadır)
- Luteal faz desteği için progesteron yerine hCG kullanılması
- Gebelik oluşması

Genç yaşta olmanın OHSS riskini arttırdığı düşünülmektedir. Bunun nedeni, genç bir ovaryumda daha fazla sayıda gonadotropin reseptörünün bulunması ve

stimülasyona duyarlılığın daha yüksek olması olarak açıklanmıştır (Timmons ve ark. 2019). Geniş kapsamlı (144 çalışman) yapılan sistematik derlemede, 35 yaşın altındaki kadınlarda OHSS riskinin % 60 daha fazla bulunduğu rapor edilmiştir (Medicine 2016). Ancak bazı çalışmalar, genç yaşın OHSS riskini arttırmadığını da belirtmektedir (Çetin ve ark. 2017).

PKOS'un, OHSS riskini arttırdığı bildirilmiştir. Özellikle 10 mm'den küçük 10 adetten fazla folikül varlığı OHSS'ye zemin oluşturmaktadır (Timmons ve ark. 2019). Yapılan bir çalışmada, şiddetli OHSS hastalarının % 63'ünün aynı zamanda PKOS hastası olduğu gösterilmiştir (MacDougall ve ark. 1993).

Daha önceden OHSS geçirmiş olan kadınların yeni IVF döngüsünde tekrar OHSS geliştirme riski yüksektir. Tatar ve ark, OHSS geçmişi olan kadınlardaki OHSS gelişme riskini, olmayanlara göre 15,2 kat daha fazla bulmuşlardır (Tatar ve ark. 2013).

Yüksek bazal AMH, OHSS'nin birincil risk faktörleri arasında tanımlanmıştır. Lee ve ark tarafından 262 IVF hastası ile yapılan çalışmaya göre, 3,6 ng/ml bazal serum AMH seviyesindeki artışa bakılarak, % 90,5 hassasiyet ve % 81,3 özgüllük ile OHSS tahmin edebilmektedir (Lee ve ark. 2008).

Antral folikül sayısı, OHSS gelişimini tahmin etmede yardımcı olabilmektedir. Jayaprakasan ve ark'nın 2012 yılında yaptığı bir çalışmada, 24'ten fazla antral folikül varlığının orta ve şiddetli OHSS riski ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir (Jayaprakasan ve ark. 2012).

OHSS insidansının analiz edildiği tüm çalışmalarda, sendromun ortaya çıkmasının gebelik şansı ile bağlantılı olduğu kaydedilmiştir. OHSS gelişme riski hem IVF'de hem de ovaryum indüksiyon döngülerinde hamilelik meydana geldiğinde 2 ile 5 kat daha yüksektir (Delvigne ve Rozenberg 2002). Erken OHSS'nin eksojen hCG uygulamasının akut bir sonucu (hCG uygulamasında sonraki 1-10 gün içinde) olduğu ileri sürülürken, geç OHSS, gebeliğe bağlı olarak salgılanan endojen hCG (hCG uygulamasından 13-38 gün sonra) tarafından indüklendiği ve sadece gebe hastalarda, özellikle birden fazla gebelik kesesi olanlarda gözlemlendiği bildirilmiştir (Lee ve ark. 2010).

Başlangıçta östrojenin OHSS patofizyolojisindeki rolü büyük ilgi uyandırmıştır, çünkü bu hormonun yüksek seviyesi bu sendromla güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu ilişki, araştırmacıları östrojen konsantrasyonundaki yükselmenin bu sendroma neden olduğuna inanmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, östrojenin OHSS gelişimi için gerekli olmadığı gösterilmiştir; çünkü 17,20-desmolaz aktivite eksikliği olan bir kadında, düşük östradiol düzeylerine rağmen IVF sırasında OHSS gelişmiştir. Ek olarak, sadece yüksek östradiol seviyeleri değil, hCG de yükseldiğinde OHSS ortaya çıkmaktadır. Günümüzde artmış serum östradiol ve OHSS seviyeleri arasındaki ilişki, sadece granüloza hücre aktivitesinin bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, OHSS görülen kadınlarda serum östrojen seviyesi yüksek olduğundan (2500 pg/ml'den fazla) veya hızla yükseldiğinden, östrojen hala OHSS belirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Nastri ve ark. 2010).

4.6.5. Önlenmesi

OHSS'nin önlenmesi ve erken tanınması hastanın güvenliğini sağlamak için önemlidir. Önlemenin ilk adımı, hastanın stimülasyon olgusunu bireyselleştirmek için risk faktörlerinin tanımlanmasıdır. Ovulasyon indüksiyonu için stimülasyon şemalarının doğru adaptasyonu OHSS insidansının azalmasına neden olmaktadır. Daha sonra, gonadotropinlere karşı ovaryan cevabın sıkı bir şekilde izlenmesi ve stimülasyonun ovaryum yanıtına göre uyarlanması gerekmektedir (Delvigne ve Rozenberg 2002). OHSS'yi tamamen ortadan kaldıracak hiçbir yöntem yoktur. Bununla birlikte, önlenmesi hayat kurtarıcı olabilir ve esas olarak tedavisi yerine tercih edilmektedir.

Ovulasyon indüksiyonu: OHSS riski geçmişe, fizik muayeneye, ultrason sonuçlarına ve antral folikül sayısına göre ayrı ayrı değerlendirilmelidir. PKOS'lu hastalar OHSS için daha yüksek risk altındadır. PKOS'lu hastalarda ovulasyon için minimum gonadotropin dozu kullanılmalıdır ve yavaşça arttırma stratejilerinin, yavaşça azaltma stratejilerinden üstün olduğu düşünülmektedir. Bir arttırma stratejisi sırasında, düşük dozda gonadotropin (75 IU) ile ovulasyon indüksiyonu başlatılır. Gonadotropin, ancak 10 mm'den daha büyük bir folikül geliştirilmemişse, 14 gün sonra artacaktır. Uygun doz 18 mm'den büyük en az 1 folikül üretilinceye kadar sürdürülmelidir (Jahromi ve ark. 2018).

Metformin: Kapsamlı bir derlemede (798 vaka ile yapılan 8 randomize kontrollü çalışma yer almaktadır), metforminin OHSS riskini % 63 oranında azalttığı, klinik gebelik oranlarını arttırdığı ve canlı doğum oranlarına etki etmediği sonucuna varılmıştır. OHSS'yi önlemek için KOH'tan en az 2 ay önce günlük 1000 ile 2000 mg arasında metformin dozu önerilmektedir (Tso ve ark. 2014).

Ovulasyon için aromataz inhibitörleri: Aromataz inhibitörleri, sitokrom p450 enzimlerini inhibe ederek östrojen üretiminin azalmasına neden olmaktadır. Bu yolla, FSH üretimi artmakta ve folikülogenez uyarılmaktadır. Sonuç olarak, negatif feedback mekanizmaları bozulmadan kalmakta ve ovulasyon uyarımı sırasında OHSS insidansını azaltmaktadır. Bununla birlikte, bir Cochrane derlemesi, diğer ovulasyon uyarıcı ilaçların aksine aromataz inhibitörlerinden sonra OHSS oranlarında herhangi bir fark gösterememiştir (Jahromi ve ark. 2018).

Polikistik over sendromlu hastalarda laparoskopik ovaryan drilling: Laparoskopik ovaryan drilling (LOD), ovaryum stimülasyonundan önce ovulasyonu arttırmak için alternatif bir yöntem olarak düşünülebilmektedir. LOD'un temel avantajı, ovulasyon indüksiyonu için gerekli gonadotropinlerin dozunu ve süresini azaltmaktır. LOD, bir veya her iki ovaryum için, 4-10 mm derinliklerde 4-10 koterizasyon noktasını indükleyebilmektedir. Her bir ovaryumda 4 noktadan daha az drilling uygulaması, gebelik oranlarının düşmesine ve 10'dan fazla noktanın indüklenmesi ovaryum hasarına neden olabilmektedir. En iyi sonuçlar yüksek serum LH seviyesine sahip zayıf kadınlarda görülmüştür (Jahromi ve ark. 2018).

hCG alternatifleri: Foliküllerin olgunlaşmasını ve ovulasyonu tetiklemek için tercih edilen ilaç, OHSS gelişiminin olası riskine dayanarak seçilmelidir. Ekzojen hCG, uzun süredir LH artışını tetiklemek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, 24 saati aşan uzun yarılanma ömrü nedeniyle luteotrofik etkilere yol açmaktadır (Jahromi ve ark. 2018). hCG'nin geleneksel 10000 IU dozu yerine 3300 IU hCG dozunun YÜT uygulamalarında etkili olduğu, ancak 2000 IU dozunun etkili olmadığı bildirilmiştir. Fakat düşük doz uygulamaları ve OHSS riski arasında henüz bir fikir birliği yoktur (Fiedler ve Ezcurra 2012). Serum östrojen konsantrasyonları 3000 µg/ml'den yüksek olan kadınlarda hCG dozunun yarıya düşürülmesi tavsiye edilmektedir.

GnRH agonistleri, hipofizden LH salınımını uyararak, yarılanma ömrü hCG'den daha kısa gonadotropin kaynağı sağlamaktadır. Yüksek OHSS riski taşıyan kadınlarda,

GnRH antagonisti protokolü sırasında ovulasyonun GnRH agonisti ile sağlanması ve embriyoların dondurulması stratejisi, OHSS riskini neredeyse ortadan kaldırmaktadır. Ancak yapılan bir çalışmaya göre bu yaklaşım, hCG yaklaşımına göre gebelik oranlarını düşürmektedir (Jahromi ve ark. 2018).

GnRH reseptörü olan GnRH-R, ilk olarak fare gonadotrop hücre hattından, sonrasında çok sayıda memeliden, omurgalıdan ve omurgasızlardan klonlanmıştır. Bu reseptör, 7 transmembran zincire sahip G-protein eşlikli reseptördür. Diğer G-protein eşlikli reseptörlerden farkı, sinyal inhibisyonu için dakikalar içinde duyarsızlaşmasına neden olan karboksil terminal kuyruğunun olmamasıdır. Böylece ovulasyon için gerekli olan uzun süreli LH kaynağı sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, GnRH agonistlerinin uzun süreli (1-3 hafta) kullanımı, insanlarda dolaşımdaki gonadotropinlerde düşüşe neden olmaktadır. Duyarsızlaştırma mekanizması temel olarak inositol trifosfatın Ca^{+2} mobilizasyonunu sağlayamaması ve/veya protein kinaz aktivasyonunun yavaşlamasıdır. Gonadotrop hücre GnRH agonistine cevap vermeye devam eder ancak biyolojik olarak aktif gonadotropinleri salgılayamamaktadır (Millar ve Newton 2013).

Teorik olarak rekombinant LH kullanımı, OHSS riskini azaltmaya uygun bir stratejidir. Ancak Youssef ve ark rekombinant ve üriner hCG arasında bir farka rastlamamışlardır (Youssef ve ark. 2016). Daha sonra yapılan çalışmalarda rekombinant LH'in düşük gebelik oranıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Papanikolaou ve ark. 2011).

OHSS riski yüksek olan hastaların GnRH antagonist protokollerinden geçtikten sonra minimum risk taşıyacağı kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, GnRH antagonist protokollerinin kullanımlarının ilk yıllarından sonra etkinliği ve gebelik oranları ile ilgili tartışmalar olmuştur. Kanada Jinekoloji ve Obstetrik Cemiyeti yüksek riskli kadınlarda ve oosit veya embriyonun dondurulacağı uygulamalarda GnRH antagonistine ek olarak GnRH agonisti kullanılmasını önermektedir (Çetin ve ark. 2017).

Coasting yaklaşımı: Bu yaklaşım gonadotropinlerin kesilmesi ve hCG uygulamasının geciktirilmesi veya ertelenmesi anlamına gelmektedir. Serum östrojen seviyesinin veya folikül sayısının çok yüksek düzeye ulaştığı hastalarda, hCG uygulaması, östrojen seviyeleri düşene veya sabit kalana kadar birkaç gün

geciktirilebilmektedir. Coasting süresi boyunca hiçbir gonadotropin uygulanmamalıdır. Serum östrojen seviyesi genellikle her 2 günde bir iki katına çıkar ve önde gelen foliküller 8-10 mm'ye ulaştığında ve LH reseptörleri ortaya çıktığında folikül çapı günde 1,5-2 mm artar. Gonadotropin uygulaması durdurulduktan sonra, olgun foliküller 4 gün boyunca büyümeye ve serum östrojen konsantrasyonları yaklaşık 1 veya 2 gün boyunca artmaya devam etmektedir. Erteleme işlemi, gebelik oranlarının düşmemesi için 4 günden fazla sürmemelidir (Jahromi ve ark. 2018).

Kadınlarda KOH protokolü esnasında ortaya çıkan bulgulara göre stimülasyon siklusu hCG verilmeden iptal edilebilmektedir. Ancak foliküler gelişim uyarıldığı için, endojen LH'a bağlı olarak ovulasyon olabilmekte ve gebelik oluşabilmektedir. Bunun sonucunda ise, yüksek riskli kadında gebelikle beraber OHSS bulguları daha da kötüleşebilir. Bu nedenle, siklus iptali yapılan kadınlara 11 güne kadar koitus yasağı da getirilmektedir (Delvigne ve Rozenberg 2002).

Albümin: OHSS'yi önlemek için intravenöz albümin uygulanması önerilmektedir. Albüminin, vazoaktif maddelerin korpus luteumdan salınmasını önlediği ve OHSS'yi indükleyebilecek diğer ek maddelerin sentezini inhibe ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, albümin intravasküler hacmi korumaya yardım ederek hipovolemi, hemokonsantrasyon, asit ve plevral efüzyon gelişimini önleyebilmektedir (Venetis ve ark. 2011).

Hidroksietil starch solüsyonu: İnsan albümininde kontaminasyon olabilmesi ihtimali farklı bileşik ihtiyacı doğurmuştur. Hidroksietil starch solüsyonu (HES), biyolojik olmayan, ucuz bir çözüldür. Bu çözüldede farklı molekül ağırlığına sahip çeşitli bileşikler bulunmaktadır. HES, İntravasküler hacmi belirgin şekilde arttırarak ozmotik basınç artışı sağlamaktadır. Ayrıca serumdaki yarılanma ömrü yaklaşık 10 saattir ve platelet birikimine neden olmamaktadır. Bu yönleriyle OHSS riskini azalttığı düşünülmektedir (Delvigne ve Rozenberg 2002).

Dopamin agonisti kullanma: Son kanıtlar, hCG uygulanan günden itibaren bir dopamin agonistinin uygulanmasının, hCG'ye bağlı VEGFR-2 fosforilasyonunu inhibe ederek OHSS insidansını azaltabildiğini göstermektedir. Dopamin agonistelerine kabergolin ve guinadagolid örnektir. İntravenöz albümin ile kabergolin kullanımını karşılaştıran iki randomize kontrollü çalışma, kabergolinin (0,5 mg/gün) OHSS'nin önlenmesinde albümininden daha etkili olduğunu, kabergolinin hematokriti,

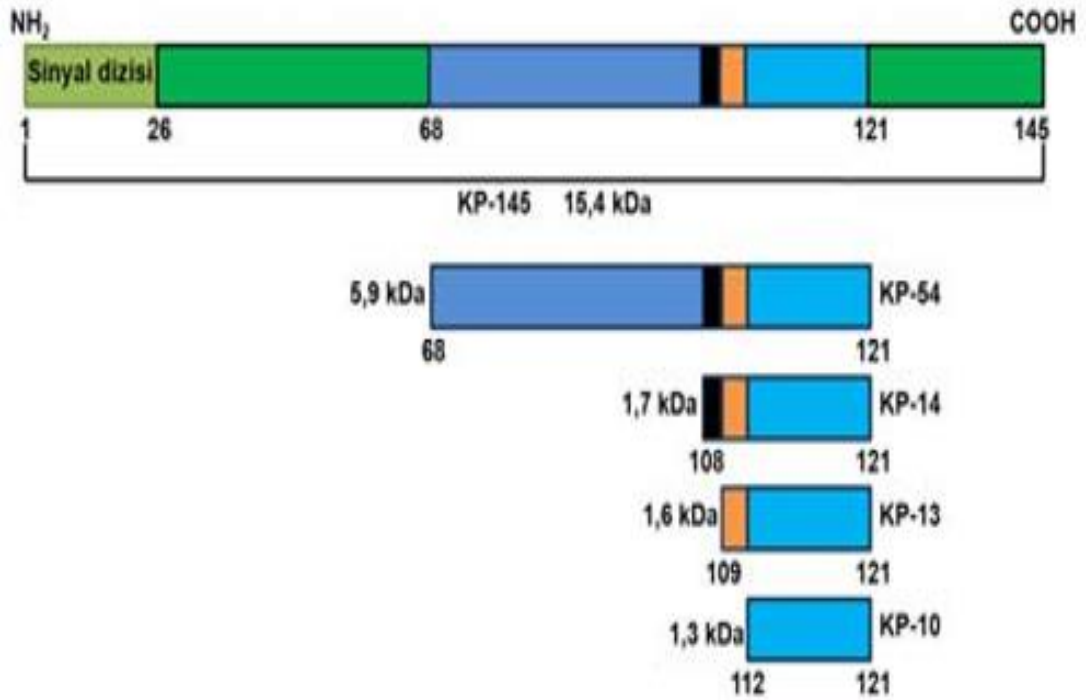
asidi ve orta OHSS'yi azalttığını göstermiştir (Tang ve ark. 2012; Tehraninejad ve ark. 2012). Ek olarak, bir çalışma PKOS'lu kadınların PKOS olmayanlara kıyasla kabergoline daha az duyarlı olduğunu, bu durumun ise büyük olasılıkla dopamin ve dopamin reseptör ekspresyonu üretiminin azalmasına bağlı olduğunu göstermiştir (Gómez ve ark. 2011; Fiedler ve Ezcurra 2012).

Kisspeptin: Kisspeptin, fertilitenin nöroendokrin regülasyonunda önemli rol oynayan, doğal olarak oluşan bir peptid hormonudur. Kisspeptin, hipotalamustaki farklı nöronal bölgelerden salgılanmaktadır ve kisspeptin reseptörü (KISS1R) aracılığıyla doğrudan GnRH nöronları üzerinde etki etmektedir. Kisspeptin salgılayan nöronlar, nörokin-B (uyarıcı) ve B-dinorfin (inhibitör) tarafından düzenlenmektedir ve dolaşımdaki östrojen ve progesteron seviyelerinden etkilenmektedir. İnsanlarda eksojen olarak uygulanan kisspeptin, doza bağlı olarak, hipofizden öncelikle LH ve daha az ölçüde FSH salımını indüklemektedir. Kisspeptinin güvenli olması ve hasta tarafından iyi tolere edilmesi, kisspeptinin YÜT uygulamalarında oosit matürasyonunun uyarılmasında kullanılabileceğini düşündürmüştür. Bu konuda yürütülen ve başarılı sonuçlar elde edilen faz çalışmaları mevcuttur (Jayasena ve ark. 2014; Abbara ve ark. 2015; Thomsen ve Humaidan 2015).

4.7. KISSPEPTİNLER

Kisspeptinler, hipotalamusta yer alan kisspeptin nöronlarındaki *Kiss-1* geni tarafından transkribe edilen öncül bir proteinden (Kisspeptin-145) türeyen, hipotalamohipofizyer gonadal aksı etkileyerek farklı görevleri üstlenen peptidlerdir. Bu öncül protein 145 aminoasit uzunluğunda olup stabil ve aktif değildir. Bu peptid, post-translasyonel mekanizmalar ile ilk olarak 54-aminoasitlik bir peptid olan Kisspeptin-54 (metastin)'e dönüştürülmektedir. Kisspeptin-54 de farklı post-translasyonel mekanizmalar ile biyolojik olarak 3 farklı aktif peptide dönüştürülmektedir. Bu peptidler, sahip oldukları aminoasit sayısına göre adlandırılmaktadır: Kisspeptin-14, Kisspeptin-13 ve Kisspeptin-10. Benzer C-terminal motifine sahip olduklarından, bu peptidlerin tamamı KISS1R olarak adlandırılan reseptöre bağlanabilmektedirler. Yapısal benzerlikleri ve aynı reseptörü

paylaşmalarından dolayı bu peptidler kisspeptin ailesi olarak ifade edilmektedir (Şekil 9) (Kafa ve Eyigör 2011; Tng 2015; Hu ve ark. 2018).



Şekil 9. Kisspeptin tipleri (Kafa ve Eyigör 2011)

Kiss-1 geni, ilk kez 1996 yılında Hershey, Pensilvanya, ABD’de, insan malignan melanoma supresörü olarak keşfedilmiştir. Hershey şehrindeki ünlü çikolata markasından esinlenerek isimlendirmeleri yapılmıştır (Lee 1996). KISS1R reseptörü ise ilk kez 1999 yılında bulunmuştur (Lee ve ark. 1999). GPR54, AXOR12, hOT7T175, CPPB1 ve HH8 gibi farklı isimlerle de anılmaktadır. KISS1R, 7 transmembran bölge içeren G-protein eşlikli reseptördür. Kisspeptinler ve KISS1R, birçok memeli türünde hipotalamus, hipofiz bezi, ovaryum, testis, plasenta, pankreas, böbrek, yağ doku, karaciğer, fallop tüpü, ince bağırsak ve lenf nodlarında ifade edilmektedir (Tng 2015; Hu ve ark. 2018).

Kisspeptin nöronları ve reseptörleri, sinir sisteminin çeşitli bölgelerinde yer almaktadır. Kisspeptin nöronlarının yeri, hayvan türleri arasında farklılık göstermektedir. İnsanlarda, hipotalamus, bazal gangliyonlar ve periventriküler bölgede kisspeptin nöronları tanımlanırken; KISS1R hipotalamus, bazal gangliyonlar,

amigdala, substantia nigra, hipokampus ve omurilikte lokalize olmaktadır. Kemirgenlerde, arkuat çekirdek (ARC) ve anteroventral periventriküler çekirdek (AVPV) dahil olmak üzere hipotalamusun çeşitli kısımlarında kisspeptin nöronları gösterilmiştir. AVPV'deki kisspeptin nöronları, GnRH nöronlarının büyük afferent nöronlarıdır (Tng 2015).

4.7.1. Kisspeptinlerin Ovaryum ile ilişkisi

Kisspeptinlerin ve KISS1R'nin üreme sistemi ile ilişkisi 2003 yılına kadar tam olarak aydınlatılmamıştır. Birbirinden bağımsız iki grup 2003 yılında KISS1R ile ilgili çalışmışlardır. de Roux ve ark hipogonadotropik hipogonadizm teşhisli bireylerde yaptıkları genotip analizinde KISS1R geninde mutasyon olduğunu bildirmişlerdir. Seminara ve ark da fare ve insanda KISS1R geninde mutasyon deneyleri yapmışlardır ve bu gendeki mutasyonun, hipogonadotropik hipogonadizme, pubertede gecikmeye ve seksüel gerilemeye neden olduğunu rapor etmişlerdir (De Roux ve ark. 2003; Seminara ve ark. 2003).

Kisspeptin nöronlarından salgılanan kisspeptin, başka bir hücredeki reseptörüne bağlandığında hücre içinde bir dizi olay tetiklenmektedir. Reseptörün aktive olmasıyla hücre içinde Fosfolipaz C ve PKC aktivasyonu gerçekleşir. Bu proteinlerin aktifleşmesi, ERK sinyal yolağının uyarılması ve hücre içi Ca^{+2} artışına neden olmaktadır. Nöron içinde aktifleşen bu olaylar zinciri nöronun depolarizasyonu ile sonuçlanmaktadır (Hu ve ark. 2018). Yapılan çalışmalarda, KISS1R'nin GnRH nöronlarında yer aldığı ortaya konulmuştur. GnRH nöronlarındaki reseptör aktivasyonu ile tetiklenen bir dizi olay, bu nöronlardan LH ve daha az oranda FSH salgılanmasını uyarmaktadır (Kafa ve Eyigör 2011). Kisspeptin tipleri arasında en fazla uzunluğa sahip olan Kisspeptin-54 enjeksiyonunun, erkeklerde plazmadaki LH düzeyini iki kat, FSH düzeyini 0,18 kat ve testosteron düzeyini 0,13 kat arttırdığı; kadınlarda ise LH ve FSH düzeylerini arttırdığı ve LH artışının FSH'ın 7 katı olduğu bildirilmiştir (Jayasena ve ark. 2009).

Günümüze dek yapılan çalışmalarla kisspeptinin, foliküler gelişim, oosit matürasyonu, ovulasyon ve steroidogenez mekanizmaları üzerinde güçlü etkileri olduğu bulunmuştur. Fernandois ve ark tarafından sıçanlara 28 gün boyunca kisspeptin veya kisspeptin antagonisti verilmiş ve foliküler gelişim değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, düşük doz kisspeptin verilen sıçan ovaryumlarında daha az sekonder

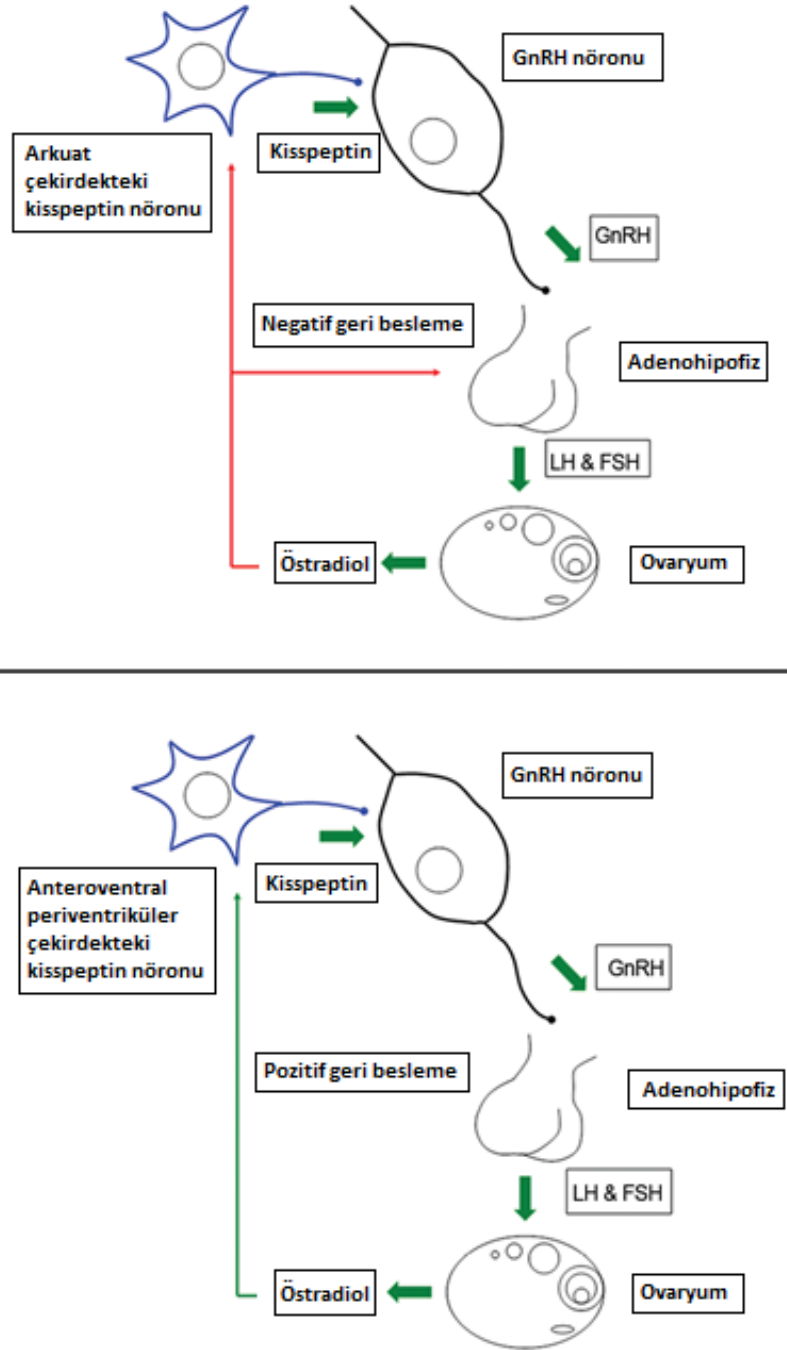
folikül ancak daha fazla graaf folikülü ve korpus luteum görülmüştür. Kisspeptin antagonisti verilen sıçan ovaryumlarında ise daha fazla sekonder folikül ancak daha az graaf folikülü ve korpus luteum tespit edilmiştir. Aynı çalışma, kisspeptinin FSH reseptör sayısını azaltarak primordiyal folikül aktivasyonunu azalttığını ve AMH seviyesini artırarak graaf folikül gelişimini arttırdığını da göstermiştir (Fernandois ve ark. 2016). Kemirgenlerde yapılan *Kiss1* ve *Kiss1r* gen susturma çalışmalarında, ovaryum ağırlıklarının ve boyutunun azaldığı bildirilmiştir. *Kiss1r* geni heterozigot fare modelinde ise reseptör ifadesinin, primer ve sekonder folikül sayısının azaldığı, kistik folikül sayısının arttığı ve bunlara bağlı olarak POF geliştiği ifade edilmiştir (Hu ve ark. 2018).

Kisspeptinin ovulasyona etkilerini araştıran bir çalışmada, erken foliküler fazda, östrojenin arkuat çekirdekteki kisspeptin ifadesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Ancak ovulasyondan önce, yine östrojenin anteroventral periventriküler çekirdekteki kisspeptin ifadesini stimüle ettiği ve kisspeptin-GnRH bağlantısı ile LH yükselişinin sağlandığı belirtilmiştir (Şekil 10) (Dungan ve ark. 2006). Tüm bu sonuçlar, kisspeptinin ve reseptörlerinin, ovaryan rezervi koruduğu, daha fazla sayıda graaf folikülü gelişimini uyardığı dolayısıyla folikülogenezde pozitif etki gösterdiği düşünülebilmektedir (Hu ve ark. 2018).

Kisspeptinin oosit matürasyonuna etkisini değerlendiren ilk klinik deneme 2014 yılında yapılmıştır. IVF protokolüne ek olarak oosit toplama işleminden 36 saat önce 53 hastaya farklı dozlarda Kisspeptin-54 enjekte edilmiştir. Çalışma sonucunda hastaların % 96'sından en az bir adet olgun oosit ve % 92'sinden transfere uygun embriyo elde edilmiştir. Olgun oosit sayısı dozlar arttıkça artmış ancak oositlerin matürasyon oranı benzer bulunmuştur (Jayasena ve ark. 2014).

Klinik denemelerden önce kisspeptinler ile ilişkili hayvan çalışmaları yapılmıştır. Koyunlardaki ve kemirgenlerdeki analizler, ovulasyon için kisspeptin sinyalinin gerekli olduğunu ve Kisspeptin-54 uygulamasının ovulasyonu indükleyebileceğini belirlemiştir. Kinoshita ve ark kisspeptin-nötralize edici monoklonal antikoru dişi sıçanların preoptik bölgesine doğrudan enjekte etmiştir ve ovulasyonun durduğunu tespit etmişlerdir. Matsui ve ark prepubertal sıçanlarda bir IVF protokolü uygulamışlar ve subkutan Kisspeptin-54 enjeksiyonunun hCG ile aynı ölçüde ovulasyonu uyardığını göstermiştir (Abbara ve ark. 2018).

Kisspeptinler ile ilgili yapılan çalışmalar, puberteye geçiş, foliküler gelişim, ovulasyon ve steroidogenez süreçleri için kisspeptin-GnRH sinyalizasyonunun gerekli olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 10. Kisspeptin nöronlarının östrojen ile düzenlenmesi. Kp: Kisspeptin ARC: Arkuat çekirdek AVPV: Anteroventral periventriküler çekirdek (Tng 2015).

4.7.2. Kisspeptin ve OHSS

Kisspeptin ile ilgili analizler, kisspeptin uygulamasının güvenli olduğunu ve hastalar tarafından iyi tolere edildiğini göstermektedir. IVF uygulamalarında karşılaşılan en büyük sorunlardan biri OHSS'dir. Oosit matürasyonu ve ovulasyon için kullanılan hCG OHSS'nin en büyük nedenidir. Bu yüzden son çalışmalar hCG'nin yerine veya düşük doz hCG ile kullanılabilir ya da OHSS riski taşıyan kadınlarda bu riski en aza indirebilecek yeni alternatifler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla GnRH agonistleri ve antagonistleri çalışılmaktadır. Bu iki yöntemle birlikte kisspeptinler de çalışılan diğer peptidlerdir.

OHSS riski yüksek kadınlarda kisspeptin ile ilgili ilk çalışma 2015 yılında yapılmıştır. Antral folikül sayısı 23'ten fazla ve AMH seviyesi 40 pmol/l olan yüksek riskli kadınlara 3,2 ile 12,8 nmol/kg dozda Kisspeptin-54 enjekte edilmiştir. Sonuçta, olgun oosit verimi doz bağımlı olarak % 121'e kadar artmıştır. Ayrıca 3 kadın (% 5) hafif OHSS teşhisi alırken hiçbir kadının orta veya şiddetli OHSS göstermediği belirlenmiştir (Abbara ve ark. 2015).

Başka bir çalışmada hastalara 2 doz Kisspeptin-54 verilmesinin LH artış süresini uzatıp uzatmayacağı test edilmiştir. Bu amaçla OHSS riski yüksek kadınlardan oluşan 2 gruba oosit toplanmasından 36 saat önce tek doz Kisspeptin-54 verilmiştir. Bu uygulamadan 10 saat sonra ise bir gruba salin verilirken diğer gruba ikinci doz Kisspeptin-54 enjeksiyonu yapılmıştır. Sonuçta, oosit verimi, tek doz Kisspeptin-54 enjekte edilen grupta % 45'ten % 60'a; 2 doz Kisspeptin-54 verilen grupta ise % 45'ten % 70'e çıkmıştır. Ayrıca anormal ovaryan yanıt olmadan 4'ten fazla oosit eldesi de sağlanmıştır (Abbara ve ark. 2017).

Dişi üreme sistemindeki pozitif etkileri ve IVF tedavisinin kritik sonucu olan OHSS riskini azaltması sayesinde Kisspeptinler, ilgi çekici peptidler olmaya devam edecektir. Kisspeptin-54'ün, kemirgenlerdeki en güçlü kisspeptin türü olabileceği bildirilmiştir (Kafa ve Eyigör 2011) ve bu nedenle bu çalışmada da Kisspeptin-54 seçilmiştir.

Çalışmada, Kisspeptin-54'ün OHSS tedavisinde kullanımının, ovaryum morfolojisi, oosit matürasyonu, VEGF, PEDF, PKA ve PKC seviyeleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulu'nun 25/04/2017 tarih ve 77.637.435 numaralı onayı ile yapıldı.

Bu çalışma TÜBİTAK 1002- Hızlı Destek Programı tarafından 218S918 no'lu proje ile desteklendi.

5.1. DENEYSEL OHSS MODELİ OLUŞTURULMASI

Çalışmada Kobay deney hayvanları laboratuvarından temin edilen 25 günlük 30 adet immatür dişi Sprague-dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, sıcaklık ve nem kontrollü ortamda 12 saat aydınlık (08:00-20:00) ve 12 saat karanlık döngüsüne uyularak bakıldı. Çalışma boyunca sıçanların su ve besin alımında bir kısıtlama yapılmadı. Ortam sıcaklığı 24 ± 1 °C olacak şekilde ayarlandı.

Deneysel OHSS modeli, 25 günlük 18 adet immatür dişi Sprague-dawley cinsi sıçanda oluşturuldu. Modeli oluşturmak için postnatal 25. günden itibaren ardışık 4 gün boyunca 0,1 ml 50 IU Gebe Kısarak Serum Gonadotropin (PMSG) (HOR-272, ProSpec) ve 29. gün 0,1 ml 25 IU İnsan Koryonik Gonadotropin (hCG) (HOR-250) intraperitoneal (i.p.) enjekte edildi (Kitajima ve ark. 2004).

5.2. ÇALIŞMA GRUPLARI

Grup I (n=6): Bu gruptaki deneklere postnatal 25. günden itibaren ardışık 5 gün boyunca 0,1 ml % 0,9'luk sodyum klorür (NaCl) i.p. enjekte edildi. Sham grubu olarak belirlendi.

Grup II (n=6): Bu gruptaki deneklere postnatal 27. günde 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 10 IU PMSG ve 29. gün 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 10 IU hCG i.p. enjekte edildi. Bu gruptaki hayvanların ovaryan stimülasyonu sağlanarak matüre edilmiş sıçan grubu oluşturuldu. Kontrol grubu olarak belirlendi.

Grup III (n=6): Bu gruptaki deneklere postnatal 25. günden itibaren ardışık 4 gün boyunca 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 50 IU PMSG ve postnatal 29. gün 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 25 IU hCG i.p. olarak enjekte edildi. OHSS grubu olarak belirlendi (OHSS grubu).

Grup IV (n=6): Bu gruptaki deneklere postnatal 25. günden itibaren ardışık 4 gün boyunca 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 50 IU PMSG ve postnatal 29. gün 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 25 IU hCG i.p. olarak enjekte edildi. Aynı gruba postnatal 29. ve 30. günlerde, günde 2 kere (saat 08:00 ve 17:00) olacak şekilde 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 100 µg/kg kisspeptin-54 (24477, Cayman Chemical) i.p. olarak enjekte edildi. Kısa süreli kisspeptin-54 uygulanmış OHSS grubu olarak belirlendi (KK grubu).

Grup V (n=6): Bu gruptaki deneklere postnatal 25. günden itibaren ardışık 4 gün boyunca 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 50 IU PMSG ve postnatal 29. gün 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 25 IU hCG i.p. olarak enjekte edildi. Aynı gruba postnatal 25. günden itibaren ardışık 6 gün boyunca, günde 2 kere (saat 08:00 ve 17:00) olacak şekilde 0,1 ml % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanan 100 µg/kg kisspeptin-54 i.p. olarak enjekte edildi. Uzun süreli kisspeptin-54 uygulanmış OHSS grubu olarak belirlendi (UK grubu).

Tüm gruplardaki denekler, deney protokolüne başlanmadan önce ve sakrifikasyondan önce tartıldı. Belirtilen uygulamaların ardından postnatal 31. günde anestezi madde [10 mg/kg ksilazin (Bioveta) ve 60 mg/kg ketamin hidroklorid (Richter Pharma)] verilerek uyutuldu. İntrakardiyak olarak 5 ml kan alındıktan sonra sıçanlar dekapite edilerek ovaryumları çıkarıldı. Çıkarılan ovaryumların ağırlıkları kaydedildi. Deney grupları ve deney protokolü Tablo 3'te toplu olarak verildi.

Tablo 3: Deney grupları ve deney protokolü

Grup		1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün
I (N=6)	Sham	0,1 ml % 0,9 NaCl	0,1 ml % 0,9 NaCl	0,1 ml % 0,9 NaCl	0,1 ml % 0,9 NaCl	0,1 ml % 0,9 NaCl	
II (N=6)	Kontrol			10IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl		10IU/0,1 ml hCG/ % 0,9 NaCl	
III (N=6)	OHSS Modeli	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	25IU/0,1 ml hCG/ % 0,9 NaCl	
IV (N=6)	Kısa süreli Kisspeptin uygulanmış OHSS modeli	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl	25IU/0,1 ml hCG/ % 0,9 NaCl+100 µg/kg kisspeptin- 54 (Günde 2 kez)	100 µg/kg kisspeptin -54 (Günde 2 kez)
V (N=6)	Uzun süreli Kisspeptin uygulanmış OHSS modeli	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl+100 µg/kg kisspeptin -54 (Günde 2 kez)	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl+100 µg/kg kisspeptin -54 (Günde 2 kez)	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl+100 µg/kg kisspeptin- 54 (Günde 2 kez)	50IU/0,1 ml PMSG/ % 0,9 NaCl+100 µg/kg kisspeptin -54 (Günde 2 kez)	25IU/0,1 ml hCG/ % 0,9 NaCl+100 µg/kg kisspeptin- 54 (Günde 2 kez)	100 µg/kg kisspeptin -54 (Günde 2 kez)

5.3. KAN ÖRNEKLERİNİN ELISA İLE ANALİZİ

5.3.1. Serumların Eldesi

Sıçan FSH ve LH spesifik Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi için tüm deneklerden intrakardiyak olarak alınan kan, 20 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından 3000 rpm’de 20 dakika santrifüj sonrası serum elde edildi. Bu serumlar yeni ependorf tüplere alınarak analizler yapılana kadar -80°C’de muhafaza edildi.

5.3.2. ELISA ile FSH Analizi

- FSH analizi için sıçan FSH spesifik kit (EA0015Ra, BT-Laboratory, Çin) kullanıldı. Buna göre; 96 kuyucuklu mikrolakanın 1 kuyucuğu kör olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı.
- Daha sonra 7 kuyucuğa 50 µl, kitin kullanma klavuzunda belirtilen 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4 ve 0 mIU/ml konsantrasyonlarında standart solüsyonlar eklendi. Kalan kuyucuklar serum örnekleri için kullanıldı.
- Her kuyucuğa (kör ve standartlar hariç) tüm deney gruplarındaki her bir deneğe ait 50'şer µl serum eklendi. İyice karıştırıldı.
- Tüm kuyucuklara (kör hariç) 50'şer µl biotinli antijen eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklar 300 µl yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.
- Sonrasında her kuyucuğa 50'şer µl Avidin-HRP konjugatı eklenerek 30 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklar 300 µl yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.
- Substrat solüsyon A'dan 50'şer µl ve substrat solüsyon B'den 50'şer µl eklenerek karanlıkta 10 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50'şer µl stop solüsyonu eklenerek mikrolaka okuyucuda 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçüldü.

5.3.3. ELISA ile LH Analizi

- LH analizi için sıçan LH spesifik kit (EA0013Ra, BT-Laboratory, Çin) kullanıldı. Buna göre; 96 kuyucuklu mikrolakanın 1 kuyucuğu kör olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı.
- Daha sonra 7 kuyucuğa 50 µl kitin kullanma klavuzunda belirtilen 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 ve 0 mIU/ml konsantrasyonlarında standart solüsyonlar eklendi. Kalan kuyucuklar serum örnekleri için kullanıldı.
- Her kuyucuğa (kör ve standartlar hariç) tüm deney gruplarındaki her bir deneğe ait 50'şer µl serum eklendi. İyice karıştırıldı.
- Tüm kuyucuklara (kör hariç) 50'şer µl biotinli antijen eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklar 300 µl yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.

- Daha sonra her kuyucuğa 50'şer µl Avidin-HRP konjugatı eklenerek 30 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklar 300 µl yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.
- Substrat solüsyon A'dan 50'şer µl ve substrat solüsyon B'den 50'şer µl eklenerek karanlıkta 10 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50'şer µl stop solüsyonu eklenerek mikropłaka okuyucuda 450 nm dalgaboyunda absorbans deęerleri ölçüldü.

5.4. SOL OVARYUM DOKULARININ HİSTOLOJİK ANALİZİ

5.4.1. Sol Ovaryum Dokularının Alınması ve Parafin Doku Takibi

Dekapite edilen sıçanların sol ovaryum dokuları morfolojik analiz için % 10'luk formalin (TK.060160.05001, Tekkim) içerisine alınarak fikse edildi ve 48 saat sonunda fiksatifin uzaklaştırılması için, ovaryumlar 1 gece akar çeşme suyu altında yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için artan konsantrasyonlardaki alkol (920.026.2500, İsolab) serilerinden geçirildi. Ksilen (16446, Sigma-Aldrich) ile şeffaflştırma yapılarak parafine gömüldü. Ayrıntılı parafin doku takibi protokolü Tablo 4'te verildi.

5.4.2. Sol Ovaryum Dokularından Kesitlerin Alınması

Parafin bloklardan mikrotom (RM2245, Leica) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen-Eozin boyama yapılacak kesitler rodajlı lam üzerine; immünohistokimyasal boyama yapılacak kesitler ise lizinli lam üzerine alındı.

Tablo 4. Parafin doku takibi protokolü

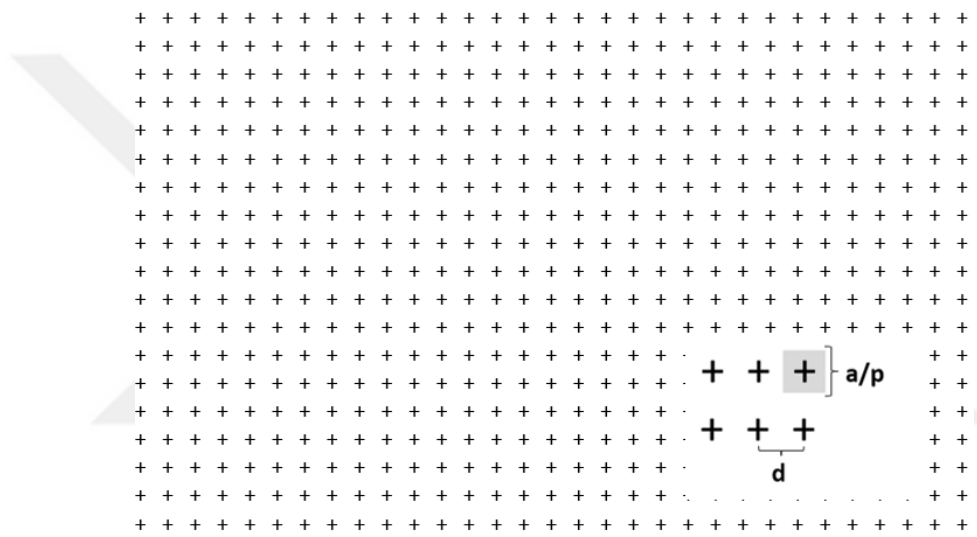
Kullanılan kimyasal madde	Süre (saat)
% 10'luk formalin	48
% 60 alkol	1
% 70 alkol	1
% 80 alkol	1
% 90 alkol	1
% 100 alkol	1
% 100 alkol	1
Ksilen-alkol (1:1)	1/2
Ksilen	1
Ksilen	1
Ksilen-Parafin (1:1)	1/2
Parafin	1
Parafin	1
Parafine gömme	

5.4.3. Sol Ovaryum Dokularının Morfolojik Analizi için

Parafin bloklardan alınan kesitler parafinin uzaklaştırılması amacıyla 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Etüvden çıkarılan kesitler 60 dakika ksilende bekletildikten sonra rehidratasyon için sırasıyla % 96, % 80, % 70 ve % 60'luk alkol serilerinde ikişer dakika tutuldu. Kesitler 5 dakika akar çeşme suyunda bekletildikten sonra çekirdek boyaması için 5 dakika Harris hematoksilene (1043020025, Merckmillipore) konuldu. Tekrar 5 dakika akar çeşme suyunda bekletilen kesitler asit-alkole batırılıp çıkarıldı ve 5 dakika akar çeşme suyunda bekletildikten sonra sitoplazmik ve hücre dışı alanların boyanması için 4 dakika eozinde (1159350025, Merckmillipore) tutuldu. Fazla boya akar çeşme suyu altında uzaklaştırıldıktan sonra kesitler, dehidratasyon için sırasıyla % 80 ve % 96'luk alkollerde birer dakika bekletildi. Ardından ksilen içerisinde 60 dakika tutulan kesitler entellan (1079610500, Merckmillipore) ile kapatıldı ve kamera entegreli ışık mikroskobu (Olympus DP26-CU; Leica Dm750) ile fotoğraflandı.

5.4.4. Sol Ovaryum Dokularının Hacminin Hesaplanması

Ovaryum dokusunun toplam hacminin hesaplanmasında Cavalieri prensibi kullanıldı (Howard ve Reed 1998). Bu prensibe göre, tüm deneklerden alınan ovaryum dokuları parafin bloklarından doku gelmeye başladığı andan itibaren tüm kesitler atlanmadan alındı. Daha sonra aralıklar sabit olacak şekilde her bir ovaryumdan toplam 10 kesit alınarak Hematoksilen-Eozin boyaması yapıldıktan sonra alan hesabı yapılmak üzere kullanıldı. Ovaryum alanı hesaplaması için aşağıdaki noktasal aralıkları 3 mm olan Şekil 11'deki Cavalieri şablonu kullanıldı.



Şekil 11. Ovaryan alan hesabı için kullanılan şablon (Örnek gösterimdir)

Cavalieri yöntemine göre, alan ölçümü için $A = \Sigma p \times a/p$ formülü; hacim hesabı için ise $V = A \times T = \Sigma p \times a/p \times T$ formülü kullanılmaktadır.

Bu formülde; A, kesit alanını; Σp , kullanılan Cavalieri şablonunda dokuya temas eden toplam nokta sayısını; a/p, kullanılan Cavalieri şablonundaki 1 noktanın kesit üzerinde kapladığı alanı; V, hesaplanan doku hacmini; T, alınan kesitin kalınlığını (ince kesitler kullanılacak ise iki kesit arasındaki kesit aralığını) ifade etmektedir. Bu formüller **doğrudan ardışık kesitler** üzerinden yapılan toplam hacim hesabına uygundur.

Bu çalışmada, **kesitsel görüntüler** üzerinden hacim hesabı yapıldı ve bu yöntem için modifiye edilmiş aşağıdaki formül kullanıldı (Adam ve ark. 2010).

$$V = T \times [(SU \times d) / SL]^2 \times \Sigma p$$

Formüldeki **SU**, görüntü büyütmesini gösteren skalanın temsil ettiği uzunluğu; **d**, noktalı alan ölçüm cetvelindeki iki nokta arasındaki mesafeyi; **SL**, görüntüdeki skalanın cetvel ile ölçülen gerçek uzunluğunu; **ΣP**, ölçümü yapılan dokunun kesit yüzey alanları üzerine düşen toplam nokta sayısını ifade etmektedir. Formül kullanılırken, formüle girilecek uzunlukların aynı birimden olmasına dikkat edildi.

5.4.5. Sol Ovaryum Dokularının Folikül Sayılarının Hesaplanması

Foliküllerin morfolojik olarak sınıflandırılması Ross'a göre yapıldı (Ross ve Pawlina 2016). Bu sınıflamaya göre, oosit etrafında tek tabaka yassı hücrelerin görüldüğü foliküller **primordiyal folikül**; oosit etrafında tek tabaka kübik hücrelerin görüldüğü foliküller **erken primer folikül**; oosit etrafında birden fazla kübik hücre tabakasının (artık granüloza hücreleri adını alır) görüldüğü foliküller **geç primer folikül**; granüloza hücreleri arasında bir veya daha fazla boşluk veya tek bir büyük antral boşluk içeren foliküller **sekonder folikül**; oosit etrafında kumulus ooforus un görüldüğü ve tek bir büyük boşluk içeren folikül **graaf folikülü** olarak tanımlandı. Ayrıca, antral boşlukta kan pıhtısı içeren foliküller **korpus hemorojikum**; antral boşlukta bağ doku hücrelerinin bulunduğu ve şişkin granüloza lutein hücrelerinin görüldüğü foliküller **korpus luteum**; folikül içerisinde boşluğun olmadığı, piknotik çekirdeklere sahip hücrelerin görüldüğü veya deforme olmuş zona pellusida kalıntılarının bulunduğu foliküller **atretik folikül** olarak tanımlandı. Bunlara ek olarak, oosit içermeyen, büyük bir antral boşluğa sahip ve genellikle 1-2 sıralı granüloza hücre tabakasının bulunduğu foliküller **kistik folikül** olarak tanımlandı (Cruz ve ark. 2012).

Ovaryum dokularının alan hesabında kullanılan ve kesit aralıkları Tablo 3'te verilen, her grup için 10'ar adet kesit folikül sayımı için kullanıldı (Sun ve ark. 2017).

5.4.6. Sol Ovaryum Dokularının İmmünohistokimyasal Boyaması

Kesit alma işleminden sonra lam üzerindeki dokular 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Etüvden sonra preparatlar 60 dakika ksilende bekletildi. Daha sonra sırasıyla % 95, % 80, % 70 ve % 60'luk alkollerde ikişer dakika tutuldu ve ardından 10 dakika distile suya alındı. Sonrasında 3 defa 5'er dakika Fosfat tampon solüsyonu (PBS, 003002, İnvitrogen) ile yıkandı. Doku geçirgenliğini sağlamak için 37°C'de 10 dakika Tripsin (TA-125-TR, Thermo scientific) ile muamele edildi. Kesitler 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için kesitler 5 dakika % 3'lük H₂O₂'de (K31355100303, Merckmillipore) oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Ticari olarak satın alınan kitte hazır olarak gelen bloklama solüsyonunda (TA-060-UB, Thermo scientific) kesitler 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ardından anti-VEGF (sc-7269, Santa cruz), anti-PEDF (MAB1059, Chemicon), anti-PKA (sc-28316, Santa cruz) anti-PKC (sc-8393, Santa cruz) birincil antikorlar eklenerek 1 gece +4°C'de bekletildi. Daha sonra kesitler 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Ticari kit ile gelen biotinli sekonder antikor (TP-060-BN, Thermo scientific) ile tüm kesitler 30 dakika oda sıcaklığında muamele edildi ve ardından tekrar 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Yine ticari kit ile gelen Streptavidin peroksidaz (TS-060-HR, Thermo scientific) ile 30 dakika oda sıcaklığında muamele edilen tüm kesitler inkübasyon sonrası 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. İmmünoaktivitenin görünürlüğünü sağlamak için Diaminobenzidin (DAB, TA-125-HD, Thermo scientific) ile 1-10 dk boyama işlemi yapıldı. Kesitler 5 dakika PBS ve 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra artalan boyaması olarak Mayer's Hematoksilen (05-M06002, Bio-Optica) ile 5 dakika boyandı. Kesitler 3 defa 5'er dakika distile suda yıkanarak % 80'lik alkolde 2 dakika, % 90'luk alkolde 2 dakika bekletildikten sonra 1 saat ksilende tutuldu ve son olarak entellan (1079610500, Merckmillipore) ile kapatıldı. Kamera entegreli ışık mikroskobu (Olympus DP26-CU; Leica MD750) ile fotoğraflandı.

İmmünohistokimya boyamalarındaki yoğunluklar H-skor analiz yöntemi ile değerlendirildi. Bu yöntemde her grup için rastgele 10 farklı bölge seçilerek (granüloza hücrelerinin olduğu bölgeler), boyanma dereceleri negatif (0), zayıf (1), orta (2) ve kuvvetli (3) pozitif olmak üzere iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirildi. Değerlendirmeye katılan iki histolog çalışma hakkında herhangi bir bilgiye sahip değildi. İmmünoaktivite derecesi % hücre olarak değerlendirildi ve

$\Sigma(1+d)^{hy}$ formülü (d: boyanma derecesi, hy: o dereceye sahip hücre yüzdesi) kullanılarak H-skor hesaplandı (Yılmaz ve ark. 2018).

5.5 SAĞ OVARYUM DOKULARINDAN ALINAN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDEN KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR) ANALİZİ

5.5.1 Granüloza Hücrelerinin Eldesi

Sıçanlar dekapite edildikten sonra sağ ovaryum dokuları M2 kültür vasatına (M7162, Sigma-Aldrich) alındı. Stereomikroskop (Olympus, SZX07) altında, etraflarındaki dokular uzaklaştırıldı. Oositler, 26,5 gauge iğneler kullanılarak, punch yöntemi ile ovaryumdan çıkartıldı. Oositlerin etrafındaki granüloza hücreleri qRT-PCR için ependorf tüplere toplandı. Granüloza hücreleri 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve steril PBS eklenerek tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpün dibinde kalan granüloza hücreleri, VEGF, PEDF, PKA ve PKC genlerinin doz ve zaman bağımlı ifadelerini incelemek amacıyla qRT-PCR yönteminde kullanılına dek -80°C'de muhafaza edildi.

5.5.2 Granüloza Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Tüm gruplardan ayrı ayrı elde edilmiş granüloza hücrelerinden RNA izolasyonu, The PureLink® RNA Mini Kit (12183018A, İnvitrogen) kullanılarak kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Buna göre:

1. Granüloza hücreleri üzerine 300 µl % 1 2-merkaptoetanol içeren Lizis tamponu eklendi ve vortekslendi.
2. Bu karışım üzerine 300 µl % 70'lik etanol eklendi ve vortekslendi.
3. Hazırlanan karışım toplama tüpüne konulan spin kolon üzerine aktarıldı ve 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Tüpte kalan kısım uzaklaştırıldı.
4. Spin kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu I eklendi ve 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Tüpte kalan kısım uzaklaştırıldı.

5. Spin kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu II eklendi ve 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Tüpte kalan kısım uzaklaştırıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
6. Spin kolon boş şekilde 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
7. Spin kolon kit ile gelen yeni bir tüpe alındı. Üzerine 60 µl RNaz-free su eklenerek 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. RNA'nın tüpün dibine inmesi sağlandı.
8. İzole edilen RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri spektrofotometrik olarak Maestro Gen cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

5.5.3 Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA)'nın Sentezi

Elde edilen RNA'ların hemen The High Capacity RNA-to-cDNA™ (4368814, Invitrogen) kiti kullanılarak cDNA çevirimleri gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre; 2 µl 10X RT tamponu, 2 µl 10X Random primer, 0,8 µl 25X dNTP, 1 µl Multiscribe enzim, 4,2 µl ultra saf su ve 10 µl total RNA kullanılarak 20 µL hacimde reaksiyon kuruldu (Tablo 5). Her reaksiyon başına 1 µg total RNA eklenerek 25°C de 10 dakika, 37 °C de 120 dakika, 85°C de 5 dakika bekletildi ve tüm RNA örneklerinden cDNA çevirimleri yapıldı (Tablo 6).

Tablo 5. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Kullanılan madde	Miktar (µl)
10X RT buffer	2
10X Random primer	2
25X dNTP	0,8
Multiscribe enzim	1
Ultra saf su	4,2
Total RNA	10

Tablo 6. cDNA sentez basamakları

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (dakika)	10	120	5	∞

5.5.4 qRT-PCR Analizi

Elde edilen cDNA'lar PCR reaksiyonlarında eşit konsantrasyonlarda (10 ng) kalıp olarak kullanılarak total hacim 20 µl olacak şekilde Power SYBR™ Green PCR Master Mix (4367659, Thermo scientific), 500 nM'lik forward ve reverse primer karışımı (Tablo 7) ve ultra saf su eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 8).

Tablo 7. qRT-PCR için kullanılan primerler

Gen	Forward primer dizi (5'-3')	Reverse primer dizi (5'-3')	Referans
VEGF	CAGCGACAAGGCAGACTATT	TTGGCACGATTTAAGAGGG	(Yuan ve ark. 2011)
PEDF	CTGTGAGAGTCCCCATGATGT	AGGGGCAGGAAGAAGATGATA	(Zhu ve ark. 2012)
PKA	CAGCCCAGTTGGATCATTTT	GCTTCAGCTTCACCACCTTC	(Wang ve ark. 2014)
PKC	GGAACTCAGGCAGAAGTTCG	CAGTTCCTCTGTTCCTTCC	(Kameyama ve ark. 2008)
GAPDH	GATGGGTGTGAACCACGAGAAAT	ACGGATACATTGGGGGTAGGAA	(Cai ve ark. 2018)

Tablo 8. qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

Kullanılan madde	Miktar (µl)
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	10
Forward-reverse primer	1,5
cDNA	2
Ultra saf su	6,5

Her bir gen için hazırlanan karışımlar MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (4346906, Applied Biosystems) üzerindeki kuyucuklara konularak amplifikasyon işlemi yapıldı (Tablo 9). Amplifikasyonun sonunda gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin miktarını (kat cinsinden) belirlemek

amacıyla GAPDH referans geni kullanılarak relatif kantitasyon analizleri StepOnePlus qPCR (4376600, Applied Biosystems) cihazı ile gerçekleştirildi.

Tablo 9. qPCR amplifikasyon basamakları

Basamak	AmpliTaq Gold DNA Polimeraz aktivasyonu	PCR	
	İlk denatürasyon	Döngü (40)	
		Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
Sıcaklık (°C)	95	95	60
Zaman	10 dakika	15 saniye	1 dakika

5.6. SAĞ OVARYUM DOKULARINDAN ALINAN OOSİTLERİN İMMÜNOFLORESAN ANALİZİ

Sağ ovaryum dokularından izole edilen oositler % 4'lük paraformaldehit (Merck, TP704404) ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Sonrasında 3 kez 15'er dakika % 1 sığır albümini (BSA, A7906, Sigma-Aldrich) içeren PBS ile yıkandı. Zona pellusidanın ayrılması için asit tyroid solüsyonunda [140 mM NaCl (Merck, 106404), 3 mM CaCl₂.2H₂O (C3881, Sigma-Aldrich), 5 mM MgCl₂.6H₂O (63063, Sigma-Aldrich), % 0,1 (w/v) glukoz (G8270, Sigma-Aldrich) ve % 0,4 (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP-360, Sigma-Aldrich) distile su içerisinde hazırlandı] 60 dakika bekletildi. Stereomikroskop (SZX07, Olympus, Japonya) altında zona pellusidanın ayrılmasını takiben % 0,1 Triton-X-100 (1.08603.100, Atom scientific) içeren PBS içerisinde 15 dakika tutuldu. Ardından BSA içeren PBS ile 15 dakika yıkandı. Oositler, normal koyun serumunda (sc-2488, Santa cruz) 1 gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün yıkama yapılmadan α -tubulin primer antikoru (sc-5286, Santa cruz) eklenerek 36 saat +4°C'de bekletildi. Süre bitiminde BSA içeren PBS ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı ve 1/500 oranında hazırlanan goat anti-mouse FITC (AP308F, Millipore) sekonder antikoru eklenerek karanlık ortamda 1 gece +4°C'de bekletildi. Ardından çekirdek boyaması için 1/10 oranında hazırlanan DAPI (4083S, Cell

signaling technology) içeren kapatma medyumuna (TA-060-UG, Thermo scientific) alındı. Boyamalar, floresan ataçmanlı inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japonya) altında incelenerek fotoğraflandı.

5.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

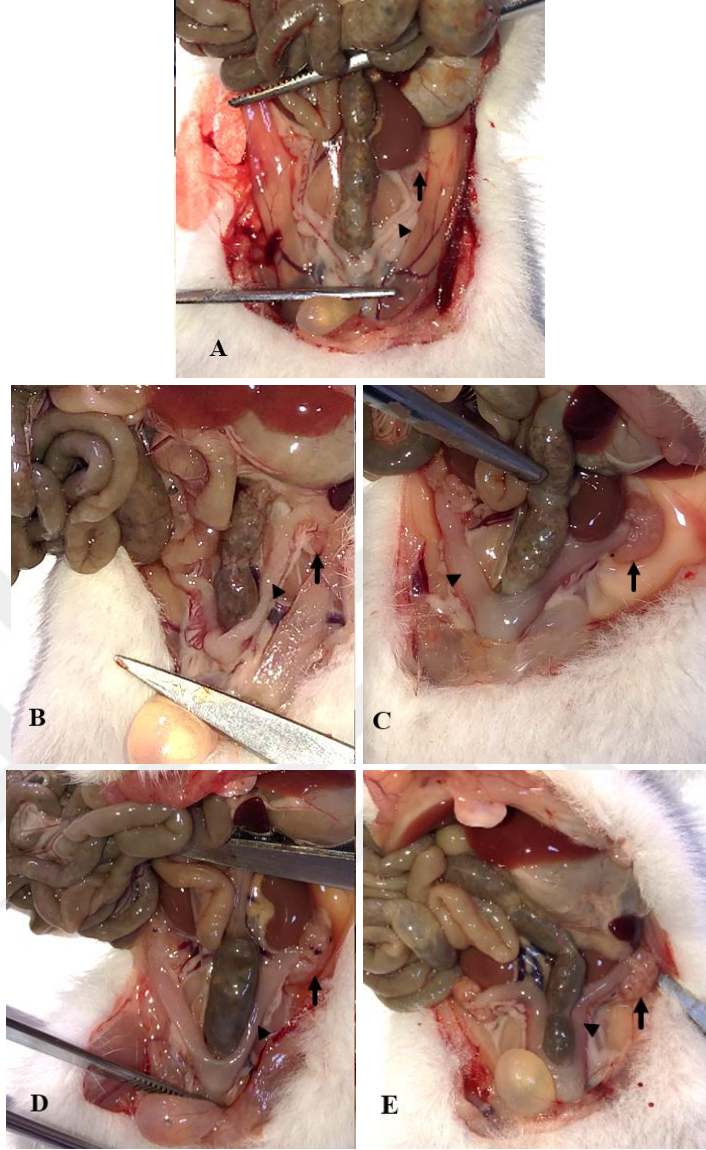
Verilerin değerlendirilmesinde Graphpad Prism 7 programı kullanıldı. İlk olarak değerlerin normal dağılıp dağılmadığının belirlenmesi için Shapiro-Wilk normallik testi yapıldı. Verilerin dağılımı normal ise parametrik test olan tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi kullanıldı. Verilerin dağılımı normal değil ise nonparametrik test olan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel analizler % 95 güven aralığı kullanılarak hesaplandı ve $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel olarak anlamlı farkın gözlemlendiği verilerde, bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığının gösterilmesi için post-hoc testleri kullanıldı.

qRT-PCR işleminin sonunda gen ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerin analizi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi (Livak ve Schmittgen 2001).

6. BULGULAR

6.1. DENEYSEL GRUPLARIN OLUŞTURULMASI

DeneySEL protokol sonunda dekapite edilen sıçanların fallop tüpleri ve ovaryum büyüklükleri fotoğraflandı. Sham grubuna ait sıçanların fallop tüplerinin ince ve ovaryumlarının normal büyüklükte olduğu görüldü (Resim 1A). Stimüle edilmiş kontrol grubuna ait sıçanlarda fallop tüplerinin, sham grubuna göre daha kalın olduğu ve ovaryumların daha büyük olduğu gözlendi (Resim 1B). Hiperstimülasyon protokolü ile deney modeli oluşturulan OHSS grubunda fallop tüplerinin oldukça genişlediği ve ovaryumların normalden çok daha büyük olduğu saptandı (Resim 1C). OHSS protokolü ile birlikte kısa süreli Kisspeptin-54 uygulanan KK grubunda fallop tüplerinin sham ve kontrol grubunun fallop tüplerine göre daha kalın ve ovaryumların daha büyük olduğu gözlenirken; OHSS grubuna göre fallop tüplerinin daha ince ve ovaryumların daha küçük olduğu görüldü (Resim 1D). OHSS protokolü ile birlikte uzun süreli Kisspeptin-54 uygulanan UK grubunda da KK grubu ile benzer bulgulara rastlandı (Resim 1E).



Resim 1. Tüm gruplara ait fallop tüplerinin ve ovaryumların görüntüleri. Sham grubu (A), Kontrol grubu (B), OHSS grubu (C), KK grubu (D), UK grubu (E). Ok başları: Fallop tüpleri. Oklar: Ovaryumlar

6.2. VÜCUT AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

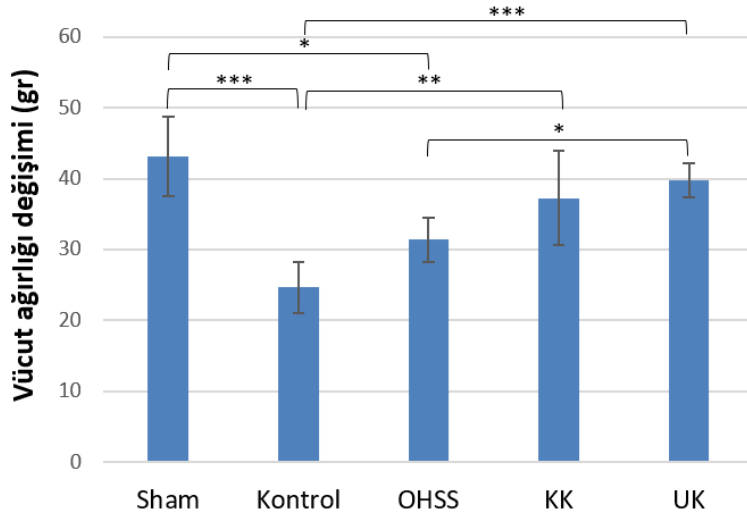
Deney protokolü başlangıcında ve bitiminde tüm gruplardaki sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi. İstatistiksel analiz için ANOVA testi, çoklu karşılaştırma için ise Tukey testi kullanıldı.

Kontrol grubunun vücut ağırlığı değişimi $24,62 \pm 3,53$ olarak belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sham grubundaki ağırlık değişiminin $43,12 \pm 5,6$ gr'a yükseldiği ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). OHSS grubunun ağırlık değişiminin $31,35 \pm 3,19$ gr olduğu, kontrol grubundan daha fazla kilo aldığı fakat bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p = 0,11$). KK grubu ağırlık değişimi $37,23 \pm 6,63$ gr olarak saptandı ve kontrol grubuna göre daha yüksekti. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p = 0,0006$). UK grubunun ise sham grubundan sonra en yüksek değişime sahip grup olarak $39,76 \pm 2,36$ gr artış gösterdiği ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$) (Tablo 10 ve Şekil 12).

Gruplar arası karşılaştırmalara bakıldığında, sham grubu ile OHSS grubu arasında kilo alımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p = 0,0012$). Deneysel OHSS modeli oluşturulan OHSS grubu ile hem deneysel OHSS modeli oluşturulan hem de kısa doz Kisspeptin-54 uygulaması yapılan KK grubu karşılaştırıldığında, KK grubunun OHSS grubundan daha fazla kilo aldığı bulunmasına rağmen, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p = 0,199$). OHSS grubu ile hem OHSS modeli oluşturulan hem de uzun süreli Kisspeptin-54 uygulaması yapılan UK grubu karşılaştırıldığında, UK grubunun daha fazla kilo artışı gösterdiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p = 0,0279$). KK ve UK gruplarının ovaryum ağırlığı değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,869$) (Tablo 10 ve Şekil 12).

Tablo 10. Tüm grupların vücut ağırlığı değişimi (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Vücut ağırlığı değişimi (gr)	$43,12 \pm 5,6$	$24,62 \pm 3,53$	$31,35 \pm 3,19$	$37,23 \pm 6,63$	$39,76 \pm 2,36$



Şekil 12. Tüm grupların vücut ağırlığı değişimi grafiği (n=6). Sham grubu deney protokolü esnasında en fazla kilo alan grup olurken; stimüle edilmiş kontrol grubu en az kilo alan grup olarak belirlendi. OHSS grubu kontrol grubuna göre daha fazla kilo alırken KK ve UK gruplarından daha düşük kilo değişimi gösterdi. OHSS ve KK grupları arasındaki kilo değişimi farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken; OHSS ve UK grupları arasındaki kilo değişim farkları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. * p<0,033, **p<0,002, ***p<0,0001

6.3. OVARYUM AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

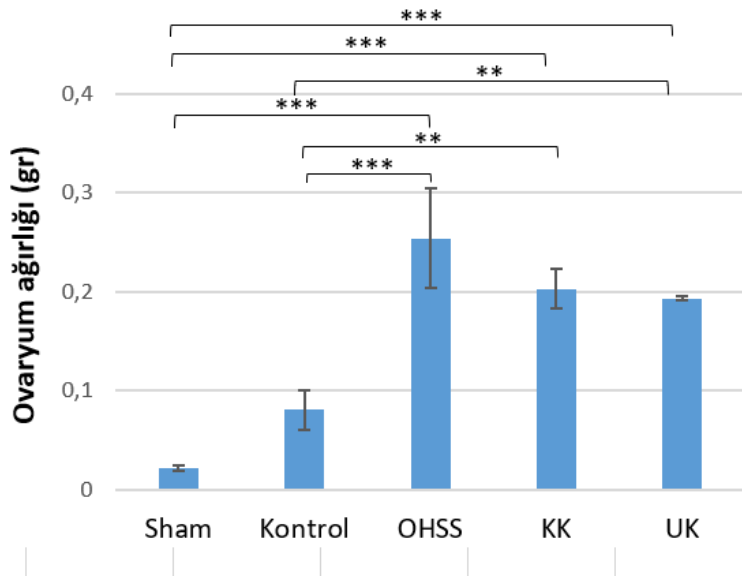
Deney protokolü sonrasında, tüm grupların ovaryumları çıkarılarak tartıldı. Ovaryum ağırlıklarının istatistiksel analizleri yapıldı.

Kontrol grubunun ovaryum ağırlığı $0,08 \pm 0,02$ gr olarak belirlendi. Sham grubunun ovaryum ağırlığının kontrol grubundan düşük olduğu, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($0,02 \pm 0,003$ gr; $p=0,128$). OHSS, KK ve UK gruplarının ovaryum ağırlıklarının sırasıyla $0,25 \pm 0,05$ gr, $0,20 \pm 0,02$ gr ve $0,19 \pm 0,002$ gr olduğu bulundu. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bu gruplardaki ovaryum ağırlıklarında belirgin bir artışın bulunduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (sırasıyla $p<0,0001$, $p=0,0004$ ve $p=0,001$) (Tablo 11 ve Şekil 13).

Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalara bakıldığında en düşük ovaryum ağırlığına sahip grubun sham grubu olduğu saptandı ($0,02 \pm 0,003$ gr) (Tablo 11). Sham grubuyla kıyaslandığında, OHSS, KK ve UK gruplarının ovaryum ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği görüldü ($p < 0,0001$) (Tablo 11). OHSS, KK ve UK grupları kendi içlerinde kıyaslandığında, ovaryum ağırlıkları arasında belirgin bir istatistiksel farkın olmadığı bulundu (Tablo 11 ve Şekil 13).

Tablo 11. Tüm grupların ovaryum ağırlıkları (ortalama \pm std sapma)

Gruplar	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Ovaryum ağırlığı (gr)	$0,02 \pm 0,003$	$0,08 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,002$



Şekil 13. Tüm grupların ovaryum ağırlığı grafiği. Ovaryum ağırlığının, sham grubunda en düşük, OHSS grubunda ise en yüksek olduğu belirlendi. Kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol grubu ile OHSS, KK ve UK grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu saptandı. ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0001$

6.4. ELISA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

6.4.1. FSH Analizi Sonuçları

İntrakardiyak olarak alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar, FSH seviyelerinin tespiti için ELISA yöntemi ile incelendi. Çıkan sonuçlar analiz edildiğinde, kontrol grubu FSH miktarının $3,619 \pm 0,17$ mIU/ml olduğu belirlendi. Sham grubundaki FSH miktarı $1,67 \pm 0,18$ mIU/ml olarak tespit edildi ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında FSH miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu bulundu ($p < 0,0001$). OHSS grubunda, uygulamalara bağlı olarak FSH miktarı yaklaşık 2 kat arttı ($7,08 \pm 0,47$ mIU/ml) ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,0001$). KK grubunda FSH seviyesinin ($4,66 \pm 0,10$ mIU/ml), OHSS grubuna benzer şekilde arttığı fakat bu artışın OHSS grubundan daha düşük olduğu bulundu. Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). OHSS modelinde uzun süreli Kisspeptin-54 verilen UK grubunun FSH seviyesinin ($3,85 \pm 0,19$ mIU/ml) kontrol grubuna benzer seviyede olduğu saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark tespit edilmedi ($p = 0,330$) (Tablo 12).

İstatistiksel olarak çoklu karşılaştırma testleri ile gruplar birbirleriyle de kıyaslandı. Buna göre sham ve OHSS, sham ve KK, sham ve UK, OHSS ve KK, OHSS ve UK ve son olarak KK ve UK grupları arasında da FSH seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farkların bulunduğu belirlendi ($p < 0,0001$) (Tablo 12).

6.4.2. LH Analizi Sonuçları

Deney gruplarına ait serum örneklerinden elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunun LH miktarı $0,24 \pm 0,02$ mIU/ml olarak belirlendi. Sham grubuna bakıldığında bu miktarın $0,08 \pm 0,01$ mIU/ml olduğu ve kontrol grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı saptandı ($p = 0,68$). OHSS grubunun LH miktarı, kontrol grubu LH seviyesinin yaklaşık 15 katı olduğu saptandı ($3,59 \pm 0,47$ mIU/ml) (Tablo 12). OHSS modeli ajanlarının LH seviyesini oldukça yüksek düzeye getirdiği ve istatistiksel olarak incelendiğinde kontrol grubuyla OHSS grubu arasında belirgin bir istatistiksel anlamlılık olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). OHSS modelinde Kisspeptin-54

verilen KK ve UK grubu LH seviyeleri sırasıyla $0,31\pm 0,02$ mIU/ml ve $0,36\pm 0,03$ mIU/ml kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (sırasıyla $p=0,978$ ve $p=0,843$) (Tablo 12).

Gruplar arası istatistiksel analizler sonucunda, OHSS grubundaki LH seviyesi artışının hem sham hem KK hem de UK gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,0001$). Sham, KK ve UK grupları LH miktarları kendi içlerinde kıyaslandığında, aralarında istatistiksel anlamlılık bulunmadığı saptandı (Sham-KK $p=0,347$; sham-UK $p=0,164$; KK-UK $p=0,991$) (Tablo 12).

Tablo 12. Tüm deney gruplarına ait FSH ve LH için ELISA analizi sonuçları (ortalama \pm std sapma)

mIU/ml	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
FSH	$1,67\pm 0,18^{***}$	$3,619\pm 0,17$	$7,08\pm 0,47^{***}$	$4,66\pm 0,10^{***}$	$3,85\pm 0,19$
LH	$0,08\pm 0,01$	$0,24\pm 0,02$	$3,59\pm 0,47^{**}$	$0,31\pm 0,02$	$0,36\pm 0,03$

** $p<0,002$, *** $p<0,0001$

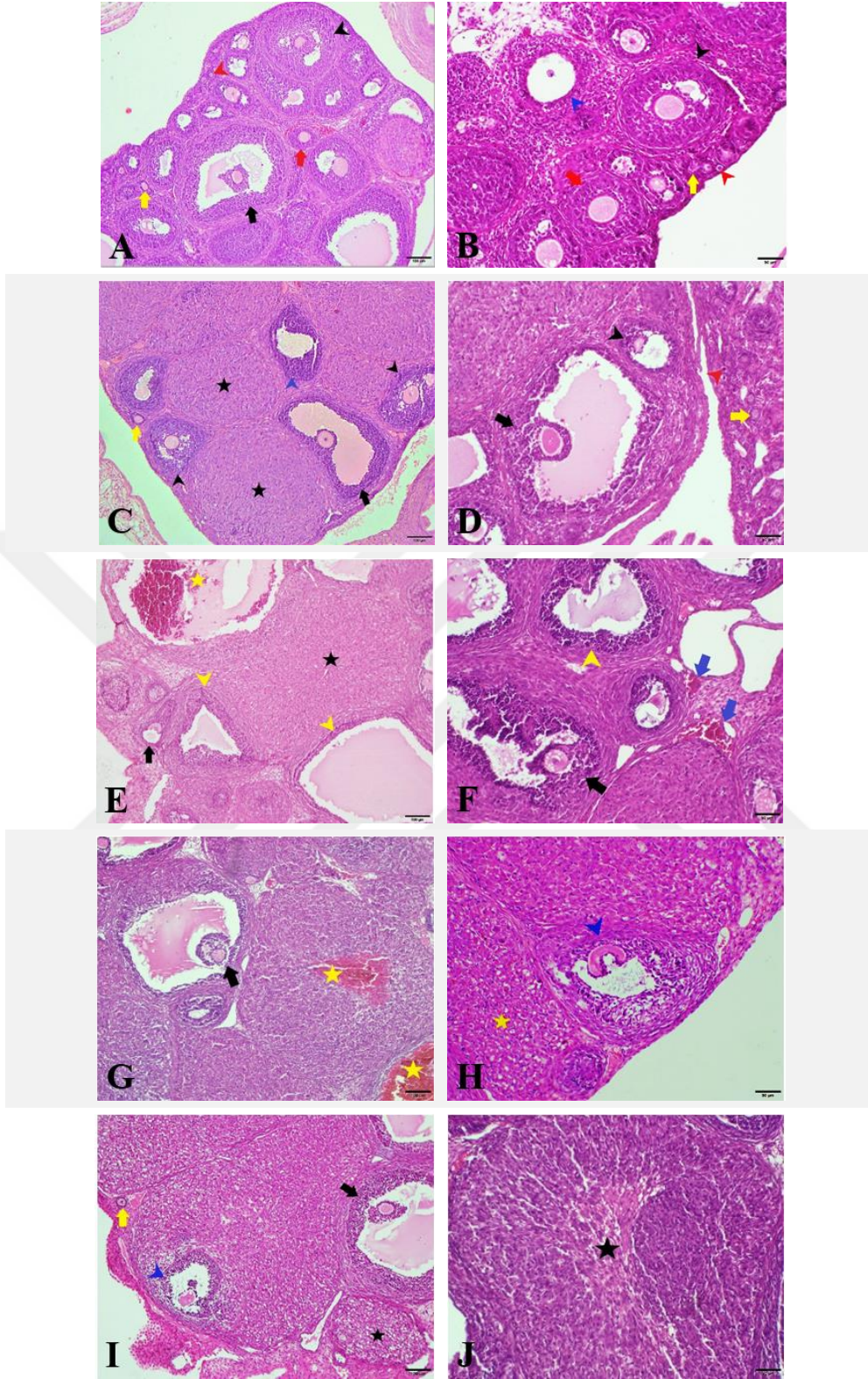
6.5. HİSTOLOJİK ANALİZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

6.5.1. Ovaryum Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

Morfolojik analiz için gruplara ait Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri incelendiğinde, sham grubu ovaryumlarının normal morfolojide olduğu, atretik ve kistik folikül sayılarının oldukça düşük olduğu gözlemlendi (Resim 2A ve Resim 2B). Kontrol grubu ovaryumlarında, farklı gelişim aşamalarında olan foliküller gözlemlendi ve folikül tipleri ve bağ dokusu alanları normal görünümdeydi (Resim 2C ve Resim 2D). OHSS grubuna ait ovaryumlarda, oldukça artmış sayıda, büyük kistik foliküller ve genişlemiş kan damarları saptandı ve korpus hemorajikum, korpus luteum ve atretik foliküller de izlendi (Resim 2E ve Resim 2F). KK grubuna ait ovaryumlarda, kistik foliküllerin olduğu fakat sayısının azaldığı, korpus hemorajikum sayısındaki artış ile

birlikte yer yer atretik foliküllerin varlığı saptandı, primordiyal, erken ve geç primer foliküllerin de azaldığı görüldü (Resim 2G ve Resim 2H). UK grubu ovaryumlarında, atretik ve kistik folikül sayılarının iyice azaldığı, korpus luteum sayılarının arttığı belirlendi (Resim 2I ve Resim 2J).





Resim 2. Sham (A-B), Kontrol (C-D), OHSS (E-F), KK (G-H) ve UK (I-J) gruplarına ait ovaryum kesitlerinin Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri. Kırmızı ok başı: Primordiyal folikül. Sarı ok: Erken primer folikül. Kırmızı ok: Geç primer folikül. Siyah ok başı: Sekonder folikül. Siyah ok: Graaf folikülü. Sarı yıldız: korpus hemorajikum. Siyah yıldız: Korpus luteum. Mavi ok başı: Atretik folikül. Sarı ok başı: Kistik folikül. Mavi yıldız: Teka eksterna. Mavi ok: Genişlemiş kan damarları. Ölçek A,C,E,G,I 100 μ m; B,D,F,H,J 50 μ m

6.5.2. Ovaryum Hacimlerinin Değerlendirilmesi

Gruplara ait ovaryum hacimlerinin hesaplanmasında Cavalieri yönteminden yararlanıldı. Tüm deneklerden alınan her bir ovaryumdan toplam 10 adet kesit alınarak Hematoksilen-Eozin boyaması yapıldı ve bu kesitler alan ve hacim hesabı için kullanıldı.

Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna ait deneklerin ovaryum hacimlerinin, sham grubundakilerin yaklaşık 2 katı olduğu belirlendi. Ancak istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmadı ($p=0,09$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında, OHSS grubunda ovaryum hacimlerinin 3 kat; KK ve UK gruplarında ise ovaryum hacimlerinin yaklaşık 2,5 kat arttığı belirlendi ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). OHSS grubu ile kıyaslandığında hem KK hem de UK gruplarına ait ovaryan hacimlerin azaldığı ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı tespit edildi (sırasıyla $p=0,27$, $p=0,33$). KK ve UK grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p=0,99$) (Tablo 13).

Tablo 13. Tüm deney gruplarına ait ovaryum hacim sonuçları (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Ovaryum hacmi (mm³)	15,38 \pm 3,16	32,14 \pm 1,27	88,24 \pm 8,03***	75,84 \pm 11,96**	76,67 \pm 5,75**

** $p<0,002$, *** $p<0,0001$.

6.5.3. Ovaryum Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi

Folikül sayılarının hesaplanmasında, her gruptan 10 adet kesit kullanıldı. Her grup için ayrı ayrı olmak üzere, her kesitteki toplam folikül sayısı farklı folikül tiplerine oranlandı ve % folikül değerleri elde edildi. İstatistiksel analiz için ANOVA testi ile Geisser-Greenhouse doğrulaması kullanıldı. Çoklu karşılaştırma için ise Tukey testi kullanıldı. $P<0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz sonuçları Tablo 14'te verildi.

Primordiyal folikül

Primordiyal folikül oranı sham grubundaki ovaryumlarda en yüksek; OHSS grubunda en düşüktü (Tablo 14). KK ve UK gruplarında da primordiyal folikül sayısının azaldığı belirlendi (Tablo 14). OHSS, KK ve UK grupları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, primordiyal folikül azalışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,0001$) (Tablo 14). KK ve UK gruplarında primordiyal folikül oranı OHSS grubundan daha yüksekti ancak bu fark anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p=0,13$, $p=0,07$) (Tablo 14).

Erken primer folikül

Erken primer folikül oranları incelendiğinde, en yüksek oran sham grubuna aitti (Tablo 14). Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu farkın anlamlı olduğu saptandı ($p=0,02$) (Tablo 14). OHSS ve UK gruplarında folikül oranının azaldığı ve kontrol grubuna göre bu azalmanın anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,033$) (Tablo 14). KK grubunda folikül oranının en düşük seviyeye indiği ve kontrol grubuyla aralarında istatistiksel fark olduğu belirlendi ($p<0,002$) (Tablo 14).

Geç primer folikül

Geç primer folikül oranı tüm gruplar arasında benzer bulundu. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında herhangi bir farka rastlanmadı ($p>0,05$) (Tablo 14).

Sekonder folikül

Kontrol grubunda sekonder folikül oranının en yüksek olduğu saptandı (Tablo 14). Sham, OHSS, KK ve UK gruplarında bu oranın azaldığı belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sham, OHSS ve KK gruplarındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,033$), ancak UK grubunda anlamlı bir fark bulunmadığı ($p=0,21$) tespit edildi (Tablo 14). OHSS, KK ve UK grupları kendi içlerinde kıyaslandığında anlamlı farka rastlanmadı ($p=0,072$) (Tablo 14).

Graaf folikülü

En yüksek Graaf folikülü oranı UK grubunda; en düşük oran ise sham grubunda gözlemlendi (Tablo 14). Kontrol ile sham grupları arasında istatistiksel fark bulunamadı ($p=0,55$) (Tablo 14). OHSS, KK ve UK gruplarındaki graaf folikülü oranlarının

kontrol grubuna göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,033$) (Tablo 14).

Korpus hemorajikum

Sham grubunda korpus hemorajikum gözlenmez iken, kontrol grubunda oldukça düşük oranda rastlandı (Tablo 14). OHSS, KK ve UK gruplarında korpus hemorajikum sayılarının belirgin şekilde arttığı, bu artışın KK ve UK gruplarında anlamlı olduğu (sırasıyla $p<0,0002$, $p<0,0001$), OHSS grubunda ise anlamlı olmadığı ($p=0,22$) belirlendi (Tablo 14). Ayrıca KK grubundaki korpus hemorajikum oranının, OHSS grubuna göre anlamlı seviyede arttığı ($p<0,05$), UK grubunda ise KK grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 14).

Korpus luteum

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, OHSS, KK ve UK gruplarındaki korpus luteum oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği ($p<0,002$), sham grubunda hiç korpus luteum olmadığı izlendi (Tablo 14).

Atretik folikül

Atretik folikül oranının OHSS, KK ve UK gruplarında, kontrol grubuna göre arttığı, ancak sadece OHSS grubunda istatistiksel fark olduğu gözlemlendi ($p<0,033$) (Tablo 14). Sham grubunda atretik folikül oranının en düşük olduğu, ancak kontrol grubuyla aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p=0,72$) (Tablo 14). KK grubunda atretik folikül oranının OHSS grubuna göre azaldığı ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo 14). UK grubundaki bu folikül tipinin oranının, OHSS grubuna göre azaldığı ve aralarında anlamlı farkın olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 14).

Kistik folikül

OHSS, KK ve UK gruplarında kistik folikül sayısının artış gösterdiği izlendi (Tablo 14). Kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde bu artışın, OHSS ve KK gruplarında anlamlı olduğu ($p<0,033$), UK grubunda ise anlamlı olmadığı ($p=0,99$) belirlendi (Tablo 14). UK grubu OHSS ve KK grupları ile kıyaslandığında, atretik folikül oranının UK grubunda azaldığı ve bu azalmanın her iki gruba göre anlamlı

olduğu bulundu ($p<0,05$) (Tablo 14). Sham grubunda çok az sayıda kistik folikül gözlemlendi (Tablo 14).

Tablo 14. Tüm deney gruplarına ait folikül sayıları (% ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Primordiyal folikül	32,70 \pm 3,29**	25,01 \pm 5,48	3,44 \pm 1,49***	5,1 \pm 1,29***	5,87 \pm 2,06***
Erken primer folikül	27,35 \pm 7,61*	21,69 \pm 6,80	9,19 \pm 3,91*	5,98 \pm 2,01**	9 \pm 2,23*
Geç primer folikül	19,14 \pm 11,85	10,79 \pm 8,13	11,24 \pm 5,73	7,25 \pm 3,93	11 \pm 4,78
Sekonder folikül	13,75 \pm 6,54*	22,52 \pm 10,74	12,45 \pm 8,68*	12,32 \pm 7,52*	13,21 \pm 8,91
Graaf folikül	3,15 \pm 1,47	5,97 \pm 4,14	13,63 \pm 7,89*	18,04 \pm 9,49*	25,21 \pm 13,53*
Korpus hemorajikum	0 \pm 0	0,68 \pm 1,36	3,58 \pm 3,14	10,56 \pm 3,52** _a	4,63 \pm 1,78* _x
Korpus luteum	0 \pm 0	2,29 \pm 2,26	16,51 \pm 10,57*	18,71 \pm 4,79**	18,34 \pm 8,42**
Atretik folikül	0,74 \pm 1,11	2,05 \pm 1,82	6,45 \pm 3,16*	3,73 \pm 3,03	2,44 \pm 2,19 _a
Kistik folikül	0,40 \pm 0,58	8,95 \pm 3,86	23,46 \pm 13,49*	18,27 \pm 8,61*	10,27 \pm 4,87 _{a,x}

*: Kontrol grubuna göre kıyaslama $*p<0,033$, $**p<0,002$, $***p<0,0001$. **a**: OHSS grubuna göre kıyaslama, $a=p<0,05$; **x**: KK grubuna göre kıyaslama, $x=p<0,05$

6.5.4. Ovaryumların İmmünohistokimyasal Analizlerinin Değerlendirilmesi

Ovaryumların immünohistokimyasal değerlendirmelerinde, H-skor tekniği kullanıldı. Her bir primer antikor için, her gruptaki farklı folikül tiplerinde yer alan

granüloza hücrelerinin karşılaştırması yapıldı. İstatistiksel analizlerde ANOVA ile birlikte Tukey testi kullanıldı.

6.5.4.1. VEGF Dağılımı

VEGF immünoreaktivite dağılımları foliküller bazında değerlendirilmiş ve karşılaştırmaları Tablo 15'te verilmiştir.

Primordiyal folikül

Primordiyal foliküllerdeki granüloza hücrelerinin VEGF immünoreaktivitesi, sham (Resim 3D) ve kontrol gruplarında oldukça zayıf iken, OHSS grubunda kuvvetli pozitif olarak belirlendi. Bu grupların H-skor değerlerinin sırasıyla $52 \pm 26,73$, $50,5 \pm 21,67$ ve $360,3 \pm 19,69$ olduğu hesaplandı ve H-skor değerleri arasında anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 15). KK ve UK (Resim 7A) gruplarında ise VEGF immünoreaktivitesinin bazı granüloza hücrelerinde zayıf iken bazılarında orta olduğu belirlendi. KK grubunun H-skor değerinin $102,5 \pm 1,45$, UK grubunun H-skor değerinin ise $122 \pm 3,55$ olduğu tespit edildi (Tablo 15). Bu grupların H-skor sonuçlarının, kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken ($p < 0,0001$) (Tablo 15), OHSS grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 15).

Erken primer folikül

Tüm gruplardaki granüloza hücrelerinin VEGF immünoreaktivitesi karşılaştırıldığında, en yüksek boyanma, orta pozitif olmak üzere OHSS grubunda saptandı (Resim 5B). Sham (Resim 3B), kontrol, KK (Resim 6C) ve UK (Resim 7A) gruplarına ait granüloza hücrelerinde ise yer yer orta-kuvvetli pozitif boyanmalar gözlemlense de genel olarak negatif-zayıf pozitif boyanma tespit edildi. Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarına ait H-skor değerleri sırasıyla $27,1 \pm 19,2$, $21,9 \pm 1,7$, $172,2 \pm 35,6$, $58,3 \pm 6,3$ ve $55,4 \pm 16,4$ olarak belirlendi (Tablo 15). OHSS grubu ile kontrol arasında anlamlı farkın olduğu bulundu ($p < 0,0001$) (Tablo 15). Kontrol ve Sham grupları arasında anlamlı fark saptanmaz iken ($p = 0,2$) (Tablo 15); Kontrol-KK ve Kontrol-UK grupları arasında istatistiksel fark olduğu belirlendi ($p < 0,033$) (Tablo 15). KK ve UK grupları OHSS grubuyla kıyaslandığında, VEGF H-skor değerlerinin KK ve UK gruplarında daha düşük olduğu ve OHSS grubuyla aralarında anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 15).

Geç primer folikül

Sham (Resim 3A-D), kontrol (Resim 4A, C), KK (Resim 6A, B) ve UK (Resim 7A) gruplarında VEGF immünoaktivitesinin negatif olduğu, OHSS grubunda bazı granüloza hücrelerinin zayıf boyanma gösterdiği gözlemlendi (Resim 3-7). Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarına ait H-skor değerleri sırasıyla $33 \pm 20,2$, $54,1 \pm 25,3$, $97,2 \pm 23,4$, $66,4 \pm 12,5$ ve $59,2 \pm 22,3$ olarak belirlendi (Tablo 15). H-skor sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, OHSS grubunda anlamlı artış olduğu ($p < 0,033$) (Tablo 15) ancak diğer gruplarda anlamlı değişim olmadığı ($p > 0,05$) saptandı (Tablo 15). OHSS grubuyla kıyaslandığında ise sham ve UK gruplarında anlamlı azalma olduğu ($p < 0,05$) (Tablo 15); KK grubunda ise anlamlı bir farkın olmadığı ($p = 0,75$) tespit edildi (Tablo 15).

Sekonder folikül

Granüloza hücrelerindeki VEGF immünoaktivitesinin sham grubunda yer yer zayıf pozitif ancak çoğunlukla negatif olduğu (Resim 3A, B), kontrol (Resim 4A, C), KK ve UK (Resim 7A) gruplarında zayıf pozitif olduğu belirlendi. OHSS grubunda boyanmanın arttığı ve orta pozitif olduğu saptandı (Resim 5D). Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarına ait H-skor değerleri sırasıyla $88 \pm 27,1$, $100 \pm 32,4$, $247,6 \pm 52,1$, $105,6 \pm 2,5$ ve $109 \pm 1,8$ olarak belirlendi (Tablo 15). Kontrol grubu ile sham grubu arasındaki VEGF H-skor değerlerinde anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$) (Tablo 15). OHSS grubunda immünoaktivitenin arttığı ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkın bulunduğu görüldü ($p < 0,0001$) (Tablo 15). KK ve UK gruplarında granüloza hücrelerinin H-skor değerlerinin arttığı ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Tablo 15). Ayrıca KK ve UK gruplarında OHSS grubuna göre VEGF seviyesinde anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 15).

Graaf folikülü

OHSS grubundaki bazı granüloza hücrelerinde kuvvetli pozitif boyanmayla birlikte sıklıkla orta pozitif boyanma saptandı (Resim 5B). Sham (Resim 3A), kontrol (Resim 4D), KK (Resim 6A, D) ve UK (Resim 7A, C) gruplarında boyanmanın zayıf pozitif olduğu gözlemlendi. Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarına ait H-skor değerleri sırasıyla 75 ± 21 , $89,4 \pm 20,4$, $242,4 \pm 43,4$, $71,5 \pm 28,5$ ve $62,3 \pm 10,3$ olarak

belirlendi (Tablo 15). VEGF H-skor değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında, sadece OHSS grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu belirlendi ($p<0,0001$) (Tablo 15). OHSS grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında ise, sham, KK ve UK gruplarında anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 15).

Korpus hemorajikum

Sham grubunda korpus hemorajikum saptanamadığından bu grup, korpus hemorajikum VEGF H-skor değerlendirmesine katılmadı. Kontrol grubunda boyanmanın zayıf pozitif, OHSS grubunda orta-kuvvetli pozitif, KK ve UK grubunda ise zayıf-orta pozitif olduğu saptandı. Kontrol grubunun H-skor değeri $123\pm44,3$ olarak hesaplandı (Tablo 15). OHSS grubundaki korpus hemorajikum granüloza hücrelerinde H-skor değerinin $286,7\pm50,5$ olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiğı belirlendi ($p<0,0002$) (Tablo 15). KK ve UK gruplarında da bu değerin sırasıyla $182,4\pm45,7$ ve $141,4\pm14,9$ olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı seviyede arttığı ($p<0,05$), ancak OHSS grubuna göre anlamlı seviyede azaldığı ($p<0,05$) tespit edildi (Tablo 15). UK grubu granüloza hücrelerindeki azalmanın KK grubundan da anlamlı seviyede olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 15).

Korpus luteum

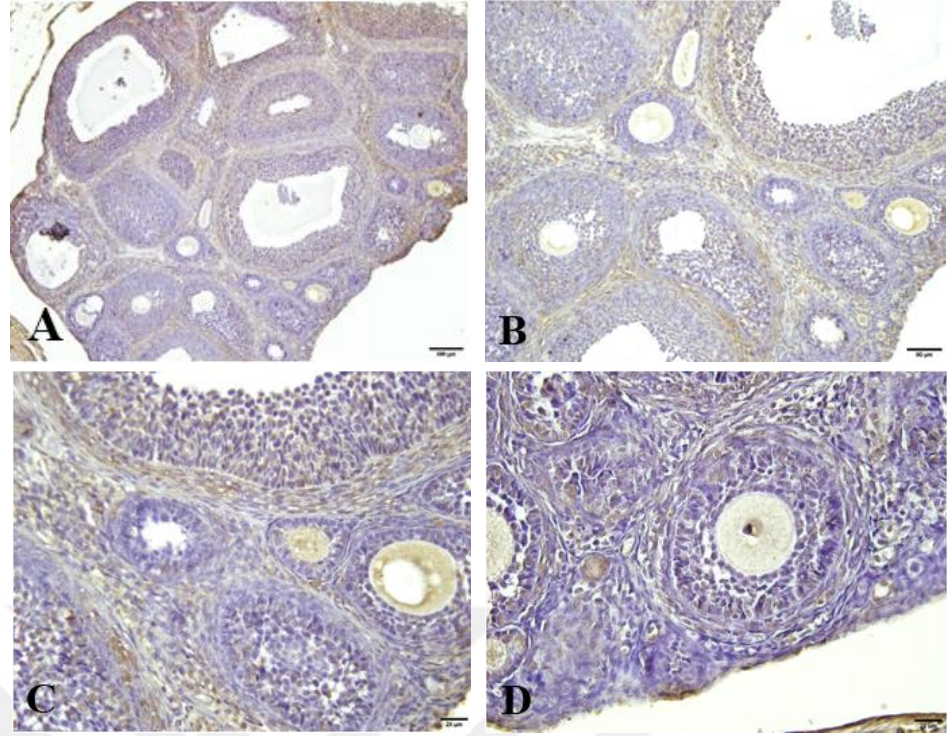
Sham grubunda hiç korpus luteum saptanmadığından bu grup bu değerlendirmeye dahil edilmedi. VEGF immünoreaktivitesinin kontrol grubunda zayıf pozitif (Resim 4A), OHSS grubunda orta-kuvvetli pozitif (Resim 5A, C), KK grubunda orta pozitif (Resim 6C) ve UK grubunda zayıf pozitif (Resim 7B) olduğu saptandı. H-skor değerleri kontrol grubunda 129 ± 44 , OHSS grubunda $269,1\pm21$, KK grubunda $202,7\pm57,7$ ve UK grubunda $108,4\pm26$ olarak hesaplandı (Tablo 15). Granüloza hücrelerindeki VEGF H-skor değerleri kıyaslandığında, OHSS ve KK gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu ($p<0,05$) (Tablo 15); UK grubu ile kontrol grubu arasında ise anlamlı bir fark olmadığı ($p=0,62$) (Tablo 15) belirlendi. OHSS grubu ile kıyaslandığında KK ve UK gruplarından anlamlı azalma tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 15). UK grubunda ise H-skorun KK grubuna göre anlamlı seviyede azaldığı saptandı ($p<0,05$) (Tablo 15).

Atretik folikül

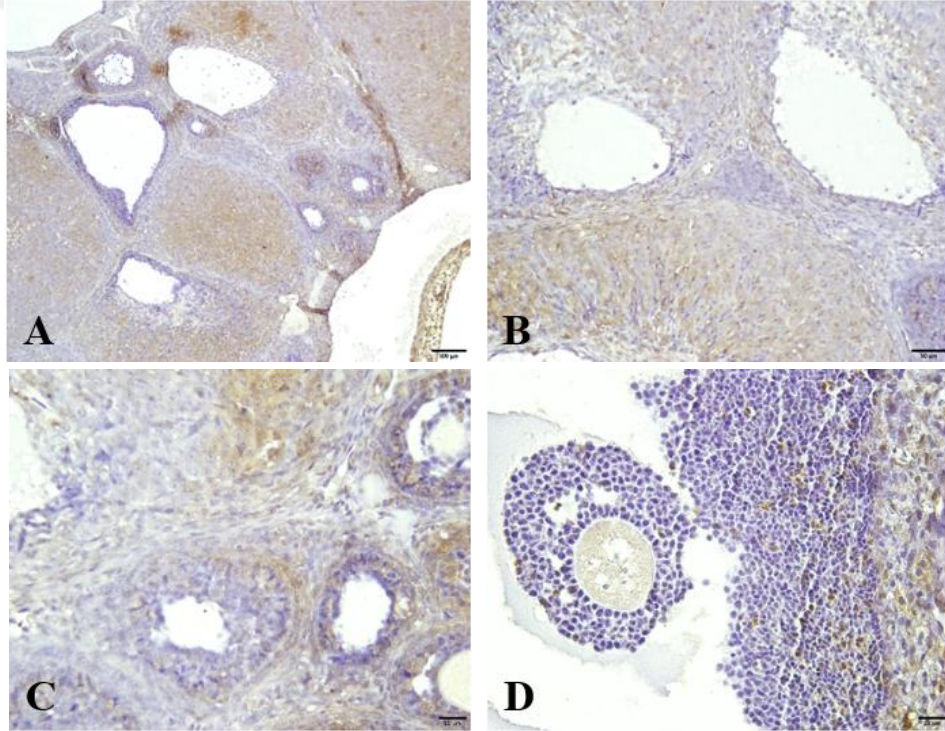
Atretik foliküllerdeki granüloza hücreleri incelendiğinde, kontrol, OHSS ve KK gruplarındaki boyanmanın zayıf pozitif olduğu, sham ve UK gruplarında ise boyanmanın bazı hücrelerde zayıf pozitif iken çoğunlukla negatif olduğu tespit edildi. VEGF H-skor değerlerine bakıldığında, kontrol grubunda $133,5 \pm 45,1$, OHSS grubunda $104,1 \pm 25,2$ ve KK grubunda $138,6 \pm 36,2$ olduğu saptandı ve bu gruplar arasında istatistiksel bir fark belirlenemedi ($p > 0,05$) (Tablo 15). Kontrol grubu ile kıyaslandığında sham grubu immünoaktivitesinin düşük olduğu ($48,2 \pm 16,2$, $p < 0,05$), UK grubunda kontrol ve KK gruplarına göre anlamlı değişimin bulunduğu gözlemlendi ($63,4 \pm 12,3$, $p < 0,05$) (Tablo 15).

Kistik Folikül

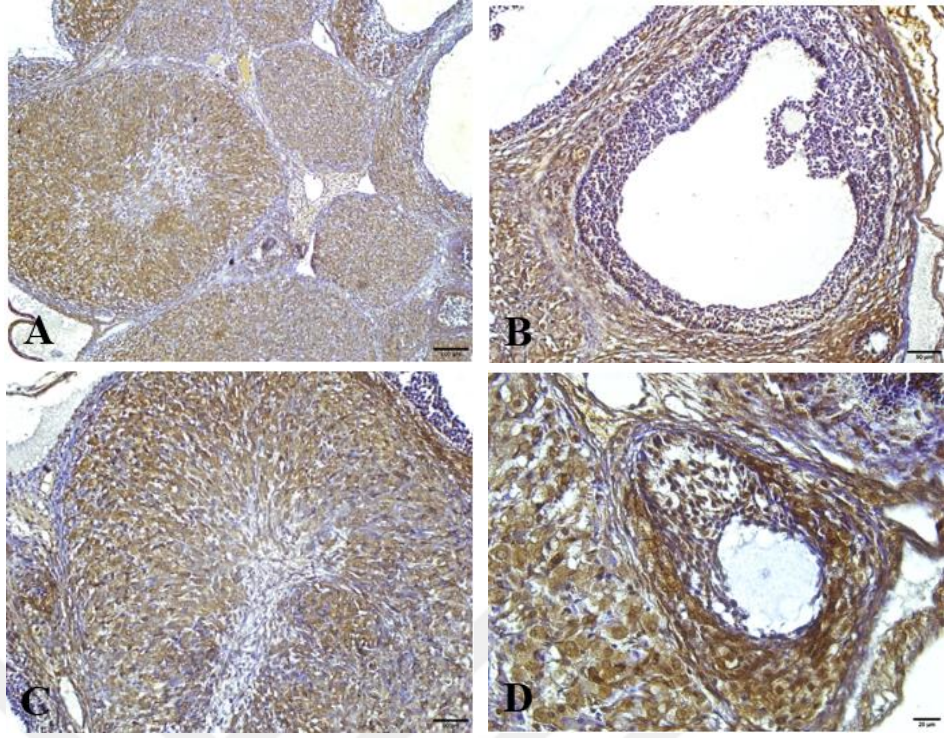
Bu folikül tipindeki granüloza hücrelerinde VEGF immünoaktivitesinin sham (Resim 3A) ve OHSS grubunda zayıf pozitif iken, kontrol (Resim 4A, B), KK (Resim 6A, B) ve UK (Resim 7B) gruplarında genel olarak negatif olduğu saptandı. VEGF H-skorunun sham grubunda 105 ± 31 ve OHSS grubunda $121,5 \pm 25$ olduğu ve bu gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 15). Kontrol, KK ve UK gruplarının H-skor değerleri arasında istatistiksel herhangi bir fark belirlenemedi (sırasıyla $53,6 \pm 15,6$, $47,1 \pm 11,6$ ve $35,9 \pm 9,3$, $p > 0,05$) (Tablo 15).



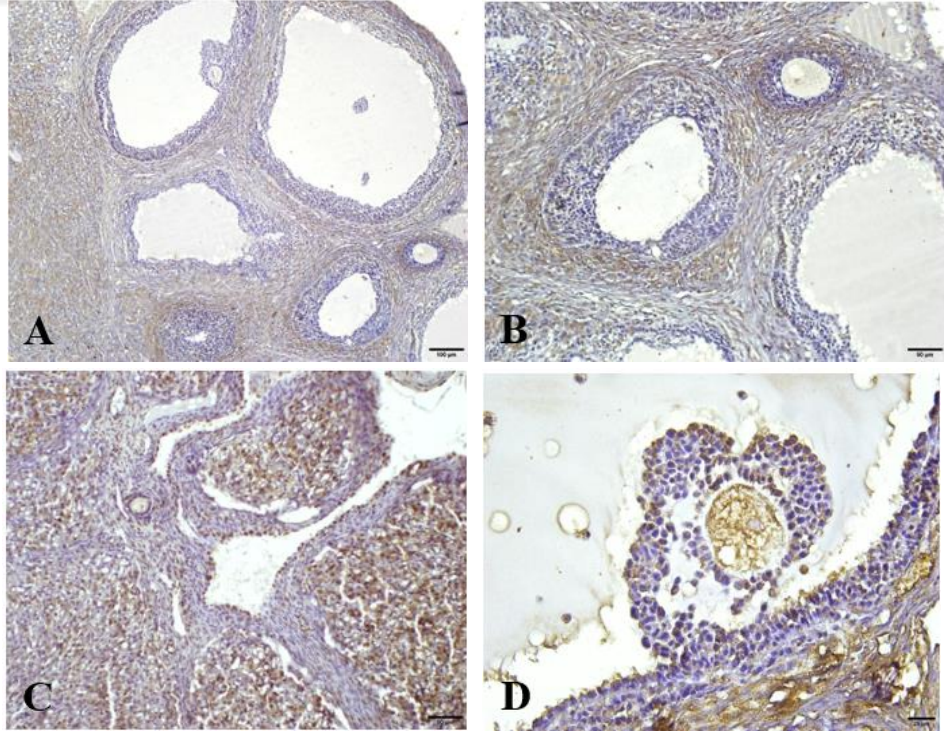
Resim 3. Sham grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



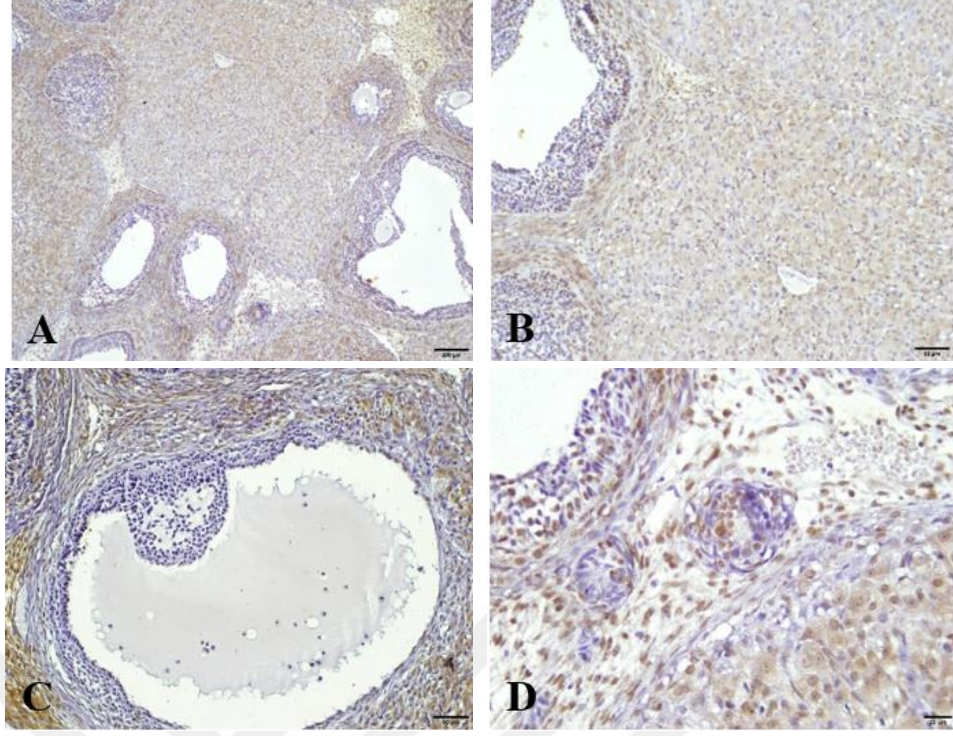
Resim 4. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 5. OHSS grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100 μ m; B,C 50 μ m; D 20 μ m



Resim 6. KK grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100 μ m; B,C 50 μ m; D 20 μ m



Resim 7. UK grubuna ait ovaryum dokularında VEGF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm

Tablo 15. Tüm gruplara ait VEGF immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Primordiyal folikül	52 \pm 26,73 _a	50,5 \pm 21,67	360,3 \pm 19,69 ^{***}	102,5 \pm 1,45 ^{*a}	122 \pm 3,55 ^{*a}
Erken primer folikül	27,1 \pm 19,2 _a	21,9 \pm 1,7	172,2 \pm 35,6 ^{***}	58,3 \pm 6,3 ^{*a}	55,4 \pm 16,4 ^{*a}
Geç primer folikül	33 \pm 20,2 _a	54,1 \pm 25,3	97,2 \pm 23,4 [*]	66,4 \pm 12,5	59,2 \pm 22,3 _a
Sekonder folikül	88 \pm 27,1 _a	100 \pm 32,4	247,6 \pm 52,1 ^{***}	105,6 \pm 2,5 _a	109 \pm 1,8 _a
Graaf folikül	75 \pm 21 _a	89,4 \pm 20,4	242,4 \pm 43,4 ^{***}	71,5 \pm 28,5 _a	62,3 \pm 10,3 _a
Korpus hemorajikum	0 \pm 0	123 \pm 44,3	286,7 \pm 50,5 ^{**}	182,4 \pm 45,7 ^{*a}	141,4 \pm 14,9 ^{*ax}
Korpus luteum	0 \pm 0	129 \pm 44	269,1 \pm 21 ^{***}	202,7 \pm 57,7 ^{*a}	108,4 \pm 26 _{ax}
Atretik folikül	48,2 \pm 16,2 ^{*a}	133,5 \pm 45,1	104,1 \pm 25,2	137,6 \pm 36,2	63,4 \pm 12,3 ^{*x}
Kistik folikül	105 \pm 31 [*]	53,6 \pm 15,6	121,5 \pm 25 [*]	47,1 \pm 11,6 _a	35,9 \pm 9,3 _a

*: Kontrol grubuna göre kıyaslama *p<0,033, **p<0,002, ***p<0,0001. a: OHSS grubuna göre kıyaslama, a=p<0,05; x: KK grubuna göre kıyaslama, x=p<0,05

6.5.4.2. PEDF Dağılımı

PEDF immünoreaktivite dağılımları foliküller bazında değerlendirilmiş ve karşılaştırmaları Tablo 16'da verilmiştir.

Primordiyal folikül

Primordiyal foliküllere ait granüloza hücrelerinde PEDF immünoreaktivitesinin sham (Resim 8A) ve kontrol grubunda zayıf-orta pozitif, OHSS grubunda negatif, KK

ve UK (Resim 7A) gruplarında ise kuvvetli pozitif olduğu belirlendi. Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarına ait H-skor değerleri sırasıyla $191\pm44,2$, $196\pm44,7$, $47,4\pm5,7$, $381\pm8,87$ ve $369\pm11,9$ olarak hesaplandı (Tablo 16). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PEDF H-skor değerlerinin sham grubunda kontrol grubuna benzer olduğu ($p>0,05$) (Tablo 16); OHSS grubunda en az seviyede olduğu ($p<0,0001$) (Tablo 16); KK ve UK gruplarında anlamlı seviye arttığı ($p<0,0001$) (Tablo 16) belirlendi. OHSS grubu ile kıyaslandığında ise KK ve UK gruplarında da belirgin bir artışın olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 16).

Erken primer folikül

PEDF boyanmalarının sham (Resim 8A, C) ve kontrol gruplarında zayıf pozitif, OHSS grubunda negatif, KK ve UK gruplarında ise kuvvetli pozitif olduğu belirlendi. H-skor değeri kontrol grubunda $146\pm36,3$ olarak hesaplandı (Tablo 16). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, granüloza hücrelerinin PEDF H-skor değerlerinin sham grubunda $154\pm39,9$ olduğu ve kontrol grubuna benzer olduğu ($p>0,05$) (Tablo 16), OHSS grubunda $34,9\pm11,1$ seviyesine düşerek anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,0001$) (Tablo 16), KK ve UK gruplarında sırasıyla $363\pm41,7$ ve $367,7\pm15,3$ olduğu ve anlamlı seviyede arttığı ($p<0,0001$) (Tablo 16) belirlendi. OHSS grubu ile kıyaslandığında ise KK ve UK gruplarında da belirgin bir artışın olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 16).

Geç primer folikül

Bu foliküllerde granüloza hücrelerindeki immünoreaktivitenin sham (Resim 8A-C) ve kontrol (Resim 9B) gruplarında zayıf pozitif, OHSS grubunda yer yer zayıf pozitif olmakla beraber çoğunlukla negatif, KK grubunda orta pozitif (Resim 11A, C) ve UK grubunda kuvvetli pozitif olduğu tespit edildi. PEDF H-skor değerleri sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarında sırasıyla $167\pm38,4$, 115 ± 55 , $79,8\pm33,7$, $238\pm56,8$ ve $383\pm16,9$ olarak hesaplandı (Tablo 16). Sham ve OHSS gruplarında kontrol grubuna kıyasla bir değişimin olmadığı ($p>0,05$) (Tablo 16); KK ve UK gruplarında ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ($p<0,0001$) (Tablo 16) belirlendi. Sham, KK ve UK gruplarındaki H-skor değerlerinin OHSS grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği ($p<0,05$) (Tablo 16) saptandı.

Sekonder folikül

Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinde sham (Resim 8A, C, D) ve kontrol (Resim 9D) gruplarında bazı alanlarda zayıf pozitif bazı alanlarda ise orta pozitif PEDF boyanması gözlemlendi. OHSS grubunda boyanmanın azaldığı ve negatif olduğu belirlendi (Resim 10D). KK grubundaki hücrelerde boyanmanın arttığı ve hem orta pozitif hem de kuvvetli pozitif boyanma olduğu saptandı. En yüksek immünoaktivite ise UK grubunda gözlemlendi ve kuvvetli pozitif boyanan granüloza hücreleri incelendi (Resim 12A). H-skor değerleri sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarında sırasıyla $186,6 \pm 48$, $154 \pm 34,5$, $33,1 \pm 10,4$, $288 \pm 71,2$ ve 384 ± 79 olarak hesaplandı (Tablo 16). Kontrol grubuna göre, PEDF H-skor değerlerinin, OHSS grubunda oldukça azaldığı bulundu ($p < 0,0002$) (Tablo 16). Bu değer KK grubunda, kontrol ve OHSS gruplarından belirgin şekilde yüksek olduğu ($p < 0,05$); UK grubundan ise anlamlı seviyede düşük olduğu ($p < 0,05$) gözlemlendi (Tablo 16). En yüksek artışın UK grubunda olduğu ve bu grubun diğer gruplara göre istatistiksel anlamlılık barındırdığı saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 16).

Graaf folikülü

OHSS grubu dışındaki tüm gruplarda, graaf folikülü granüloza hücrelerindeki PEDF immünoaktivitesi oldukça yüksek bulundu. OHSS grubunda negatif boyanma gözlenirken (Resim 10B), kontrol grubunda yer yer orta pozitif ve kuvvetli pozitif alanlara (Resim 9A, C), sham, KK (Resim 11D) ve UK (Resim 12A, C, D) gruplarında ise kuvvetli pozitif alanlara rastlandı. H-skor değerleri incelendiğinde, sham, kontrol ve KK grupları arasında anlamlı bir değişim olmadığı (sırasıyla 317 ± 30 , $287 \pm 43,6$ ve $331 \pm 61,3$, $p > 0,05$) (Tablo 16); UK grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın var olduğu ($350 \pm 35,1$, $p < 0,05$) (Tablo 16) saptandı. OHSS grubunda bu değer kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldığı belirlendi ($34,1 \pm 18,8$, $p < 0,0001$) (Tablo 16).

Korpus hemorajikum

Sham grubu ovaryumlarında korpus hemorajikum bulunmadığından bu grup bu değerlendirmeye dahil edilmedi. Bu folikül tipindeki granüloza hücrelerinin boyanma derecelerinin kontrol grubunda kuvvetli pozitif, OHSS grubunda negatif, KK grubunda orta pozitif ve UK grubunda kuvvetli pozitif olduğu saptandı. H-skor değeri

kontrol grubunda $313\pm 36,1$ ve OHSS grubunda $36,1\pm 10,5$ olarak hesaplandı (Tablo 16). OHSS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmanın olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$) (Tablo 16). KK grubu H-skor değeri $220\pm 59,2$ olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmanın bulunduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 16). UK grubundaki PEDF H-skor değeri $346,2\pm 22,7$ olarak hesaplandı ve kontrol grubu ile benzer sonuca sahip olduğu görüldü ($p>0,05$) (Tablo 16). KK ve UK gruplarındaki PEDF seviyesinde OHSS grubuna kıyasla artış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 16).

Korpus luteum

Sham grubu ovaryumlarında korpus luteum olmadığından bu grup bu değerlendirmeye dahil edilmedi. Granüloza hücrelerinin kontrol grubunda orta pozitif (Resim 9B), OHSS grubunda negatif (Resim 10A, C), KK grubunda orta pozitif (Resim 11A, C) ve UK grubunda kuvvetli pozitif olduğu saptandı. Kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarının H-skor değerleri $227\pm 39,9$, $40,6\pm 1,8$, $270\pm 68,8$ ve $375\pm 20,8$ olarak hesaplandı (Tablo 16). OHSS grubu H-skor değerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmanın olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$) (Tablo 16). KK grubunda kontrol grubuna göre bir artış olduğu ancak bu artışın anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$) (Tablo 16). UK grubundaki PEDF immünoreaktivitesinin oldukça arttığı ve kontrol grubu ile aralarında istatistiksel fark olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 16). KK ve UK gruplarındaki PEDF seviyesi OHSS grubuna kıyasla artış gösterdi ($p<0,05$) (Tablo 16). Ek olarak immünoreaktivite derecesinin UK grubunda KK grubundan daha fazla olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 16).

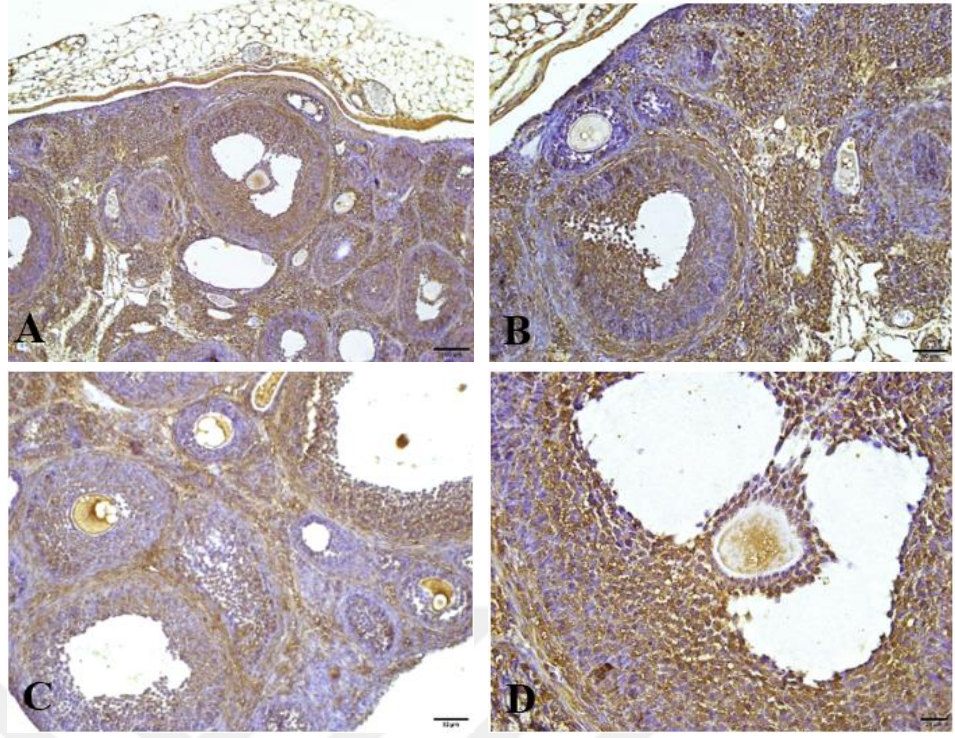
Atretik folikül

Sham (Resim 8C) ve kontrol gruplarında zayıf ve orta pozitif alanlar izlenirken, OHSS grubunda negatif alanlar gözlemlendi. KK grubundaki hücrelerde orta pozitif alanlar baskın olurken (Resim 11A), UK grubundaki hücrelerde kuvvetli pozitif alanlar izlendi. Atretik foliküllerdeki granüloza hücrelerinin H-skor değerinin sham ($147\pm 37,7$) ve kontrol ($199\pm 54,8$) gruplarında benzer olduğu ($p>0,05$), OHSS grubunda minimum düzeyde olduğu ($19,5\pm 7,84$) ve bu değer kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farka sahip olduğu belirlendi ($p<0,0001$) (Tablo 16). PEDF immünoreaktivitesinin KK ($265\pm 65,7$) ve UK ($366\pm 23,4$) gruplarında kontrol grubundan anlamlı seviyede yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$) (Tablo 16). OHSS grubuyla kıyaslandığında, sham, KK ve UK gruplarındaki H-skor değerlerinin anlamlı

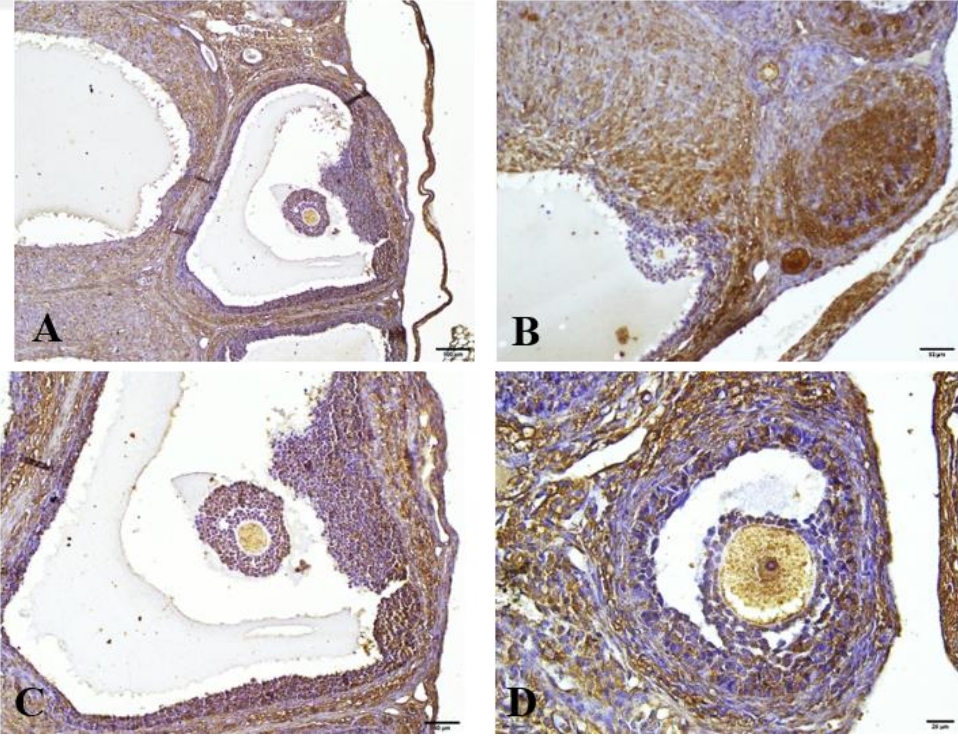
şekilde artış gösterdiği belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 16). KK ve grupları kendi içlerinde kıyaslandığında ise UK grubundaki PEDF artışının KK grubundan daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Tablo 16).

Kistik Folikül

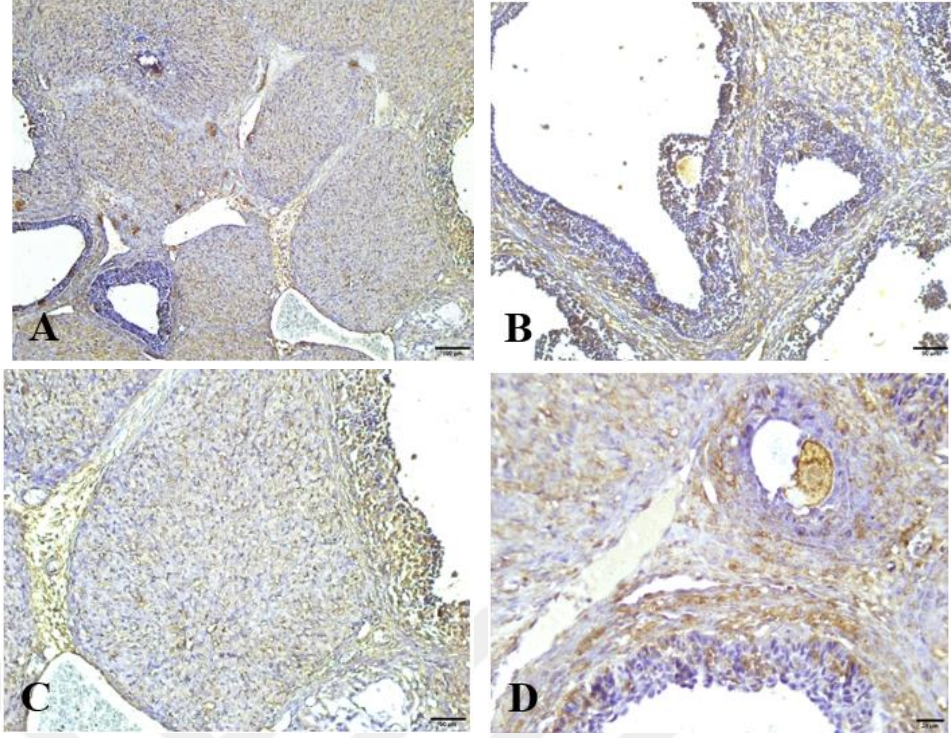
Kistik foliküllerdeki granüloza hücrelerinin sham (Resim 8A-C) ve kontrol (Resim 9B) gruplarında zayıf ile orta pozitif, OHSS grubunda en düşük seviyeye ulaşarak negatif (Resim 10B), KK grubunda artış göstererek orta pozitif (Resim 11A, B) ve UK grubunda en yüksek seviyeye gelerek kuvvetli pozitif (Resim 12B) olduğu saptandı. PEDF H-skor değerinin sham ($181\pm70,6$) ve kontrol ($183\pm40,2$) gruplarında benzer olduğu ($p>0,05$), OHSS grubunda oldukça düşük olduğu ($39,3\pm7,5$) ve bu değer kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farka sahip olduğu belirlendi ($p<0,0001$) (Tablo 16). PEDF immünoaktivitesi KK ve UK gruplarında sırasıyla $283\pm31,6$ ve $349\pm21,2$ olduğu ve kontrol grubundan anlamlı seviyede artış gösterdiği belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 16). OHSS grubuyla kıyaslandığında, sham, KK ve UK gruplarındaki H-skor değerlerinin anlamlı şekilde artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 16). UK grubundaki H-skor artışının KK grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 16).



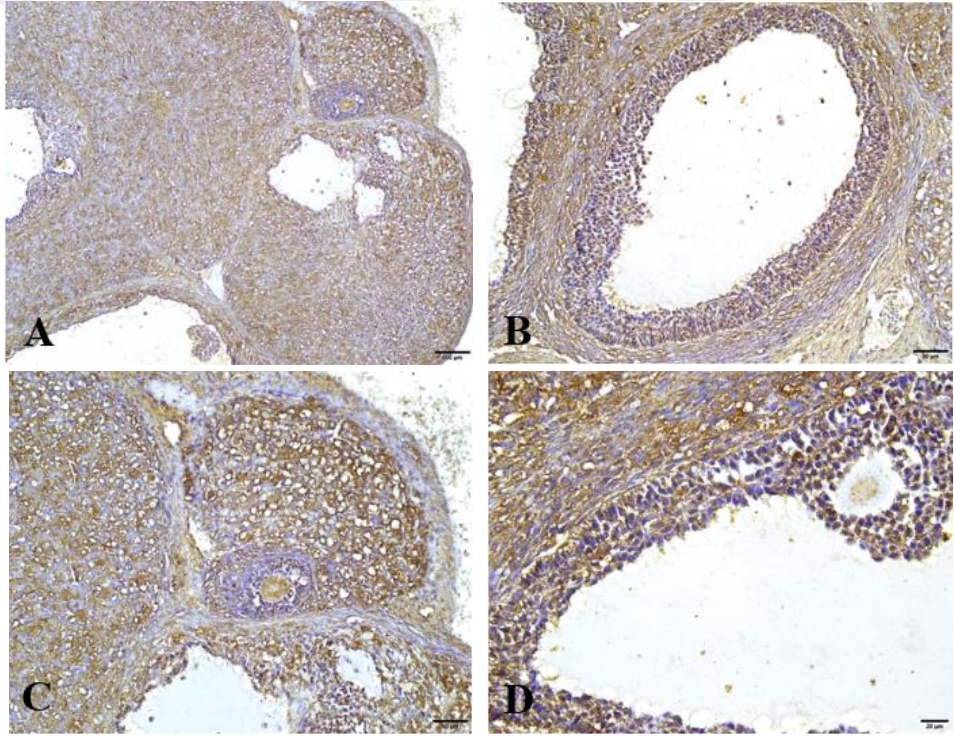
Resim 8. Sham grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



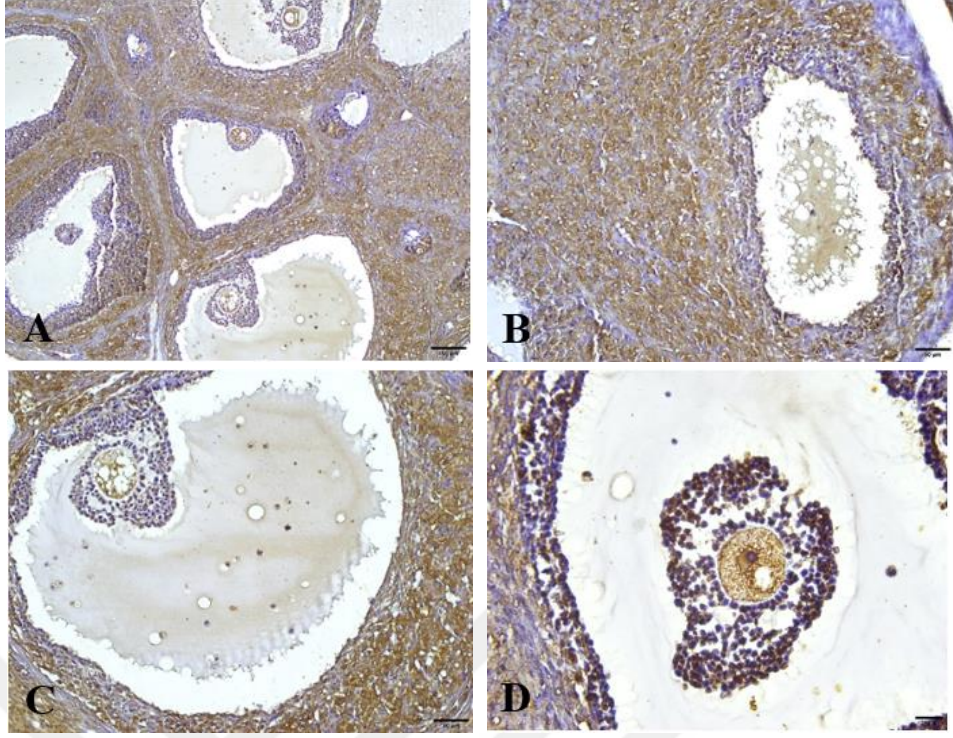
Resim 9. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 10. OHSS grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 11. KK grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 12. UK grubuna ait ovaryum dokularında PEDF immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100 μ m; B,C 50 μ m; D 20 μ m

Tablo 16. Tüm gruplara ait PEDF immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Primordiyal folikül	191 \pm 44,2 _a	196 \pm 44,7	47,4 \pm 5,7 ^{***}	381 \pm 8,87 ^{***} _a	369 \pm 11,9 ^{***} _a
Erken primer folikül	154 \pm 39,9 _a	146 \pm 36,3	34,9 \pm 11,1 ^{***}	363 \pm 41,7 ^{***} _a	367,7 \pm 15,3 ^{***} _a
Geç primer folikül	167 \pm 38,4 _a	115 \pm 55	79,8 \pm 33,7	238 \pm 56,8 ^{***} _a	383 \pm 16,9 ^{***} _{ax}
Sekonder folikül	188,6 \pm 48 _a	154 \pm 34,5	33,1 \pm 10,4 ^{**}	288 \pm 71,2 ^{***} _a	384 \pm 79 ^{***} _{ax}
Graaf folikül	317 \pm 30 _a	287 \pm 43,6	34,1 \pm 18,8 ^{***}	331 \pm 61,3 _a	350 \pm 35,1 [*] _a
Korpus hemorajikum	0 \pm 0	313 \pm 36,1	36,1 \pm 10,5 ^{***}	220 \pm 59,2 [*] _a	346,2 \pm 22,7 _{ax}
Korpus luteum	0 \pm 0	227 \pm 39,9	40,6 \pm 1,8 ^{***}	270 \pm 68,8 _a	375 \pm 20,8 [*] _{ax}
Atretik folikül	147 \pm 37,7 _a	199 \pm 54,8	19,5 \pm 7,84 ^{***}	265 \pm 65,7 [*] _a	366 \pm 23,4 ^{***} _{ax}
Kistik folikül	181 \pm 70,6 _a	183 \pm 40,2	39,3 \pm 7,5 ^{***}	283 \pm 31,6 ^{***} _a	349 \pm 21,2 ^{***} _{ax}

*: Kontrol grubuna göre kıyaslama *p<0,033, **p<0,002, ***p<0,0001. **a:** OHSS grubuna göre kıyaslama, a=p<0,05; **x:** KK grubuna göre kıyaslama, x=p<0,05

6.5.4.3. PKA

PKA immünoreaktivite dağılımları foliküller bazında değerlendirilmiş ve karşılaştırmaları Tablo 17’de verilmiştir.

Primordiyal folikül

PKA immünoreaktivitesinin sham (Resim 13B, C), kontrol ve UK gruplarında negatif, OHSS grubundaki bazı alanlarda kuvvetli pozitif iken çoğunlukla orta pozitif

ve KK grubunda zayıf pozitif olduğu saptandı. Primordiyal foliküllerdeki granüloza hücrelerinin gruplar arası PKA H-skor değerleri sham grubunda $54,8 \pm 18,55$ ve kontrol grubunda $53,5 \pm 27,2$ olarak hesaplandı ve bu gruplar arasında istatistiksel farkın olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Tablo 17). OHSS grubu H-skor değeri $297 \pm 53,33$ olarak hesaplandı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında OHSS grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p < 0,0001$) (Tablo 17). KK grubunda, $115,9 \pm 30,91$ olan H-skor değerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu ($p < 0,05$); OHSS grubundan ise istatistiksel olarak düşük olduğu ($p > 0,05$) gözlemlendi (Tablo 17). UK grubunda PKA H-skor değerinin kontrol grubundan az olduğu ($36,6 \pm 10,83$) ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Tablo 17). UK grubu OHSS ve KK grupları ile karşılaştırıldığında, UK grubunda bu iki gruba göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 17).

Erken primer folikül

PKA immünoaktivitesinin, OHSS grubunda kuvvetli pozitif olduğu (Resim 15D), kontrol (Resim 14D) ve UK (Resim 17B, C) gruplarında ise negatif olduğu saptandı. Sham (Resim 13B-D) ve KK gruplarında hem negatif hem de zayıf pozitif boyanmış alanlar izlendi. Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarının H-skor değerleri $99,8 \pm 31,6$, $24,7 \pm 22,8$, $351 \pm 27,3$, $92,5 \pm 31,5$ ve $28 \pm 18,5$ olarak hesaplandı (Tablo 17). H-skor sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sham, OHSS ve KK gruplarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede yükselme olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 17). UK grubu H-skor değerinin kontrol grubuna benzer olduğu gözlemlendi ($p > 0,05$) (Tablo 17). UK grubunda PKA yoğunluğunun OHSS ve KK gruplarından daha düşük olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 17).

Geç primer folikül

Geç primer foliküllerdeki granüloza hücrelerinin PKA immünoaktivitesinin, sham (Resim 13A-D) ve kontrol (Resim 14D) gruplarında negatif olduğu gözlemlenirken, KK (Resim 16D) ve UK gruplarında negatif ve zayıf pozitif alanlara rastlandı. OHSS grubu granüloza hücrelerindeki boyanmanın ise kuvvetli pozitif olduğu belirlendi. Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarının H-skor değerleri sırasıyla $36 \pm 19,9$, $74,2 \pm 35,4$, $343 \pm 42,2$, $94,7 \pm 23,1$ ve $88,5 \pm 7,96$ olarak hesaplandı (Tablo 17). Kontrol grubu ile kıyaslandığında yalnızca OHSS grubunda anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,0001$) (Tablo 17). Diğer grupların kontrol grubuna benzer H-skor değerlerine

sahip olduğu ve istatistiksel bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$) (Tablo 17). KK ve UK gruplarında ise OHSS grubuna göre belirgin bir azalma olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 17).

Sekonder folikül

Bu folikülde yer alan granüloza hücrelerinin sham grubunda negatif (Resim 13A-D), kontrol grubunda zayıf pozitif (Resim 14A, B, D), OHSS grubunda kuvvetli pozitif, KK (Resim 16A) ve UK gruplarında ise zayıf pozitif boyanma gösterdiği saptandı. Sham, kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarının H-skor değerleri sırasıyla $91,8\pm 21,2$, $114\pm 36,3$, $349\pm 27,8$, $175,8\pm 11,4$ ve $130,9\pm 5,8$ olarak hesaplandı (Tablo 17). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PKA yoğunluğunun sham ve UK gruplarında değişmediği ($p>0,05$) ve OHSS ve KK gruplarında arttığı ($p<0,05$) gözlemlendi (Tablo 17). OHSS grubu ile kıyaslandığında ise, PKA H-skor değerlerinin sham, KK ve UK gruplarında istatistiksel olarak azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 17).

Graaf folikülü

Sham ve kontrol (14C) gruplarında negatif alanlar ile zayıf pozitif alanların olduğu, OHSS grubunda kuvvetli pozitif bölgelerin olduğu (Resim 15A, B), KK ve UK gruplarında ise hem zayıf pozitif hem de orta pozitif boyanmalar olduğu saptandı. Kontrol grubunun H-skor değeri $97,4\pm 4,2$ olarak hesaplandı (Tablo 17). PKA H-skoru, OHSS grubunda 364 ± 13 , KK grubunda $202\pm 21,4$ ve UK grubunda $189\pm 22,9$ olarak belirlendi ve bu değerlerin kontrol grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 17). Sham grubu H-skor değerinin $77,1\pm 13,7$ olduğu ve kontrol grubu ile arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edildi ($p>0,05$) (Tablo 17). KK ve UK gruplarının PKA değerlerinin OHSS grubuna göre anlamlı seviyede azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 17).

Korpus hemorajikum

Sham grubunda korpus hemorajikum saptanamadığından bu grup, korpus hemorajikum VEGF H-skor değerlendirmesine katılamadı. VEGF boyanması kontrol grubunda orta pozitif, OHSS grubunda kuvvetli pozitif, KK (Resim 16A) ve UK gruplarında ise orta pozitif alanlar ile birlikte zayıf pozitif olarak tespit edildi. Granüloza hücrelerinin PKA H-skor değerleri kontrol grubunda $220\pm 32,9$, OHSS

grubunda $335,9 \pm 21,76$ olarak hesaplandı ve aralarında istatistiksel farkın olduğu saptandı ($p < 0,0001$) (Tablo 17). KK grubu H-skor değerinin $154,2 \pm 14,37$ ve UK grubu H-skor değerinin ise $119,5 \pm 5,9$ olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı seviyede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 17). KK ve UK gruplarında OHSS grubuna göre de belirgin bir azalma tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 17). UK grubundaki PKA yoğunluk düşüşünün KK grubundan anlamlı seviyede fazla olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 17).

Korpus luteum

Sham grubunda hiç korpus luteum saptanamadığından bu grup bu değerlendirmeye dahil edilemedi. PKA boyanmasının, kontrol (Resim 14A), KK (Resim 16A, B) ve UK (Resim 17A, C) gruplarında zayıf pozitif iken, OHSS grubunda kuvvetli pozitif (Resim 15A, C) olduğu tespit edildi. Kontrol, OHSS, KK ve UK gruplarına ait H-skor değerleri sırasıyla 127 ± 34 , 338 ± 17 , 179 ± 22 ve 148 ± 14 olarak hesaplandı (Tablo 17). Kontrol grubuna göre OHSS grubu PKA H-skor değerlerinin OHSS grubunda anlamlı olarak arttığı ($p < 0,0001$) (Tablo 17); KK ve UK gruplarında ise anlamlı seviyede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 17). KK ve UK gruplarında OHSS grubuna göre de belirgin bir azalma tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 17). UK grubunun KK grubundan daha belirgin bir immünoreaktivite kaybına sahip olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 17).

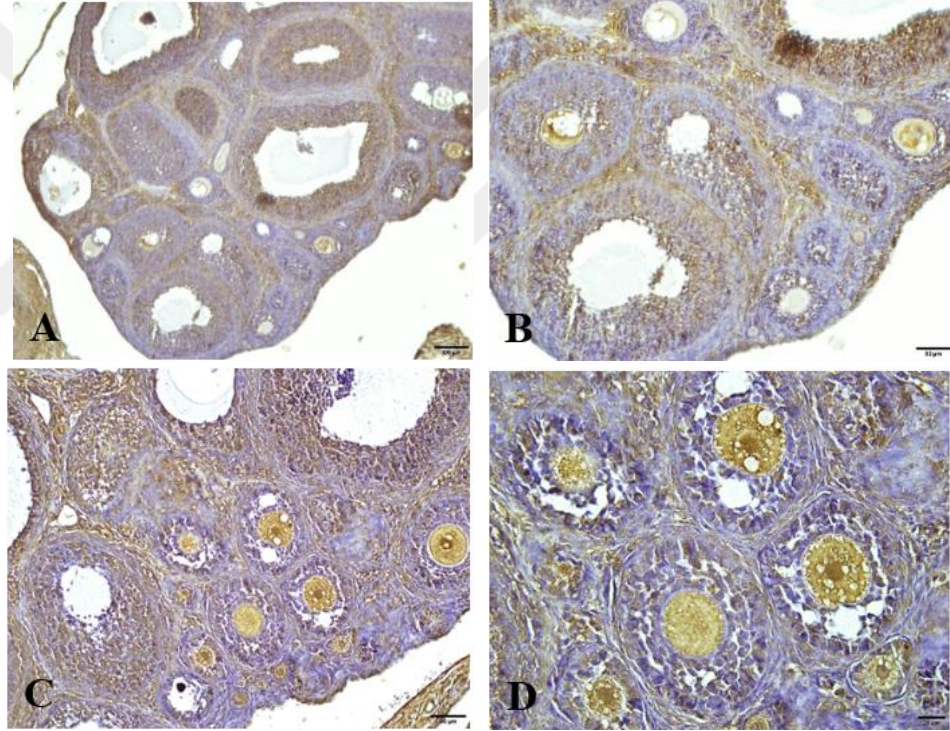
Atretik folikül

Sham grubu granüloza hücrelerinin negatif, kontrol grubu hücrelerinin zayıf pozitif, OHSS grubunun kuvvetli pozitif ve KK ve UK gruplarının orta pozitif boyandığı gözlemlendi. Atretik foliküllerdeki PKA H-skor değeri, kontrol grubuna göre ($132 \pm 28,4$), sham grubunda anlamlı olarak azalırken ($50 \pm 18,4$, $p < 0,0001$) (Tablo 17); OHSS ($330,1 \pm 33,7$), KK ($213,9 \pm 6,3$) ve UK ($233,6 \pm 2,2$) gruplarında anlamlı seviyede arttı ($p < 0,05$) (Tablo 17). OHSS, KK ve UK grupları kendi içlerinde kıyaslandığında, KK ve UK gruplarında PKA yoğunluğunun OHSS grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 17). En belirgin fark sham grubu ile OHSS grubu arasında belirlendi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 17).

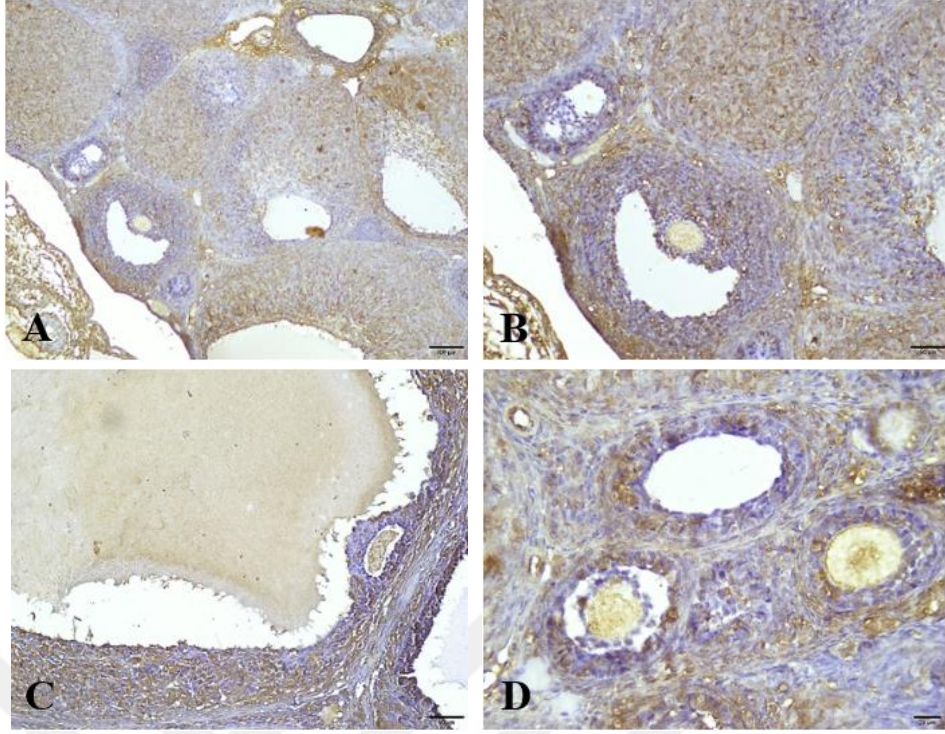
Kistik Folikül

Kistik foliküllerdeki en düşük boyanma kontrol grubunda (Resim 14A), en yüksek boyanma ise OHSS grubunda (Resim 15A, C) gözlemlendi. Sham grubunda zayıf pozitif

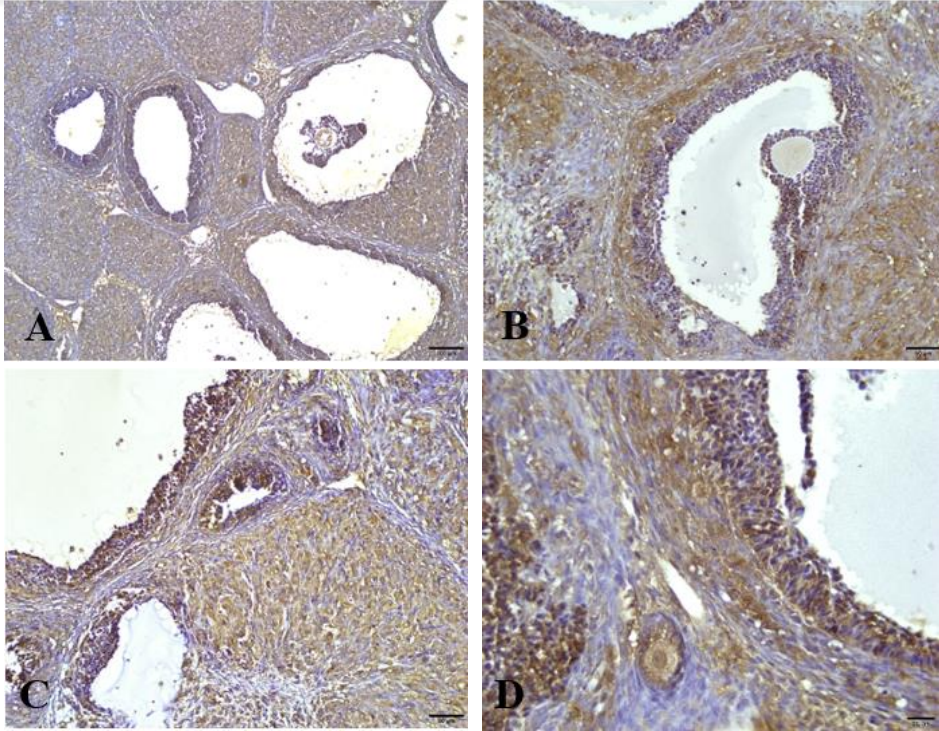
(Resim 13A), kontrol grubunda negatif, OHSS grubunda kuvvetli pozitif, KK grubunda zayıf pozitif ve UK grubunda orta pozitif (Resim 17A, B) boyanmalar saptandı. Kontrol grubu ($50,6 \pm 12,8$) ile karşılaştırıldığında, atretik foliküllerdeki PKA H-skor değerinin sham (103 ± 24), OHSS ($335 \pm 31,2$), KK ($169,4 \pm 71,9$) ve UK ($209,1 \pm 39,8$) gruplarında anlamlı seviyede arttığı belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 17). OHSS, KK ve UK grupları kendi içlerinde kıyaslandığında, KK ve UK gruplarında PKA yoğunluğunun OHSS grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 17). Sham grubu PKA immünoaktivitesinin OHSS grubundan oldukça düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 17).



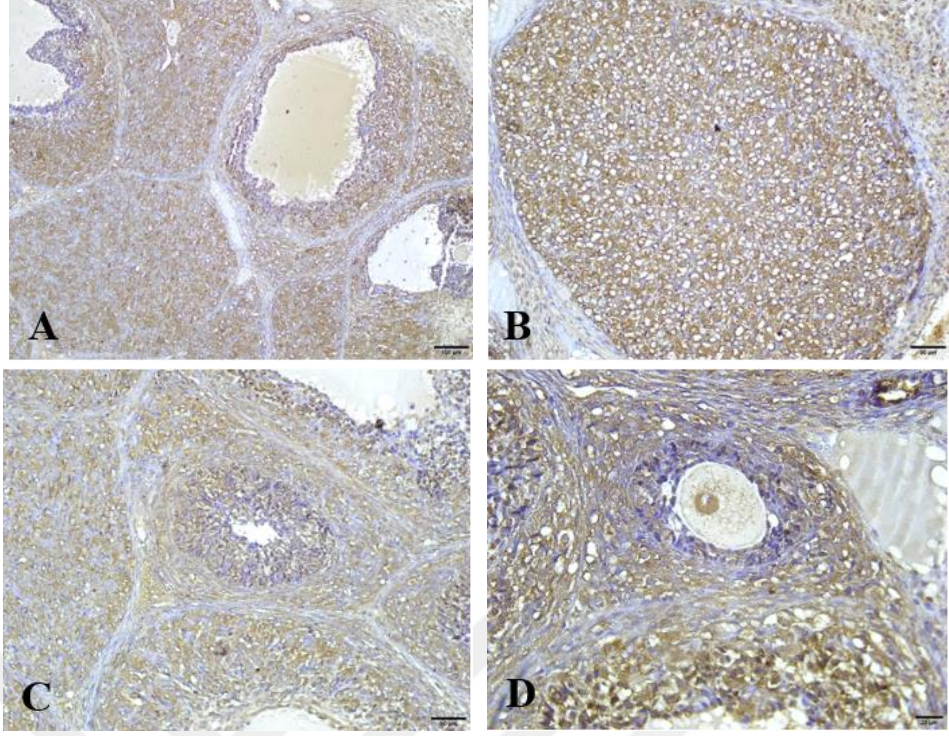
Resim 13. Sham grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A $100\mu\text{m}$; B,C $50\mu\text{m}$; D $20\mu\text{m}$



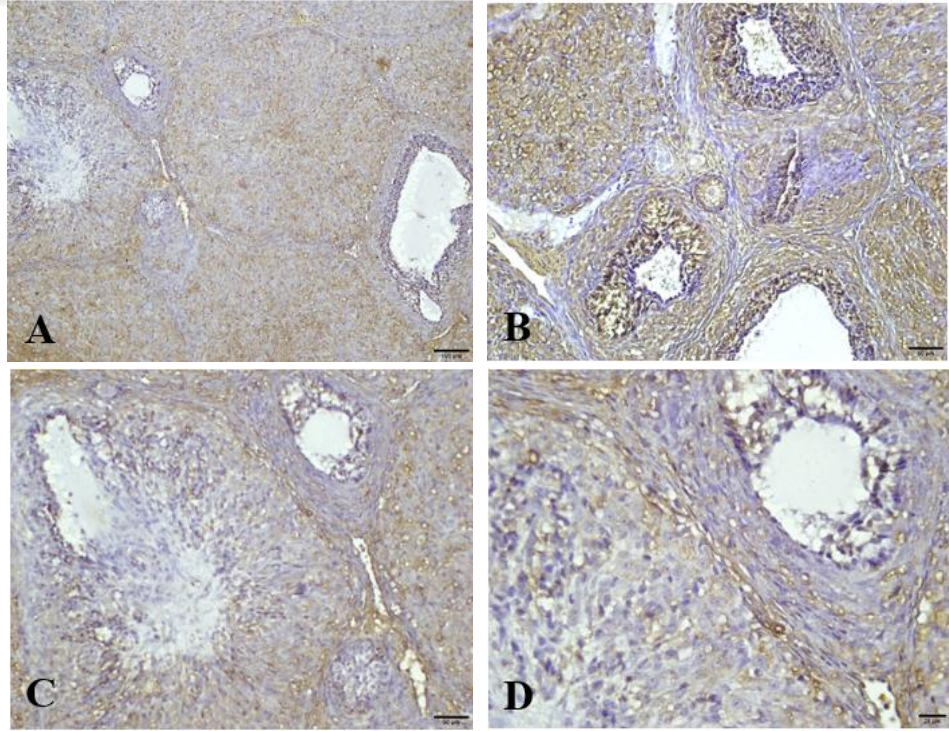
Resim 14. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 15. OHSS grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 16. KK grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100 μ m; B,C 50 μ m; D 20 μ m



Resim 17. UK grubuna ait ovaryum dokularında PKA immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100 μ m; B,C 50 μ m; D 20 μ m

Tablo 17. Tüm gruplara ait PKA immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Primordiyal folikül	54,8 \pm 18,55	53,5 \pm 27,25	297,7 \pm 53,33***	115,9 \pm 30,91 ^a	36,6 \pm 10,83 _{a,x}
Erken primer folikül	99,8 \pm 31,6 ^a	24,7 \pm 22,8	351 \pm 27,3***	92,5 \pm 31,5 ^a	28 \pm 18,5 _{ax}
Geç primer folikül	36 \pm 19,9	74,2 \pm 35,4	343 \pm 42,2***	94,7 \pm 23,1 ^a	88,5 \pm 7,96 _a
Sekonder folikül	91,8 \pm 21,2 _a	114 \pm 36,3	349 \pm 27,8***	175,8 \pm 11,4 ^a	130,9 \pm 5,8 _{ax}
Graaf folikül	77,1 \pm 13,7 _a	97,4 \pm 4,2	364 \pm 13***	202 \pm 21,4 ^a	189 \pm 22,9 ^a
Korpus hemorajikum	0 \pm 0	220 \pm 32,9	335,9 \pm 21,76***	154,2 \pm 14,37 ^a	119,5 \pm 5,9 ^{ax}
Korpus luteum	0 \pm 0	127 \pm 34	338 \pm 17***	179 \pm 22 ^a	148 \pm 14 ^{ax}
Atretik folikül	50 \pm 18,4 ^{ax}	132 \pm 28,4	330,1 \pm 33,7 ^{ax}	213,9 \pm 6,3 ^a	233,6 \pm 2,2 ^a
Kistik folikül	103 \pm 24 ^a	50,6 \pm 12,8	335 \pm 31,2***	169,4 \pm 71,9 ^a	209,1 \pm 39,8 ^a

*: Kontrol grubuna göre kıyaslama *p<0,033, **p<0,002, ***p<0,0001. **a**: OHSS grubuna göre kıyaslama, a=p<0,05; **x**: KK grubuna göre kıyaslama, x=p<0,05

6.5.4.4. PKC

PKC immünoreaktivite dağılımları foliküller bazında değerlendirilmiş ve karşılaştırmaları Tablo 18’de verilmiştir.

Primordiyal folikül

Gruplar arası PKC sonuçlarına göre, sham (Resim 18B-D) ve kontrol (Resim 19C, D) gruplarına ait primordiyal foliküllerdeki granüloza hücrelerinde kuvvetli pozitif

boyanma gözlemlendi. OHSS grubunda orta pozitif alanlar ile zayıf pozitif alanların varlığı belirlendi. KK ve UK (Resim 22B) gruplarında orta ve kuvvetli pozitif boyanan alanlar tespit edildi. H-skor sonuçları sham grubunda $330,1 \pm 29,93$, kontrol grubunda $372,8 \pm 16,59$, OHSS grubunda $192,3 \pm 30,74$, KK grubunda $276,9 \pm 25,16$ ve UK grubunda $289,7 \pm 19,78$ olarak hesaplandı (Tablo 18). Kontrol grubu ile kıyaslandığında, sham grubunda herhangi bir fark olmadığı ($p > 0,05$) (Tablo 18), OHSS, KK ve UK gruplarında immünoreaktivitenin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 18). OHSS grubunun H-skor derecesi sham grubuna göre de anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 18). Kisspeptin verilen KK ve UK grupları kontrol grubuna göre daha düşük H-skor değerine sahipken ($p < 0,05$) (Tablo 18), bu değer OHSS grubuna göre arttığı ve bu artışın anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 18).

Erken primer folikül

Kontrol grubunda PKC immünoreaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu (Resim 19C, D); sham (Resim 18C, D), OHSS, KK ve UK gruplarında ise orta pozitif boyanmaların olduğu belirlendi. Sham grubunda PKC H-skor değerinin $249,3 \pm 20,04$, kontrol grubunda ise $369 \pm 49,99$ olduğu ve bu iki grup arasında anlamlı bir farkın bulunduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 18). OHSS ($206,6 \pm 15,74$), KK ($264,1 \pm 18,69$) ve UK ($293,4 \pm 16,25$) gruplarındaki H-skor derecesinin kontrol grubuna göre anlamlı seviyede azaldığı saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 18). OHSS grubuna göre kıyaslama yapıldığında, KK ve UK gruplarında PKC seviyesinin arttığı belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 18). UK grubunun ise KK grubundan daha yüksek boyanma şiddetine sahip olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 18).

Geç primer folikül

Geç primer foliküllere ait granüloza hücreleri incelendiğinde, sham (Resim 18B), kontrol (Resim 19C), KK (Resim 21C) ve UK (Resim 22A, C) gruplarında orta pozitif alanlar ile yer yer kuvvetli pozitif alanlar da saptandı. OHSS grubunda zayıf ile orta pozitif alanlar izlendi (Resim 20B). Sham ve kontrol gruplarında yüksek PKC H-skor değeri belirlendi (sırasıyla $282,6 \pm 34,62$ ve $265,4 \pm 39,94$) ve bu iki grup arasında bir farka rastlanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 18). OHSS grubunda H-skor değerinin $176,7 \pm 12,56$ olduğu ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulundu ($p < 0,002$) (Tablo 18). KK ve UK gruplarındaki PKC H-skor değerleri

sırasıyla $217,5 \pm 14,58$ ve $209,7 \pm 23,84$ şeklinde hesaplandı ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalma gösterirken ($p < 0,05$), OHSS grubuna kıyasla anlamlı artış gösterdiği saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 18). KK ve UK grupları arasında istatistiksel bir fark belirlenemedi ($p < 0,05$) (Tablo 18).

Sekonder folikül

Granüloza hücrelerindeki boyanmanın kontrol (Resim 19A-D), OHSS (Resim 20C) ve KK (Resim 21B) gruplarında orta pozitif olduğu belirlendi. Sham (Resim 18A-D) ve UK (Resim 22B) gruplarında ise zayıf pozitif ile yer yer orta pozitif olarak izlendi. Kontrol ($210,3 \pm 16,73$) ve sham ($197,6 \pm 17,6$) gruplarındaki sekonder foliküllerde PKC H-skor değerleri arasında bir fark saptanamadı ($p < 0,05$) (Tablo 18). OHSS grubundaki boyanma seviyesinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği ($271,4 \pm 39,36$) ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 18). KK grubu ile kontrol grubu arasında bir fark olmazken ($226,8 \pm 28,59$, $p > 0,05$), OHSS grubuna göre anlamlı bir düşüş belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 18). UK grubundaki PKC H-skor değerinin ($181,5 \pm 24$) kontrol grubundan daha düşük olduğu ve bu düşüşün anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 18). OHSS ve KK gruplarına göre UK grubunda belirgin bir azalma olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 18).

Graaf folikül

Sham grubunun zayıf pozitif PKC boyanmasına sahip olduğu belirlendi (Resim 18A). Kontrol (Resim 19A, C), KK (Resim 21A, D) ve UK (Resim 22D) gruplarında PKC seviyesinin orta pozitif olduğu, ancak KK ve UK gruplarında yer yer kuvvetli pozitif alanların da var olduğu saptandı. OHSS grubunda yer alan granüloza hücrelerinde kuvvetli pozitif boyanan alanlar izlendi (Resim 20A). H-skor sonuçları değerlendirildiğinde, sham grubunda ($146,8 \pm 10,24$) kontrol grubuna ($212,9 \pm 24,2$) göre anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 18). OHSS grubundaki PKC H-skor değerinin ($340 \pm 42,3$) kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($p > 0,05$) (Tablo 18). KK ve UK gruplarındaki PKC H-skor değerinin sırasıyla $284,5 \pm 23,58$ ve $259,2 \pm 33,6$ olduğu ve kontrol grubuna göre artış gösterdiği ($p < 0,05$), OHSS grubuna göre ise azaldığı belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 18). Ayrıca, UK grubunun KK grubundan anlamlı derecede daha düşük değere sahip olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 18).

Korpus hemorajikum

Sham grubu ovaryumlarında korpus hemorajikuma rastlanmadı. Bu nedenle bu grup istatistiksel hesaba dahil edilemedi. Gruplardaki granüloza hücrelerinin boyanma dereceleri kontrol grubunda zayıf pozitif, OHSS grubunda kuvvetli pozitif, KK ve UK gruplarında orta pozitif olarak izlendi. Kontrol grubu H-skor değeri $176,4 \pm 18,81$ olarak hesaplandı (Tablo 18). PKC H-skor değerinin, OHSS grubunda $325,8 \pm 33,9$, KK grubunda $216,1 \pm 31,8$ ve UK grubunda $221 \pm 17,21$ olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdiği, en yüksek farkın ise OHSS grubuna ait olduğu belirlendi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$) (Tablo 18). KK ve UK gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülürken ($p < 0,05$) (Tablo 18); OHSS grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 18). KK ve UK grupları arasında ise PKC seviyesi bakımından herhangi bir farka rastlanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 18).

Korpus luteum

Sham grubuna ait ovaryumlarda korpus luteuma rastlanmadı ve bu nedenle bu grup istatistiksel analize dahil edilemedi. Kontrol grubuna ait ovaryumlarda yer alan graaf foliküllerde PKC immünoaktivitesinin zayıf pozitif olduğu tespit edildi (Resim 19A). OHSS grubunda bu değer kuvvetli pozitif olduğu saptandı (Resim 20B-D). KK (Resim 21B) ve UK (Resim 22A, C) gruplarında orta pozitif boyanma izlendi. H-skor değerleri kontrol grubunda $127,3 \pm 17,3$, OHSS grubunda $350,4 \pm 22,63$, KK grubunda $265,2 \pm 36,92$ ve UK grubunda $215,6 \pm 17,71$ olarak belirlendi (Tablo 18). H-skor sonuçları değerlendirildiğinde, OHSS grubundaki boyanma seviyesinin kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p < 0,0001$) (Tablo 18). KK grubu analiz edildiğinde, bu grupta da kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 18) ancak OHSS grubuna göre PKC seviyesinin azaldığı saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 18). UK grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir artışın olduğu ($p < 0,05$) (Tablo 18), ancak hem OHSS hem de KK grubuna göre belirgin bir azalmanın varlığı da saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 18).

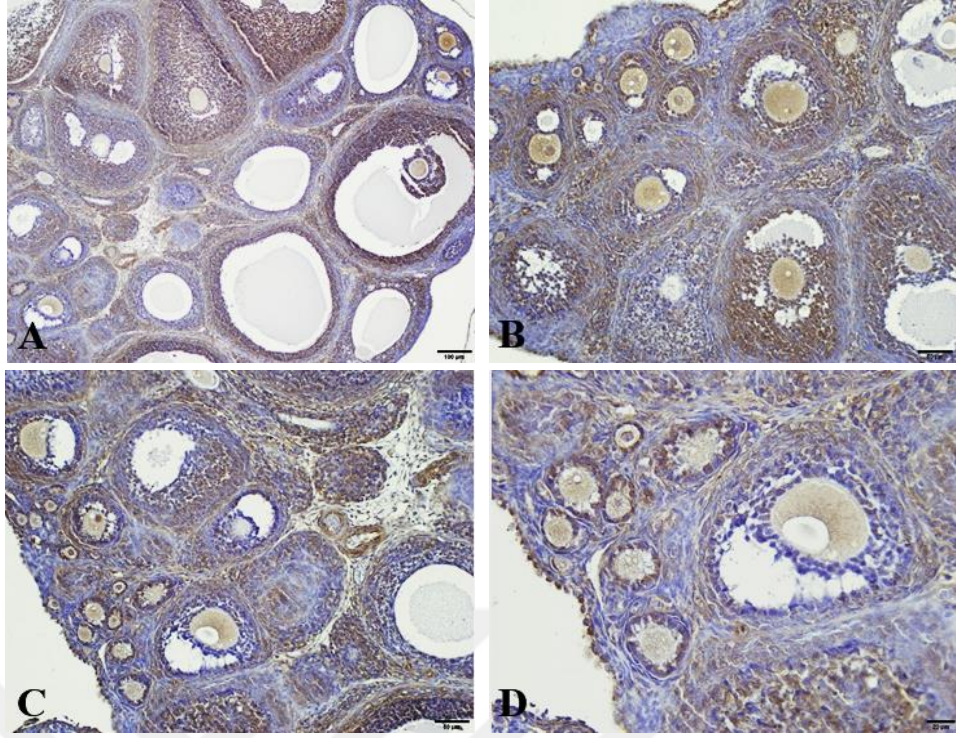
Atretik folikül

Atretik foliküllerde bulunan granüloza hücrelerinin, sham grubunda bazı alanlarda zayıf pozitif bazı alanlarda ise orta pozitif boyanmaya sahip olduğu belirlendi ve H-skor değeri $176,3 \pm 20,7$ olarak hesaplandı (Tablo 18). Kontrol, KK ve UK gruplarında

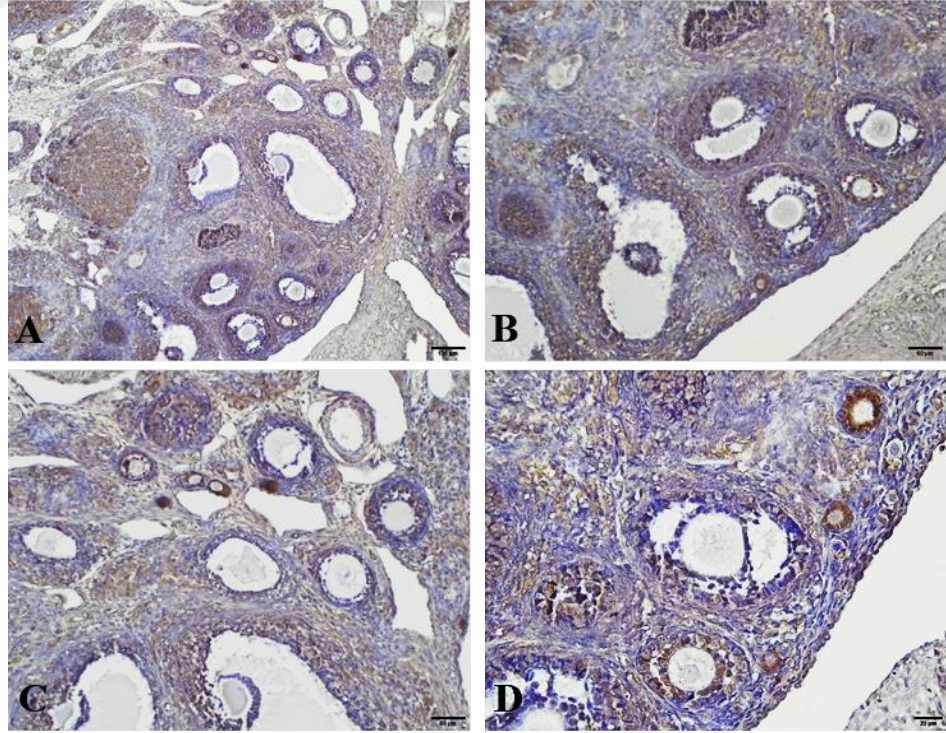
bu boyanmanın orta pozitif olduğu ve H-skor değerlerinin sırasıyla 209,9±29,6, 231,5±28,62 ve 239,9±19,13 olduğu (Tablo 18), OHSS grubunda ise en yüksek değere ulaşarak kuvvetli pozitif olduğu ve H-skor değerinin 362,9±25,29'a yükseldiği belirlendi (Tablo 18). Sham grubundaki atretik foliküllerde PKC H-skor değeri kontrol grubuna benzer bulundu ($p>0,05$) (Tablo 18). OHSS grubunda H-skor değerinin kontrol grubuna oranla arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p<0,0001$) (Tablo 18). KK ve UK gruplarında PKC ifadesinin, kontrol grubuna göre artarken, OHSS grubuna göre azaldığı tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 18).

Kistik folikül

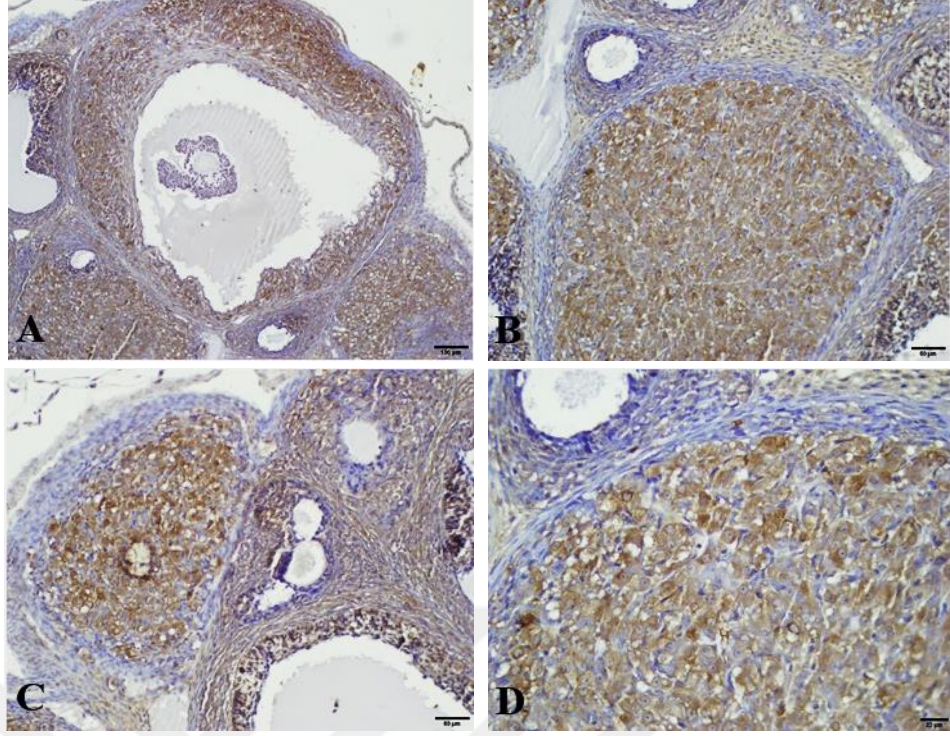
İmmünoreaktivite değerlendirildiğinde PKC boyamasının sham grubunda hem zayıf pozitif hem de orta pozitif olduğu (Resim 18A), kontrol ve UK (Resim 22A, B) gruplarında orta pozitif olduğu ve OHSS grubunda kuvvetli pozitif olduğu saptandı. KK grubu incelendiğinde orta pozitif hücrelere eşlik eden çok sayıda kuvvetli pozitif hücrenin varlığı izlendi (Resim 21C). Sham grubundaki kistik foliküllerde PKC H-skor değeri (199,1±16,85) kontrol grubuna (211,2±41,55) benzer bulundu ($p>0,05$) (Tablo 18). OHSS grubunda bu değer (383,4±29,74) kontrol grubuna oranla arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu belirlendi ($p<0,0001$) (Tablo 18). KK ve UK gruplarında PKC ifadesinin 288,7±28,29 ve 220,4±29,04 olduğu ve kontrol grubuna göre artarken, OHSS grubuna göre düştüğü gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 18). UK grubundaki düşüşün, KK grubundan daha yüksek olduğu ve bu iki grup arasında da anlamlı bir fark bulunduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 18).



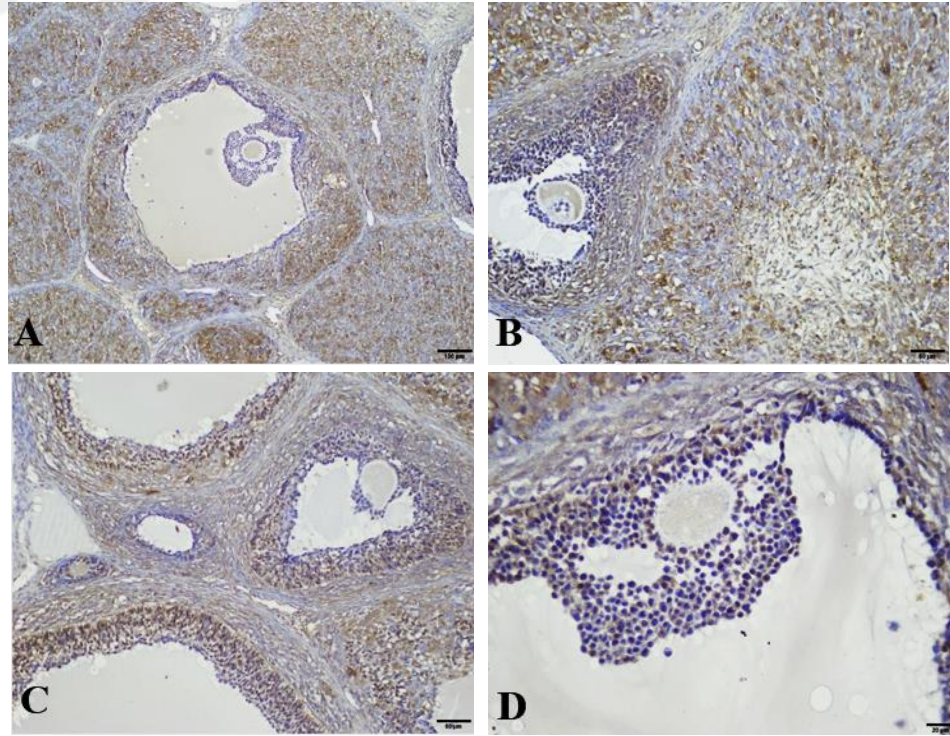
Resim 18. Sham grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



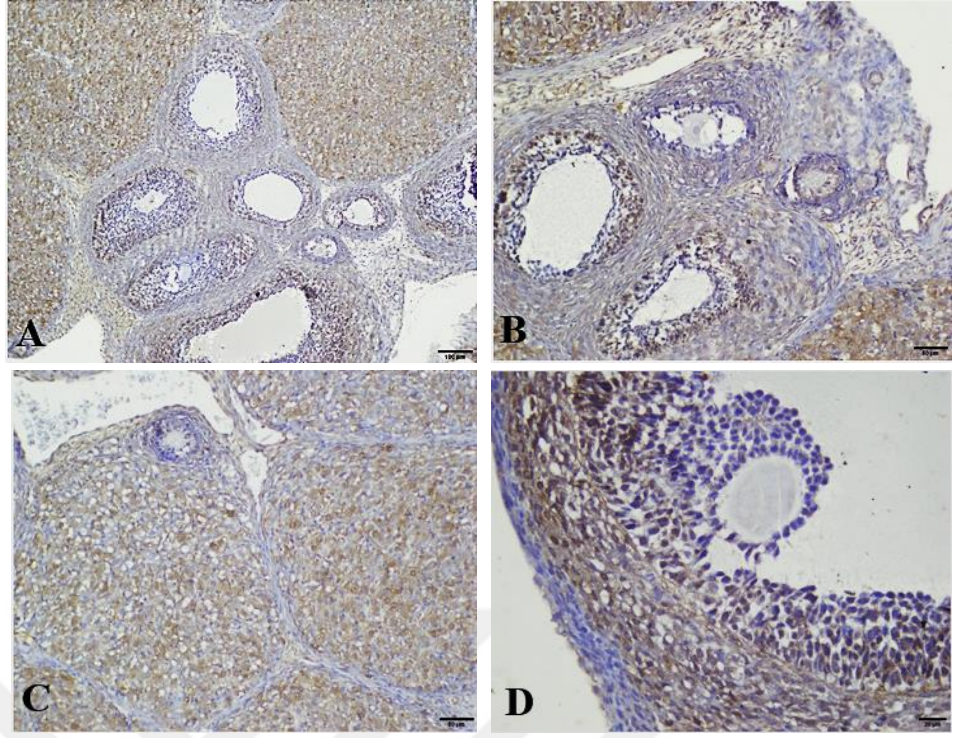
Resim 19. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 20. OHSS grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 21. KK grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100µm; B,C 50µm; D 20µm



Resim 22. UK grubuna ait ovaryum dokularında PKC immünohistokimyasal analiz görüntüleri. Ölçek A 100 μ m; B,C 50 μ m; D 20 μ m

Tablo 18. Tüm gruplara ait PKC immünohistokimyasal H-skor sonuçları (ortalama ± std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
Primordiyal folikül	330,1±29,93 _a	372,8±16,59	192,3±30,74*	276,9±25,16* _a	289,7±19,78* _a
Erken primer folikül	249,3±20,04* _a	369±49,99	206,6±15,74***	264,1±18,69* _a	293,4±16,25* _{ax}
Geç primer folikül	282,6±34,62 _a	265,4±39,94	176,7±12,56**	217,5±14,58* _a	209,7±23,84* _a
Sekonder folikül	197,6±17,6 _a	210,3±16,73	271,4±39,36*	226,8±28,59 _a	181,5±24* _{ax}
Graaf folikül	146,8±10,24* _a	212,9±24,2	340±42,3**	284,5±23,58* _a	259,2±33,6* _{ax}
Korpus hemorajikum	0±0	176,4±18,81	325,8±33,9***	216,1±31,8* _a	221±17,21* _a
Korpus luteum	0±0	127,3±17,3	350,4±22,63***	265,2±36,92* _a	215,6±17,71* _{ax}
Atretik folikül	176,3±20,7 _a	209,9±29,6	362,9±25,29**	231,5±28,62* _a	239,9±19,13* _a
Kistik folikül	199,1±16,85 _a	211,2±41,55	383,4±29,74**	288,7±28,29*	220,4±29,04* _{ax}

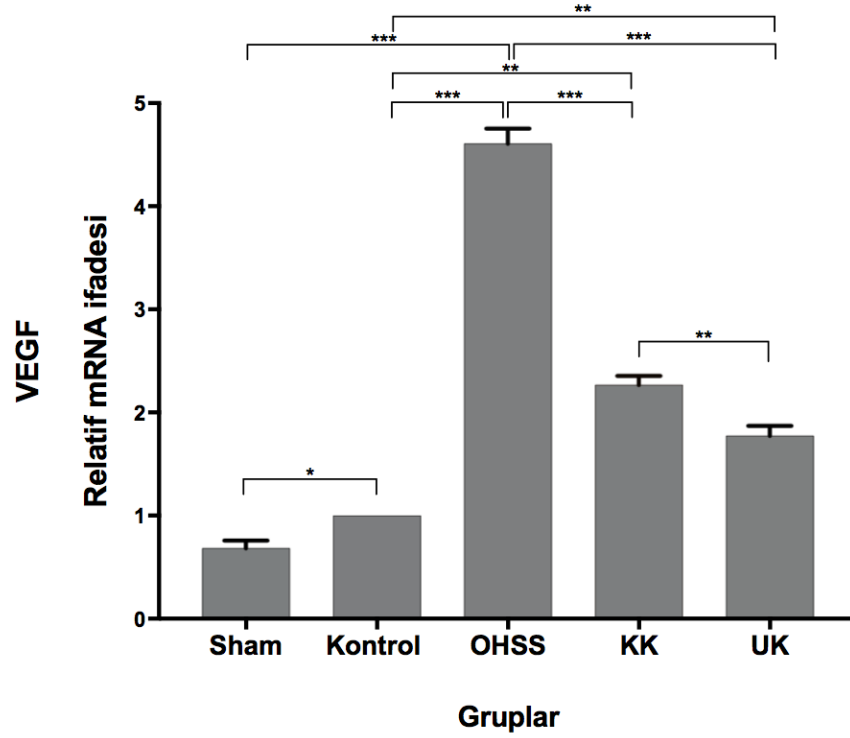
*: Kontrol grubuna göre kıyaslama *p<0,033, **p<0,002, ***p<0,0001. **a:** OHSS grubuna göre kıyaslama, a=p<0,05; **x:** KK grubuna göre kıyaslama, x=p<0,05

6.6. GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN qRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

qRT-PCR işleminin sonunda gen ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerin analizi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı. Veriler, GAPDH referans genine göre normalize edildi ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Bu yöntemle göre kontrol grubu gen ifadesi 1 olarak alındı. Gruplar arası karşılaştırma için ANOVA testi; çoklu karşılaştırma için ise Tukey Testi kullanıldı. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6.6.1. VEGF Bulguları

Sol ovaryumdan toplanan granüloza hücrelerindeki VEGF mRNA ifadesinin belirlenmesi için qRT-PCR yöntemi kullanıldı. Analiz sonuçlarına göre sham grubunun VEGF ifadesi $0,685 \pm 0,07$ idi. Bu ifadenin kontrol grubuna göre daha az olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p=0,041$) (Şekil 14, Tablo 19). OHSS grubunda VEGF ifadesinin 4,6 kat artış gösterdiği ($4,608 \pm 0,15$) ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0,001$) (Şekil 14, Tablo 19). KK grubundaki VEGF ifadesinin kontrol grubuna kıyasla 2,2 kat artış gösterirken ($2,267 \pm 0,08$) ($p=0,025$) (Tablo 19), OHSS grubuna kıyasla azaldığı (Tablo 19) ve bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p=0,025$ ve $p=0,001$) (Şekil 14, Tablo 19). VEGF ifadesinin, UK grubunda kontrol grubuna göre 1,7 kat arttığı ($1,775 \pm 0,09$) (Tablo 19), OHSS grubuna göre ise azaldığı (Tablo 19) ve bu ifadelerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,019$ ve $p=0,001$) (Şekil 14, Tablo 19). KK ve UK grupları kendi aralarında kıyaslandığında, VEGF seviyesinin, KK grubunda daha yüksek olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,029$) (Şekil 14, Tablo 19).



Şekil 14. Tüm gruplara ait VEGF Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. $P<0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * $p<0,033$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0001$

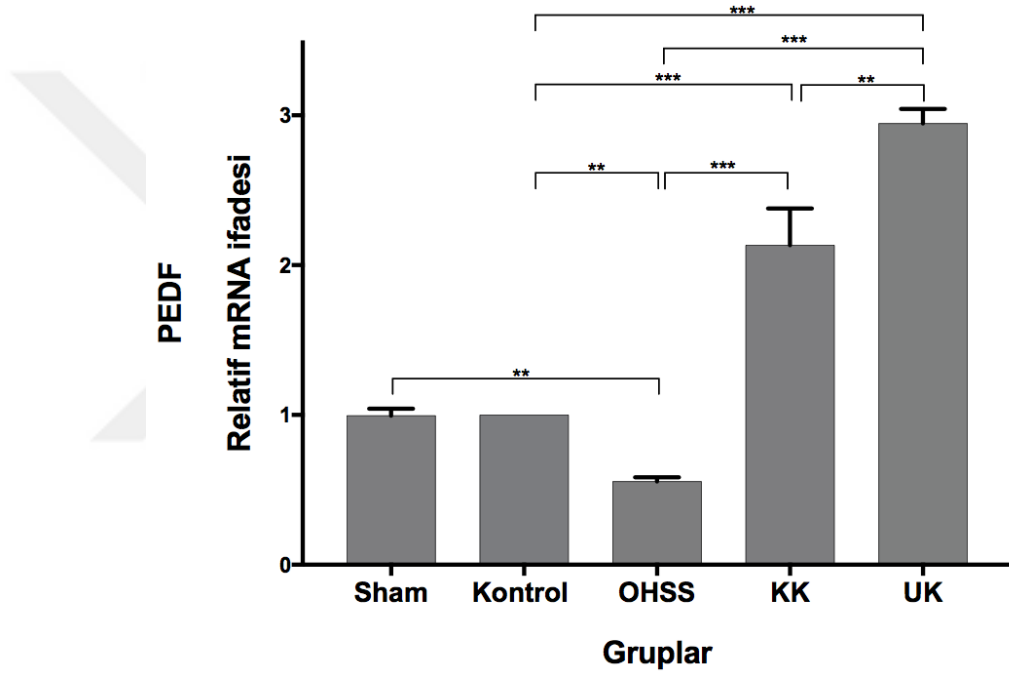
Tablo 19. Tüm gruplara ait VEGF relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
VEGF Relatif mRNA ifadesi	0,685±0,07	1±0	4,608±0,15	2,267±0,08	1,775±0,09

6.6.2. PEDF Bulguları

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, PEDF ifadesinin, sham grubu hariç tüm gruplarda artış gösterdiği belirlendi (Şekil 15, Tablo 20). Sham grubunda PEDF ifadesinin kontrol grubuna nazaran daha az olduğu ($0,995\pm0,04$) (Tablo 20) fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Şekil 15, Tablo 20). OHSS grubunun PEDF ifadesinin, kontrol grubuna göre yaklaşık 1,8 kat azalma gösterdiği ($0,555\pm0,03$) (Tablo 20) ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,0001$) (Şekil 15). KK grubunun PEDF ifadesi, kontrol grubuna oranla

yaklaşık 2 kat artarken ($2,133 \pm 0,24$, $p=0,001$), OHSS grubuna oranla yaklaşık 4 kat arttığı ($p=0,001$) (Şekil 15, Tablo 20) ve bu sonuçların anlamlı olduğu bulundu (Şekil 15). UK grubunun PEDF ifadesinin kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat ($2,946 \pm 0,1$, $p=0,001$) (Şekil 15, Tablo 20), OHSS grubuna göre ise yaklaşık 5 kat arttığı (Tablo 20) ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0,001$) (Şekil 15). KK ve UK grupları kıyaslandığında, UK grubundaki PEDF ifadesinin, KK grubuna göre yaklaşık 1 kat fazla olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0,025$) (Şekil 15, Tablo 20).



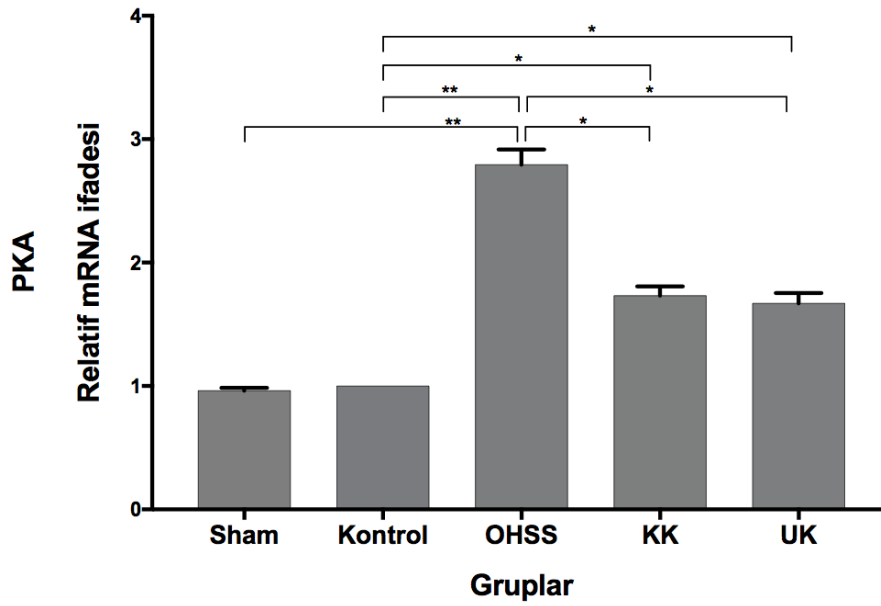
Şekil 15. Gruplara ait PEDF Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. $P < 0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0001$

Tablo 20. Tüm gruplara ait PEDF relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
PEDF Relatif mRNA ifadesi	0,995 \pm 0,04	1 \pm 0	0,555 \pm 0,03	2,133 \pm 0,24	2,946 \pm 0,1

6.6.3. PKA Bulguları

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, PKA ifadesinin, OHSS grubunda yaklaşık 3 kat ($2,973 \pm 0,12$) (Tablo 21); KK grubunda yaklaşık 1,8 kat ($1,755 \pm 0,07$) (Tablo 21) ve UK grubunda 1,7 kat ($1,754 \pm 0,08$) (Tablo 21) artış gösterdiği ve bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,023$; $p=0,032$; $p=0,037$) (Şekil 16). Sham grubunun PKA seviyesi, kontrol grubuna oldukça benzer idi ($0,984 \pm 0,02$) (Tablo 21) ve anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,75$) (Şekil 16). KK ve UK gruplarının PKA ifadelerinin OHSS grubuna oranla azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak farklı olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,049$, $p=0,043$) (Şekil 16, Tablo 21). KK ve UK grupları arasında PKA gen ifadesinde istatistiksel bir fark belirlenemedi ($p=0,455$) (Tablo 21 ve Şekil 16).



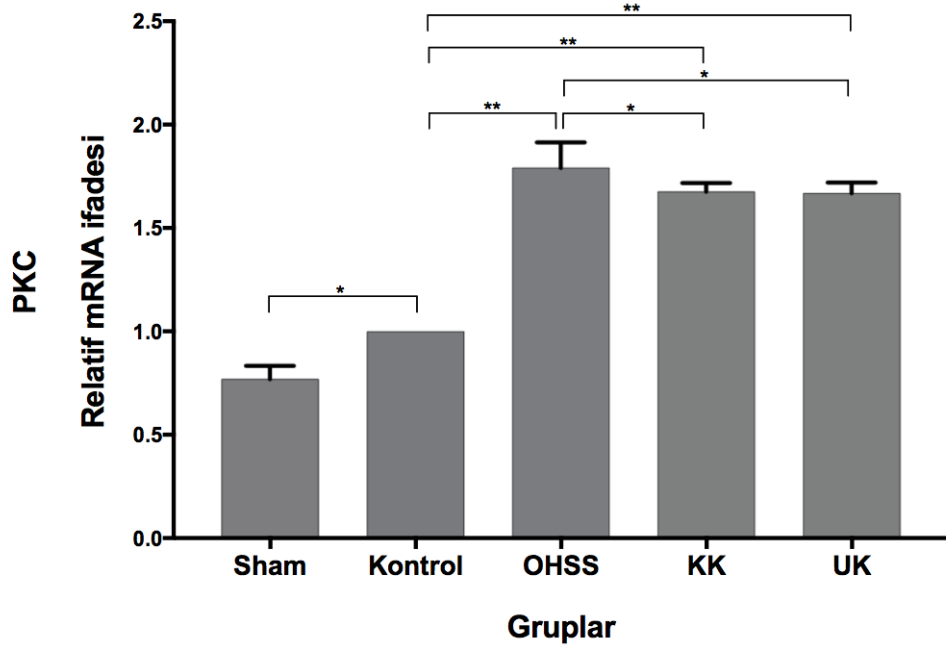
Şekil 16. Gruplara ait PKA Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. $P < 0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * $p < 0,033$, ** $p < 0,002$

Tablo 21. Tüm gruplara ait PKA relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
PKA Relatif mRNA ifadesi	0,984 \pm 0,02	1 \pm 0	2,973 \pm 0,12	1,755 \pm 0,07	1,754 \pm 0,08

6.6.4. PKC Bulguları

Sham grubu PKC ifadesinin kontrol grubuna göre yaklaşık 1,2 kat az olduğu (0,834 \pm 0,06) ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu belirlendi (p=0,037) (Şekil 17, Tablo 22). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PKC ifadesinin, OHSS grubunda yaklaşık 1,9 kat (1,888 \pm 0,12), KK grubunda 1,7 kat (1,716 \pm 0,04) ve UK grubunda da yaklaşık 1,7 kat (1,683 \pm 0,05) arttığı, bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla p= 0,008, p=0,004 ve p=0,007) (Şekil 17, Tablo 22). OHSS grubunun PKC seviyesinin, KK ve UK gruplarına göre anlamlı oranda yükseldiği belirlendi (sırasıyla p=0,043, p=0,038) (Şekil 17, Tablo 22). PKC mRNA seviyesi UK grubunda KK grubundan daha düşük olmasına rağmen, bu iki grup arasında istatistiksel fark olmadığı saptandı (p=0,999) (Şekil 17, Tablo 22).



Şekil 17. Gruplara ait PKC Relatif mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. $P<0,05$ 'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * $p<0,033$, ** $p<0,002$

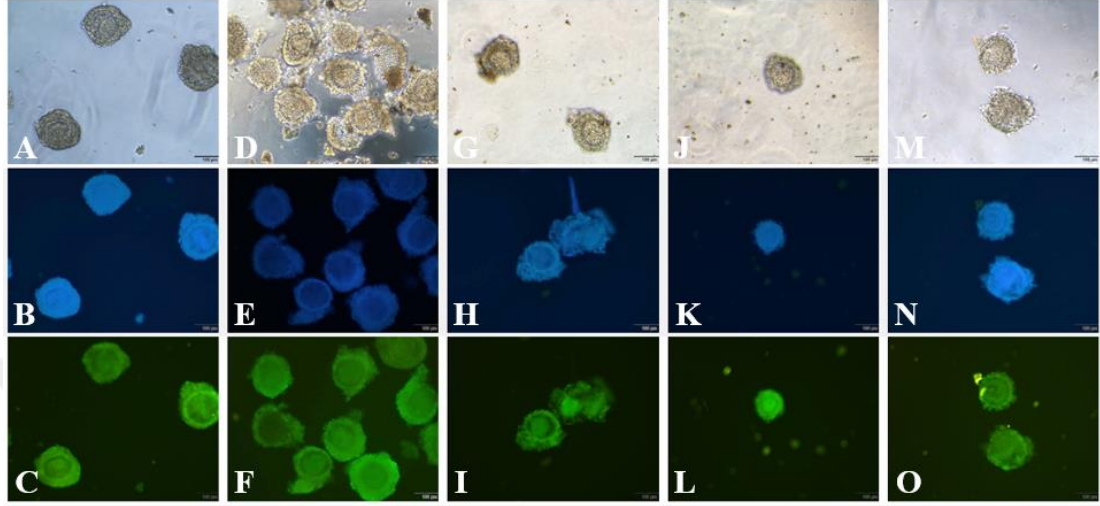
Tablo 22. Tüm gruplara ait PKC relatif mRNA ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama \pm std sapma)

	Sham	Kontrol	OHSS	KK	UK
PKC Relatif mRNA ifadesi	0,834±0,06	1±0	1,888±0,12	1,716±0,04	1,683±0,05

6.7. OOSİT İMMÜNOFLORESAN BOYAMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sağ ovaryum dokusundan 1. kutup cisimciği atılmış, düzgün yüzeyli olgun oositlerin toplanması planlanmaktaydı. Ancak OHSS modeli protokollüne göre, deney protokolünün 5. gününde sıçanlara hCG enjekte edildi ve modelin tam anlamıyla oluşabilmesi için hCG enjeksiyonundan 48 saat sonra sakrifikasyon gerçekleştirildi. Bir mikrotübül bileşeni olan α -tübülün boyaması ile oositler ve oositlerin etrafında

sıkıca bağlı korona radiata hücreleri, yine sıkı bağlı gruplarla karakterize granüloza hücreleri ve belirgin bir zona pelusida görüldü (Resim 23). Toplanan bu oositlerde düzgün yüzeyli oositler gözlenmesine rağmen, 1. kutup cisimciğine rastlanamadı (Resim 23).



Resim 23. Kontrol (A-C), Sham (D-F), OHSS (G-I), KK (J-L) ve UK (M-O) gruplarına ait oositlerin faz kontrast (A, D, G, J, M), DAPI (B, E, H, K, N) ve α -tubulin (C, F, I, L, O) görüntüleri. Yeşil: α -tubulin. Mavi: Çekirdek. Ölçek: 100 μ m

7. TARTIŞMA

İnfertilite, günümüzde yaygın bir problemdir ve dünya genelinde üreme yaşındaki çiftlerin % 8-12'sini etkilediği tahmin edilmektedir. İnfertilite tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri IVF'tir. IVF'teki temel süreç, birden fazla oosit elde etmek amacıyla yapılan kontrollü ovaryan hiperstimülasyondur. Ancak hiperstimülasyon sonucunda istenmeyen bir komplikasyon olan OHSS gelişebilmektedir. OHSS'nin önlenmesi veya tedavi edilmesi, günümüz koşullarında büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, OHSS'yi baz alan hayvan çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır. Hastalık önleme veya tedavi protokollerinin geliştirilmesi için öncelikle hastalığın nedenleri, patofizyolojisi ve patogenezinin anlaşılması önemlidir. Yapılan çalışmalarda, OHSS'nin temel nedeninin hCG uyarımı olduğu bildirilmiştir (Blumenfeld 2018; Abbara ve ark. 2015). OHSS, kapillerlerde geçirgenliğin artmasına, intravasküler bölgelerden ekstravasküler bölgelere sıvı geçmesine ve çoklu organ yetmezliği ve ölüme kadar ulaşabilen çok sayıda klinik bulguya neden olmaktadır (Delvigne ve Rozenberg 2002; Luke ve ark. 2010; Dauod ve Schenker 2018). OHSS riski taşıyan kadınlarda infertilite tedavisi zorlaşmakta ve çoğunlukla tedavi yarıda bırakılmaktadır. Kisspeptinler, bir Arg-Phe-NH₂ karboksil-terminal motifi ile karakterize edilen RFamidler olarak bilinen bir peptid hormon ailesinin üyeleridir. Bu peptitler, gıda alımının kontrolü, ağrı, inflamatuvar yanıtlar, gelişim, üreme ve metabolizmayı içeren çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik süreçte yer almaktadır. Kisspeptin tiplerinden biri olan Kisspeptin-54, hipotalamustaki nöronlardan salgılanan ve GnRH nöronlarındaki reseptörlere bağlanarak, gonadotropin sentezini uyaran bir nöropeptittir. Ovaryumda da kisspeptin-54 reseptörlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Hu ve ark. 2018).

Araştırmacılar eksojen kisspeptinin kadınlarda gonadotropin sekresyonunu akut olarak uyardığını göstermiştir. Bununla birlikte, düzenli adet döngüsü olan sağlıklı kadınlara uzun süreli kisspeptin enjeksiyonunun farmakolojik etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Uzun süreli kisspeptin uygulamasının, erkek maymunlarda ve fonksiyonel hipotalamik amenoreli kadınlarda derin taşifilaksiye

neden olduğu tespit edilmiştir (Seminara ve ark. 2006; Jayasena ve ark. 2009; Jayasena ve ark. 2010). Jayasena ve ark, menstrual döngünün foliküler fazı sırasında iki kez kisspeptin-54 tedavisi sonrasında sağlıklı kadınlarda menstrual döngünün devam ettiğini göstermiştir (Jayasena ve ark. 2013).

Son yıllarda, OHSS riski taşıyan kadınlarda Kisspeptin-54 uygulamasını deneyen çalışmalar bulunmaktadır (Abbara ve ark. 2015). Ancak Kisspeptin-54'ün OHSS mekanizmasına etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, OHSS modeli oluşturulmuş sıçanlarda Kisspeptin-54'ün granüloza hücrelerindeki moleküler mekanizmalar üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Sıçanlar birçok hastalık modeli için uygun hayvanlardır. Çalışmamızda immatür sıçanların kullanılma nedeni, istatistiksel analiz için aynı yaşta, aynı menstrual döngüde uygun sayıda sıçan elde etmenin zorluğu, bir önceki döngüye ait hormonların etkili olabileceği, önceki döngülere ait foliküllerin var olabileceği, olgun sıçanlarda döngünün kısa olması (3-5 gün) ve hiperstimülasyon için yeterli sürenin olmayışıdır. Yaptığımız bu çalışmada, sıçanlarda OHSS modeli sıklıkla kullanılan deneysel model olan PMSG ve hCG kullanılarak oluşturulmuştur ve en sık kullanılan yöntem budur (Kitajima ve ark. 2004). Farklı olarak, PMSG yerine rekombinant FSH; hCG yerine LH'in kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (Gomez ve ark. 2003; Kitsou ve ark. 2016). Modelin oluşup oluşmadığı, ovaryum boyutu, fallop tüplerinin genişliği, kolon morfolojisi gibi kalitatif tayin yöntemleri veya vasküler geçirgenlik testi gibi kantitatif tayin ile yapılmaktadır (Kitajima ve ark. 2004; Ajonuma ve ark. 2005; Turan ve ark. 2015).

Çalışmamızdaki deneysel protokol sonunda, OHSS modeli oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla, fallop tüplerinde sıvının biriktiği, kolonun dilate olduğu ve ovaryumların genişlediği gözlemlendi. Bu bulgular, modelin oluştuğunu göstermektedir.

OHSS modeli oluşturduğumuz sıçanlarda, Kisspeptin-54'ün kısa süreli ve uzun süreli olmak üzere 2 deneysel protokolü uygulandı ve Kisspeptin-54'ün OHSS bulgularını önleyip önlemediği incelendi. Bu nedenle gruplar arasındaki hayvan ağırlıkları değişimleri, ovaryum ağırlıkları, fallop tüplerinin morfolojisi ve ovaryum genişlikleri ile hacimleri kıyaslandı. Ek olarak, Kisspeptin-54'ün, LH ve FSH seviyelerine etkisi ELISA yöntemi ile; VEGF, PEDF, PKA ve PKC ifadelerine etkisi ise qRT-PCR ve immünohistokimyasal yöntemler ile analiz edildi. Elde edilen

bulgular, Kisspeptin-54'ün OHSS bulgularını azalttığını göstermektedir. Kisspeptin-54'ün kemirgenlerde güçlü etkileri olduğu bildirildiğinden çalışmamızda bu kisspeptin tipi seçildi.

Şiddetli OHSS'nin klinik belirtilerinden biri vücut ağırlığı artışıdır. Ozgur ve ark yaptıkları çalışmada, vücut ağırlık değişiminin en yüksek olduğu grup OHSS grubu olarak belirlenmiştir (Ozgur ve ark. 2018). Akman ve ark da OHSS modeli oluşturulan sıçanların en fazla kilo alan grup olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da OHSS grubunun kontrol grubundan daha fazla kilo aldığı ancak tedavi gruplarından daha az kilo aldığı görülmüştür. Uzun süreli Kisspeptin-54 uygulanan grubun ise kısa süreli uygulama alan gruba oranla daha fazla kilo aldığı saptandı. Kisspeptinlerin, KISS1R'ye bağlanarak işlev görmektedir ve bu reseptör hipotalamus ve ovaryumlara ek olarak, yağ doku, pankreas ve karaciğer gibi organlarda da ifade edilmektedir (Tng 2015). Yapılan çalışmalarda, kisspeptinlerin KISS1R üzerinden yağ ve insülin metabolizmalarına etki ederek vücut ağırlığını değiştirdiği belirlenmiştir. Ancak bu konudaki sonuçlar hala çelişkilidir. Örneğin; iki ayrı çalışmada Kisspeptin-54 ve Kisspeptin-10'un primer pankreas hücrelerini insülin salgılaması için uyarabildiği gösterilirken (Hauge-Evans ve ark. 2006; Wahab ve ark. 2011), başka bir çalışmada, tip 2 diyabet hastalarında ve farelerde serumda artmış kisspeptinler saptanmıştır (Song ve ark. 2014). Ek olarak, Wang ve ark, KISS1R aktivasyonunun, farelerde adiposit farklılaşması ve yağ birikimini uyardığını bildirmiştir (Wang ve ark. 2018). Bu verilere göre çalışmamızda tedavi gruplarındaki vücut ağırlığı artışının, kisspeptin-54'ün pankreas ve yağ metabolizması üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonun amacı, tek döngüde birden fazla olgun oosit elde etmektir. Bu amaçla çoklu folikül gelişimi uyarılmaktadır. OHSS'nin de bilinen bulgularından biri ovaryumlarda anormal ağırlık artışıdır. Yapılan çok sayıda çalışmada bu artış rapor edilmiştir (Kitajima ve ark. 2004; Chuderland ve ark. 2013; Kasap ve ark. 2016). Çalışmamızda hem ovaryum ağırlıkları hem de hacimlerinin ölçümü sonrasında OHSS grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat ağırlık ve hacim artışı görüldü. Kisspeptin-54 tedavi gruplarında bu parametrelerin OHSS grubuna göre azaldığı ancak bu azalma anlamlı olmadığı gözlemlendi. OHSS tedavi çalışmalarında GnRH agonistleri ve antagonistleri denenmiştir. Kitajima ve ark kısa süreli ve uzun süreli GnRH agonisti uygulamasını denemişler ve hiperstimüle

sıçanlarda GnRH uygulamasının ovaryum ağırlığında ciddi düşüğe yol açtığını ve bu düşüşün özellikle uzun GnRH grubunda olduğunu bildirmişlerdir (Kitajima ve ark. 2004). Cenksoy ve ark ise OHSS modeli oluşturulan sıçanlarda GnRH antagonistinin ovaryan ağırlıkları azalttığını belirlemişlerdir (Cenksoy ve ark. 2014). Kisspeptin-54'ün hiperstimüle ovaryum ağırlığına veya hacmine etkisini değerlendiren herhangi bir *in vivo* çalışmaya rastlanmadığından çalışmamızın bu bulguları ilk olma özelliğine sahiptir.

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon uygulamalarının % 20'sinde prematüre LH dalgalanması olduğu bildirilmiştir. LH'nin luteal fazdan önceki bu yüksek seyri, erken luteinizasyona ve foliküler atreziye neden olmaktadır. GnRH antagonistleri kullanılarak, LH'daki bu erken dalgalanmanın önüne geçilebildiği çalışmalarda gösterilse de yetersiz kaldıkları da ifade edilmektedir (Kummer ve ark. 2011).

OHSS karmaşık ve hormonal süreçlerle yakından ilişkilidir. Önlenmesi amacıyla çok farklı yöntemler geliştirilse de en sık karşılaşılanları GnRH agonistlerinin ve antagonistlerinin kullanımınıdır. Yapılan bir çalışmada hem GnRH agonistinin hem de antagonistinin dahil edildiği IVF protokolünde, GnRH antagonistinin foliküler fazdaki LH seviyesini düşürdüğü, luteal fazdaki LH seviyesini arttırdığı bildirilmiştir (Fiedler ve Ezcurra 2012).

PKOS, OHSS ile ilişkilidir, ancak PKOS'dan etkilenen kadınlarda düşük ve preeklampsi insidansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni, kanda artan LH seviyesidir ve GnRH agonisti verildiğinde LH seviyesi düzenlenmiştir (Delvigne ve Rozenberg 2003).

Folikül matürasyonunda, GnRH agonisti uygulaması, granüloza/teka lutein hücrelerinin LH stimülasyon süresini gün yerine saatlere düşürerek ve östrojen ve progesteron seviyelerinde hızlı bir azalma ile luteolizi indükleyerek OHSS'yi önlediğine inanılmaktadır (Casper 2015). Depalo ve ark yaptıkları derlemede, eksojen gonadotropinler ile birlikte GnRH agonisti verilmesinin, FSH ve LH salgısını baskılayarak stabil hale getirdiğini ve bunun gebelik oranlarını arttırdığını bildirmişlerdir. GnRH agonistinin FSH ve LH'ı azaltma mekanizması ise GnRH agonistinin hipofizi sürekli uyararak duyarsızlaştırmasıdır (Depalo ve ark. 2012). GnRH agonistine benzer şekilde, çalışmamızda, Kisspeptin-54'ün OHSS'nin LH üzerindeki negatif etkilerini azaltarak, LH seviyesinin kontrol grubuna benzer

seviyeye geldiği bulunmuştur. Hunjan ve Abbara da IVF hastalarına tek doz Kisspeptin-54 enjekte etmişler ve sonuçta Kisspeptin-54'ün 12-14 saat boyunca LH seviyesini arttırdığını sonrasında ise bu seviyenin düştüğünü belirtmişlerdir (Hunjan ve Abbara 2019). Roa ve ark dişi sıçanlara Kisspeptin-10 enjeksiyonundan sonra LH seviyesinin arttığını ve sonrasında normale döndüğünü ifade etmişlerdir (Roa ve ark. 2008). OHSS'de serum östradiol seviyeleri oldukça yüksektir ve belirteç olarak kullanılmaktadır. Yüksek östradiol seviyesi, hipofizde pozitif geri beslemeye neden olarak OHSS hastalarında daha fazla LH ve FSH görülmesine neden olabilmektedir (Tng 2015). Çalışmamızda Kisspeptin-54'ün OHSS grubundaki yüksek FSH seviyesini azalttığı bulundu. Fernandois ve ark kisspeptinin FSH reseptörlerini azalttığını ve primordiyal folikül aktivasyonunu geciktirdiğini gözlemlemiştir (Fernandois ve ark. 2016). Bizim çalışmamızın sonucu da bu ve buna benzer çalışmalar ile korelasyon gösterdi. Kisspeptin-54'ün bu etkilerini hipofizi duyarsızlaştırarak ve folikül aktivasyonunu geciktirerek gerçekleştirdiğini düşündürmüştür.

KOH sırasında, ovulasyon tetiklendikten sonra OHSS'yi akla getirebilecek bir dizi parametre vardır. Bunlarda ilki antruma sahip antral foliküllerin (sekonder ve graaf folikülü) sayısıdır. Özellikle KOH sırasında 20'den fazla antral folikül varlığı OHSS riskini büyük oranda arttırmaktadır. Oosit toplama aşamasında 25'ten fazla folikül olması ve toplanan oosit sayısının 24'ten fazla olması OHSS ile ilişkilidir (Pellicer ve ark. 2019). Eğer bu durum fark edilemezse veya bu belirtiler hiperstimülasyonun erken evrelerinde ortaya çıkmaz ise hastaların çoğunda OHSS ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda ovaryum hacminin ve ağırlığının artışından sonraki ileri hastalık evrelerinde ovaryumlar kistik hale gelmektedir ve bu durum distansiyon ve ağrıya neden olmaktadır (Delvigne ve Rozenberg 2002). Ayrıca bu kistik foliküller rupture olabilmektedir ve kanayabilmektedir (Delvigne ve Rozenberg 2003).

Çalışmamızda gruplara ait ovaryumlar Hematoksilen-Eozin boyamasıyla morfolojik olarak değerlendirildi ve folikül tipleri sayıldı. Sonuçlarımıza göre, OHSS oluşturulan sıçan ovaryumlarında primordiyal, erken primer, geç primer ve sekonder folikül sayılarının azaldığı tespit edildi. Ayrıca, graaf folikülü, korpus hemorajikum ve korpus luteum sayılarının arttığı gözlemlendi. Bu folikül tiplerine ek olarak, beklenildiği gibi atretik ve kistik folikül sayılarının da diğer gruplara oranla yüksek olduğu görüldü.

Kisspeptinlerin, foliküler gelişim, oosit maturasyonu, ovulasyon ve steroidogenez mekanizmaları üzerinde güçlü etkileri olduğu bulunmuştur. Fernandois ve ark tarafından yapılan çalışmada, sıçanlara 28 gün boyunca kisspeptin veya kisspeptin antagonisti verilmiş ve foliküler gelişim değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, kisspeptin verilen sıçan ovaryumlarında daha az sekonder folikül, ancak daha fazla graaf folikülü ve korpus luteum görülmüştür. Kisspeptin antagonisti verilen sıçan ovaryumlarında ise daha fazla sekonder folikül ancak daha az graaf folikülü ve korpus luteum tespit edilmiştir. Aynı çalışma, kisspeptinin FSH reseptör sayısını azaltarak primordiyal folikül aktivasyonunu azalttığını ve AMH seviyesini arttırarak graaf folikül gelişimini arttırdığını da göstermiştir (Fernandois ve ark. 2016). Daya, yayınladığı bir derlemede GnRH agonistinin endojen gonadotropinleri baskılayarak erken foliküllerin koordineli bir biçimde büyümesini uyardığını ifade etmiştir. Böylelikle olgun foliküllerin sayısı ve elde edilen kaliteli oosit sayısı artmaktadır (Daya 2000).

GnRH agonistinin foliküler gelişim ve steroidogenez üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmada, farelere farklı dozlarda GnRH agonisti enjekte edilmiştir. Buna göre kısa süreli (8 gün) yüksek doz (5 µg/gün) GnRH agonisti verilen farelerde folikülogenez uyarılmıştır. Farmakolojik dozda (25 µg/gün) GnRH agonisti verildiğinde ise foliküler gelişimin inhibe olduğu, granüloza ve teka hücrelerinde dejenerasyon ve erken preantral foliküllerde yüksek doza göre artış belirlenmiştir (Singh ve Krishna 2010). Turan ve ark'nın yaptığı başka bir çalışmada, OHSS'nin engellenmesi için myo-inositolün ve metforminin etkinliği değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, metformin ve metformin+myo-inositol tedavi gruplarında luteinizasyonun arttığını; sadece myo-inositol verilen grupta ise OHSS grubuna göre luteinizasyonun azaldığını ifade etmişlerdir (Turan ve ark. 2015).

Çalışma sonuçlarımıza göre tedavi gruplarımızda, OHSS'de azalma gösteren primordiyal, erken ve geç primer foliküllerin sayısının arttığı tespit edildi. Bu artış Kisspeptinlerin primordiyal folikül aktivasyonunu sınırlandırarak ovaryan rezervi koruduğu görüşleriyle korelasyon göstermektedir. Sekonder ve graaf folikül sayılarının da OHSS grubuna zıt olarak Kisspeptin-54 tedavi gruplarında arttığı, bu artışın uzun süreli tedavi grubunda daha belirgin olduğunu saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca Kisspeptin-54'ün korpus luteum sayılarını arttırdığı bunun aksine ise atretik ve kistik folikül sayılarını da anlamlı şekilde azalttığı görülmüş ve bu bulgular ile

OHSS'ye göre ovulasyon oranının arttığı düşünülmüştür. Sonuç olarak, çalışmamızda Kisspeptin-54'ün folikülogenezi pozitif yönde etkileyerek OHSS'nin negatif etkilerini önlediği, bununla beraber matürasyon ve ovulasyon oranını arttırdığı, ayrıca korpus luteum oluşumunu sağlayarak, sağlıklı gebelik için uygun ortamı desteklediği sonucuna varılmıştır.

Prostaglandinler, inhibin, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi ve inflamatuvar moleküllerin bazıları OHSS etiolojisinde yer almaktadır. Ancak VEGF ana faktör olarak tanımlanmıştır. VEGF, vasküler geçirgenliği arttıran proanjiyogenik bir faktördür. Etkisini VEGF reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirmektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalar, VEGF'nin granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve stromal hücrelerde ifade edildiğini belirlemiştir (Ozgur ve ark. 2018).

Tirozin kinaz ailesine ait VEGF reseptörleri endotel hücrelerde yer almaktadır. Vasküler geçirgenlik ve anjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynayan esas reseptör VEGFR-2'dir. VEGF reseptörleri endotel hücrelerine ek olarak sıçan, maymun ve insan ovaryan foliküllerinde ve korpus luteumda da tespit edilmiştir (Scotti ve ark. 2014).

OHSS sıçan modellerinin kullanıldığı çalışmalar, hCG uygulamasından önceki gonadotropin stimülasyonu sırasında ovaryumdaki VEGF mRNA seviyelerinin ve vasküler geçirgenliğinin arttığını göstermiştir (Gómez ve ark. 2002). Folikülogenez için verilen gonadotropinler VEGFR-2'nin de ifadesini arttırmaktadır (Gomez ve ark. 2003). hCG tüm bu parametreleri daha da arttırarak maksimum seviyelere ulaştırmaktadır. Bu en üst seviye hCG'den 48 saat sonra gözlenmektedir.

Ozgur ve ark OHSS modeli oluşturdukları sıçanların antral folikül granüloza hücrelerinde VEGF seviyesinin arttığını bildirmişlerdir (Ozgur ve ark. 2018). Gomez ve ark, OHSS sıçan modelinde ovaryumun temel VEGF kaynağı olduğunu göstermişlerdir. Aynı grup, VEGFR-2 inhibitörünün (SU5416) armış vasküler geçirgenliği azalttığını rapor etmişlerdir (Gómez ve ark. 2002). Yine Gomez ve ark başka bir çalışmalarında, orta ve yüksek dozlarda gonadotropinlerin VEGF ve VEGFR-2'nin aşırı ifadesine neden olduğunu ve vasküler geçirgenliği arttırdığını bulmuşlardır (Gomez ve ark. 2003). Scotti ve ark da VEGF inhibitörü verdikleri OHSS sıçanlarda korpus luteum ve kistik folikül sayısının azaldığını, korpus luteumdaki apoptozun arttığını, endotelial hücrelerdeki VEGFR-2 ifadesinin ve

fosforilasyonunun azaldığını ancak hücreler arası bağlantı proteinlerinin artış gösterdiğini belirlemişlerdir (Scotti ve ark. 2014).

OHSS oluşumu için hem LH benzeri aktivitenin hem de ovaryan fonksiyonun var olması gerekmektedir. Çünkü ooferektomi yapıldığında veya KOH'ta hCG verilmediğinde bu semptomlar ortaya çıkmamaktadır. *In situ* hidridizasyon çalışmaları, sıçanlarda olduğu gibi insanlarda da VEGF ifadesinin hCG'den önce başladığını göstermiştir. İnsan granüloza hücreleri kültüre edildiğinde bu hücrelerin de VEGF salgıladığı belirlenmiştir. IVF uygulamalarında oositler toplanırken izole edilen granüloza hücreleri kültüre edildiğinde ve *in vitro* hCG verildiğinde, VEGF mRNA seviyeleri artmıştır ve bu artış özellikle, sonrasında OHSS geliştiren kadınlara ait hücrelerde olmuştur. *In vivo* insan çalışmalarında da hCG'nin granüloza -lutein hücrelerindeki VEGF oranını yükselttiği ifade edilmiştir. VEGF seviyesindeki bu artış OHSS ile ilişkili bulguların temel nedenidir (Soares ve ark. 2008).

Çalışmamızdaki immünohistokimya sonuçlarında VEGF'nin tüm gruplara ait ovaryumlarda var olduğu görüldü. Ancak OHSS oluşturulan sıçanlara ait foliküllerdeki granüloza hücrelerinde VEGF ifadesinin diğer gruplara göre yüksek oranda arttığı ancak atretik foliküllerde bir değişim olmadığı saptandı. Fonksiyonel foliküllere ek olarak korpus hemorajikum, korpus luteum, atretik folikül ve kistik foliküllerdeki VEGF immünoreaktivitesi de oldukça yüksek bulundu. İmmünohistokimyasal bulgularının, qRT-PCR verileri ile de desteklendiği görüldü. OHSS grubuna ait granüloza hücrelerinde VEGF mRNA seviyesinin 4,6 kat arttığı saptandı.

hCG, oosit olgunlaşması için en yaygın kullanılan tetikleyicidir, ancak artan OHSS riski ile ilişkilidir. Oosit olgunlaşmasını tetiklemek için GnRH agonistlerinin kullanılması hCG'ye göre daha güvenli bir alternatiftir. Son zamanlarda kisspeptin-54, OHSS riski yüksek olan kadınlarda bile oosit olgunlaşmasını güvenli bir şekilde tetikleyen yeni bir terapötik seçenek olarak ortaya çıkmıştır. Kisspeptin, hipotalamik GnRH nöronları üzerinde etkili olarak gonadotropin sekresyonunu dolaylı olarak uyarmaktadır. Kisspeptin ve reseptörü ovaryumlarında ifade edilmektedir, ancak kisspeptinlerin ovaryum üzerindeki doğrudan etkisi hakkında sınırlı veri vardır (Owens ve ark. 2018).

Golzar ve ark 2015 yılında insan umbilikal ven endotel hücrelerine farklı dozlarda Kisspeptin-10 vermişler ve düşük doz Kisspeptin-10'un migrasyonu ve proliferasyonu arttırırken, yüksek dozun bu parametreleri azalttığını bulmuşlardır (Golzar ve Javanmard 2015). Zhai ve ark, Kisspeptin-10'un OHSS sıçanlara etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında eksojen Kisspeptin-10 tedavisinin, OHSS'ye bağlı olarak azalan KISS1R seviyesinin hem ovaryumlarda hem de akciğerlerde arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca tedavi sonucunda VEGF seviyesinin ve vasküler geçirgenliğin azaldığını bildirmişlerdir (Zhai ve ark. 2017). Başka bir araştırmada, PMSG uyarımından sonra sıçanlara verdikleri Kisspeptin-54'ün gonadotropin seviyelerini ve ovulasyonu arttırdığını göstermişlerdir (Matsui ve ark. 2004).

Kisspeptin-54 ile ilgili insan çalışmaları kısa süre önce başlamıştır. Dhillo ve ark 2005 ve 2007 yıllarında yaptıkları iki farklı çalışmada tek doz Kisspeptin-54 enjeksiyonunun sağlıklı kadınlar ve erkeklerde gonadotropin sentezini uyardığını göstermişlerdir (Dhillo ve ark. 2005; Dhillo ve ark. 2007). Jayasena ve ark, 2009 yılında hipotalamik amenoreli kadınlara 14 gün boyunca Kisspeptin-54 verdikleri çalışma sonucunda, Kisspeptin-54 enjeksiyonundan 4 saat sonra serum LH ve FSH seviyelerinin arttığı ancak 14. Gün sonunda bu hormonların belirgin şekilde azaldığı tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, uzun süreli Kisspeptin-54 uygulamasının gonadotropin salgılanmasında duyarsızlaşmaya neden olduğunu önermişlerdir (Jayasena ve ark. 2009). Aynı grup hipotalamik amenoreli kadınlarda yaptıkları 8 haftalık Kisspeptin-54 enjeksiyonunun da benzer sonuçlara neden olduğunu belirlemişlerdir (Jayasena ve ark. 2010).

Jayasena ve ark 2013 yılında, sağlıklı gönüllü kadınlara, foliküler fazın başından itibaren 7 ve 14 gün boyunca Kisspeptin-54 enjekte etmişlerdir. Uygulamalar sonunda tüm kadınlarda menstrual döngünün bir problem olmadan devam ettiği, ancak kısaldığı, luteal fazın daha erken başladığı gözlenmiştir (Jayasena ve ark. 2013).

Abbara ve ark, OHSS riski yüksek olan 60 kadında faz 2, çok dozlu, randomize bir klinik çalışma yapmışlardır. Çalışmada standart bir rekombinant FSH/GnRH antagonist protokolünün ardından hastalara oosit maturasyonu için farklı dozlarda tek bir Kisspeptin-54 enjekte etmişlerdir ve oositlerin maturasyonu değerlendirmişlerdir. Ayrıca oositler intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ile döllenerek transfer edilmiş ve hastalar OHSS bakımından takip edilmiştir. Sonuçta hastaların % 95'inde oosit

maturasyonu gerçekleştirmiştir. En yüksek dozda en fazla oosit verimi sağlanmıştır. Ayrıca bu hastalardan sadece dördünde hafif OHSS belirtileri gözlenirken hiçbirinde orta ve şiddetli OHSS bulgularına rastlanmamıştır ve Kisspeptin-54'ün OHSS riski olan kadınlarda oosit maturasyonunda kullanılabilme potansiyeli olduğu önerilmiştir (Abbara ve ark. 2015). Aynı araştırma ekibi, OHSS riski taşıyan 62 hastaya, oosit maturasyonu için Kisspeptin-54 verdikten 10 saat sonra ikinci bir doz daha uygulamış ve oosit maturasyon oranının % 45'ten % 71'e çıktığını belirlemiştir (Abbara ve ark. 2017).

Çalışmamızda kullandığımız VEGF immünohistokimyasal boyama sonuçlarında, OHSS modeli oluşturulan sıçanlara Kisspeptin-54'ün kısa ve uzun süreli enjeksiyonunun, tüm folikül tiplerindeki granüloza hücrelerinde VEGF protein seviyelerini azalttığı, ancak atretik foliküllerde bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu azalmanın uzun tedavi grubundaki korpus hemorajikum, korpus luteum ve atretik foliküllerde kısa tedavi grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda izole edilen granüloza hücrelerindeki VEGF mRNA ifadesinin de Kisspeptin-54'e yanıt olarak düştüğü, bu düşüşün uzun süreli uygulama grubunda (2,9 kat), kısa süreli uygulama grubundan (2,4 kat) daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Kisspeptin-54'ün OHSS'li sıçan granüloza hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından, elde ettiğimiz bulgular, literatüre özgün bir katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızda, OHSS sıçan modelinde Kisspeptin-54'ün hem folikül tiplerindeki hem de izole edilen granüloza hücrelerindeki seviyeleri incelenmiştir. PEDF antianjiyogenik etki gösteren bir glikoproteindir. Granüloza hücrelerinde PEDF ve VEGF denge içerisinde ve zıt yönlü fonksiyon göstermektedir. Bu denge VEGF lehine değişim gösterdiğinde ortaya vasküler geçirgenlik ve anjiyogenez artışı çıkmaktadır. Bu nedenle VEGF artışının neden olduğu patolojik durumlarda rekombinant PEDF araçlarının kullanımı ilgi çekici hale gelmiştir (Chuderland ve ark. 2013). Miller ve ark, in vitro sıçan granüloza hücre hattında ve IVF tedavisi gören kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerinde PEDF ve VEGF seviyelerini araştırmışlardır. Lizofosfatidik asit (LPA) ile uyarılan sıçan granüloza hücre hattındaki PEDF seviyesi bir azalma sergilemiştir. İnsan primer granüloza hücreleri hCG ile uyarıldığında, VEGF mRNA'sının arttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca, OHSS

indüklenen farelere rekombinant PEDF enjeksiyonunun, tüm OHSS parametrelerinin şiddetini hafiflettiğini belirlemişlerdir (Miller ve ark. 2016).

Kisspeptin-54 ve PEDF ilişkisi Owen ve ark tarafından incelenmiştir. IVF tedavisi gören 48 hasta hCG, GnRH agonisti, tek doz Kisspeptin-54 ve iki doz Kisspeptin-54 alanlar olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Bu hastalardan elde edilen granüloza hücrelerindeki PEDF seviyelerinde herhangi bir farka rastlanmamıştır (Owens ve ark. 2018). Çalışmamız sonucunda OHSS grubuna ait foliküllerdeki PEDF düzeylerinin, VEGF'nin aksine oldukça düştüğü, Kisspeptin-54 gruplarında ise PEDF seviyelerinin ciddi artış gösterdiği saptandı. Granüloza hücrelerindeki PEDF mRNA miktarlarının ise immünohistokimyasal sonuçlarla korelasyon göstererek OHSS sıçanlarında kontrol grubunda belirlenen düzeyin yaklaşık yarısına kadar azaldığı, tedavi gruplarında ise arttığı izlendi. Bu artış oranlarının uzun süreli Kisspeptin-54 grubunda (2,9 kat) kısa süreli tedaviye (2,1 kat) göre daha fazla olduğu görüldü. Sonuçlarımız, Kisspeptin-54'ün OHSS bulgularını iyileştirici veya önleyici etkilerinin olduğunu, bu pozitif etkilerin ise PEDF artışına cevap olarak VEGF azalışına bağlı olduğunu düşündürmüştür.

Günümüze dek yapılan çok sayıda çalışma OHSS patogenezinde interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) gibi inflamatuvar sitokinlerin ve reseptörlerinin rol aldığı gösterilmiştir (Abramov ve ark. 1996; Chen ve ark. 1999). Bu sitokinlerin FSH, hCG gibi gonadotropinler ile arttığı ve PKC sinyal yolağını aktivasyonu ile OHSS'ye neden olabileceği belirlenmiştir. Wei ve ark, IVF hastalarından elde ettikleri granüloza hücrelerine *in vitro* ortamda FSH verdiklerinde, IL-6 reseptörünün arttığını; ortama PKC inhibitörü eklediklerinde ise reseptör sayısının azaldığını saptamışlardır (Wei ve ark. 2013).

hCG ile indüklenen VEGF biyosentezini yöneten sinyal transdüksiyonuna PEDF ve PKA/PKC'nin ters yönlü aracılık ettiği gösterilmiştir. van den Driesche ve ark, histerektomi ameliyatı sırasında kadınlardan korpus luteum almışlardır ve granüloza-lutein hücrelerini izole etmişlerdir. Primer kültürde hCG verilen hücrelerde hipoksi ile ilişkili moleküllerin ve VEGF seviyesinin PKA yolağı aracılığıyla arttığını göstermişlerdir (van den Driesche ve ark. 2008). Yapılan başka bir çalışmada, sıçan granüloza hücre hattı olan LH-15 ve primer insan granüloza hücre hattı olan PHGC'de hCG uygulamasının PEDF seviyesini azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmaya göre

hCG muamelesi ile birlikte PKA veya PKC inhibitörü verildiğinde PEDF düzeyinin arttığı tespit edilmiştir (Bar-Joseph ve ark. 2016). Benzer çalışmalar farklı faktörler üzerinde de yürütülmüştür. Henriquez ve ark, IVF tedavisi alan kadınlarda elde ettikleri granüloza hücrelerine LH, hCG ve FSH vermişlerdir. Progesteron reseptörü sayısının hCG'ye cevap olarak PKA ve PKC yolları üzerinden arttığını ifade etmişlerdir (Henríquez ve ark. 2017). Çalışmamızda OHSS modelindeki ve Kisspeptin-54 uygulamasındaki VEGF ve PEDF moleküllerinin PKA ve PKC ile ilişkisini değerlendirildiğinde, OHSS grubunda PKA ve PKC ifadelerinin, VEGF'ye benzer şekilde hem mRNA hem de protein düzeyinde arttığı belirlendi. Tedavi gruplarında ise Kisspeptin-54 uygulamasının PKA ve PKC düzeylerini azalttığı saptandı. PKA mRNA azalışı kısa ve uzun tedavi grupları arasında fark göstermez iken, PKC mRNA seviyesindeki azalmanın, kısa Kisspeptin-54 grubunda anlamlı olmadığı, uzun Kisspeptin-54 grubunda anlamlı olduğu gözlemlendi. Protein düzeylerinin değerlendirilmesi sonrasında ise azalmanın iki tedavi grubunda da anlamlı olduğu ve uzun tedavi grubunda daha fazla azalma olduğu saptandı. PKA ve PKC, granüloza hücrelerinde LH reseptörlerinin aktivasyonu sonucu sırasıyla Adenilat Siklaz veya Fosfolipaz C ile uyarılarak işlevsel hale gelmektedir (Bar-Joseph ve ark. 2016). Elde edilen bulgular neticesinde, OHSS oluşturulmuş sıçanlara verilen Kisspeptin-54'ün, LH reseptör sayısını azaltmış veya bloke etmiş olabileceği, Adenilat Siklaz veya Fosfolipaz C oranını azaltmış veya inhibe etmiş olabileceği veya PKC mRNA'larının translasyon mekanizmalarını baskılamış olabileceği düşünüldü. PKA ve PKC seviyelerinin Kisspeptin-54'e yanıt olarak düşmesinin bir başka nedeninin de serum LH düzeyindeki azalma ile birlikte daha az reseptörün uyarılmasının olabileceği düşünülebilir.

Oosit morfolojisinin 1. kutup cisimciğine göre sınıflandırması 5'e ayrılmaktadır; 1. ve 2. sınıflamaya göre 1. kutup cisimciği atılmış olup, oosit düzgün yüzeylidir (Delilbaşı 2008). α -tubulin hücre iskeletini oluşturan mikrotübüllerin temel birimlerinden biridir ve hem oosit matürasyon aşamalarını hem de 1. kutup cisimciğini göstermek amacıyla en sık kullanılan yöntem α -tubulin boyamasıdır (Machtinger ve ark. 2013; Kierszenbaum ve Tres 2015). Bu amaçla çalışmamızda sağ ovaryum dokusundan olgun oositlerin toplanması planlandı. OHSS modeli protokollüne göre, deney protokolünün 5. gününde sıçanlara hCG enjekte edildi ve modelin tam anlamıyla oluşabilmesi için hCG enjeksiyonundan 48 saat sonra sakrifikasyon

gerçekleştirildi. α -tubulin immünofloresan boyama sonuçlarında, oositlerin etrafında koyu, kompakt kümülüs hücreleri, sıkı bağlı korona radiata hücreleri ve belirgin bir zona pellusida saptandı fakat oositlerin etrafında tespit edilmesi beklenen 1. kutup cisimciği görülmedi. Buna göre toplanan oositlerin immatür olduğu, protokol sürecinde hCG'den sonraki 12-18 saatte olgun oositlerin ovule olduğu düşünöldü.



8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, deneysel OHSS modeli oluşturulmuş sıçanlarda Kisspeptin-54'ün vücut ağırlığı, ovaryum ağırlığı ve hacmi, ayrı ayrı her bir folikül tipi ve izole edilen granüloza hücreleri için VEGF, PEDF, PKA ve PKC seviyelerine etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. OHSS, KOH tedavilerinin bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır ve ölüme gidebilen semptomları dolayısıyla hastaları ciddi şekilde etkileyen bir sendromdur. Modern çağın negatif etkilerinin görüldüğü önemli alanlardan biri infertilitedir. İnfertilite insidansı arttıkça, çiftlerin KOH tedavilerine olan gereksinimleri artmaktadır ve bu yolun istenmeyen sonucu olarak da OHSS oranları giderek yükselmektedir. OHSS riski taşıyan kadınlara, bu riskleri ortadan kaldırmak veya baştan ortaya çıkmasını engellemek için yeni tedavi arayışları sürmektedir. hCG, OHSS'nin bilinen en büyük uyarıcısıdır. KOH protokollerinde verilen hCG, vasküler geçirgenliği ve VEGF düzeylerini arttırarak temel bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarda, rekombinant LH, GnRH agonistleri ve antagonistleri, düşük doz hCG gibi yaklaşımlar kullanılsa da oosit matürasyonunu arttırdıklarını gösteren bulgular tartışmalıdır. Bu çalışmada, Kisspeptin-54'ün OHSS'nin önlenmesinde veya tedavi edilmesinde pozitif etkileri olabileceği gösterilmiştir. Kisspeptin-54, ovaryum ağırlığı, fallop tüplerindeki dilatasyon, ovaryan rezervin korunurken matüre folikül sayısının artması gibi çok sayıda tedavi edici rol üstlenmiştir. Ayrıca Kisspeptin-54, kistik ve atretik folikül sayılarını azaltarak daha fazla sağlıklı korpus luteum oluşumunu indüklemiş ve bu da daha fazla olgun oositin ovule olduğuna işarettir. VEGF, PEDF, PKA ve PKC mRNA ve protein ifadeleri incelendiğinde ise Kisspeptin-54'ün PEDF seviyesini arttırdığı ve VEGF seviyesini azalttığı belirlenmiştir. İki protein arasındaki bu artış ve azalış mekanizmaları ise hücre içi PKA ve PKC yolları üzerinden gerçekleşmiştir.

Tüm bu sonuçlar, Kisspeptin-54'ün yüksek OHSS riski taşıyan kadınlarda oosit matürasyon tetikleyicisi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Yapılacak yeni çalışmalar ile Kisspeptin-54 tedavisi sonrasında elde edilen oositlerin döllenme yeteneği ve iyi kalitede embriyo oluşturma potansiyeli de araştırılacak konulardandır. Bununla beraber implantasyon mekanizmaları üzerindeki etkilerinin incelenmesinin

de, bu nöropeptidin gebelik verimini nasıl arttırdığı sorularına cevap olabileceği önerilebilir.



9. KAYNAKLAR

Abbara A, Clarke SA, Dhillo WS. Novel concepts for inducing final oocyte maturation in in vitro fertilization treatment. *Endocrine reviews*. 2018; 39.(5), 593-628.

Abbara A, Clarke S, Islam R, Prague JK, Comminos AN, Narayanaswamy S, Papadopoulou D, Roberts R, Izzi-Engbeaya C, Ratnasabapathy R. A second dose of kisspeptin-54 improves oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a Phase 2 randomized controlled trial. *Human reproduction*. 2017; 32.(9), 1915-1924.

Abbara A, Jayasena CN, Christopoulos G, Narayanaswamy S, Izzi-Engbeaya C, Nijher GM, Comminos AN, Peters D, Buckley A, Ratnasabapathy R. Efficacy of kisspeptin-54 to trigger oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) during in vitro fertilization (IVF) therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015; 100.(9), 3322-3331.

Abramov Y, Schenker J, Lewin A, Friedler S, Nisman B, Barak V. *Endocrinology*: plasma inflammatory cytokines correlate to the ovarian hyperstimulation syndrome. *Human reproduction*. 1996; 11.(7), 1381-1386.

Adam G, İmamoğlu T, Yaşar F, Erdoğan N. Kesitsel Görüntülerde Dalak Hacminin Cavalieri Yöntemiyle Saptanması Ve Formüle Dayalı Yöntemlerle Kıyaslanması. *İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*. 2010; 20.(2), 63-69.

Adhikari D, Flohr G, Gorre N, Shen Y, Yang H, Lundin E, Lan Z, Gambello M J, Liu K. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Molecular human reproduction*. 2009; 15.(12), 765-770.

Ajonuma LC, Tsang LL, Zhang GH, Wong CHY, Lau MC, Ho LS, Rowlands DK, Zhou CX, Ng CP, Chen J. Estrogen-induced abnormally high cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression results in ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular Endocrinology*. 2005; 19.(12), 3038-3044.

Akman, L., Sahin, G., Erbas, O., Aktug, H., Akdogan, A., Goker, E. N. T., Taskiran, D., Tavmergen, E. (2015). Comparison of montelukast and cabergoline for prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: in an experimental rat model. *Gynecological Endocrinology*. 2015; 31(5), 369-373.

Bar-Joseph H, Ben-Ami I, Ron-El R, Shalgi R, Chuderland D. Pigment epithelium-derived factor regulation by human chorionic gonadotropin in granulosa cells. *Reproduction*. 2016; 151.(2), 179-185.

Blumenfeld Z. The ovarian hyperstimulation syndrome Vitamins and hormones. 2018; 107, 423-451.

Borisova M, Moiseenko DY, Smirnova O. Human chorionic gonadotropin: Unknown about known. Human Physiology. 2017; 43.(1), 93-104.

Boyar Hİ. Kadın infertilitesi ve endokrinolojik hastalıklar. Dicle Tıp Dergisi. 2013; 40.(4), 700-703.

Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. Reproductive biomedicine online. 2001; 2.(1), 173-185.

Burchardt M, Burchardt T, Chen MW, Shabsigh A, de la Taille A, Buttyan R, Shabsigh R. Expression of messenger ribonucleic acid splice variants for vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans. Biology of reproduction. 1999; 60.(2), 398-404.

Cai XJ, Wang L, Hu CM. Effects of GABAB receptor activation on spatial cognitive function and hippocampal neurones in rat models of type 2 diabetes mellitus. Bioscience reports. 2018; 38.(1).

Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF. Oocyte–granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. Developmental biology. 2000; 226.(2), 167-179.

Carlsson IB, Scott JE, Visser J, Ritvos O, Themmen A, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. Human reproduction. 2006; 21.(9), 2223-2227.

Casper RF. Reducing the risk of OHSS by GnRH agonist triggering. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2015; 100.(12), 4396-4398.

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. Science. 2003; 301.(5630), 215-218.

Cenksoy C, Cenksoy PO, Erdem O, Sancak B, Gursoy R. 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 and Gynecology and Reproductive Biology. 2014; 174, 86-90.

Çetin C, Göktolga Ü, Çetin T. Her Yönüyle Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu. Türk Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Dergisi. 2017; 1 (1), 59-65.

Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. Endocrine reviews. 2002; 23.(6), 787-823.

Chen CD, Wu MY, Chen HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Prognostic importance of serial cytokine changes in ascites and pleural effusion in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and sterility*. 1999; 72.(2), 286-292.

Choi Y, Rajkovic A. Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281.(47), 35747-35756.

Chuderland D, Ben-Ami I, Kaplan-Kraicer R, Grossman H, Ron-El R, Shalgi R. 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*. 2013; 98.(2), E258-E266.

Chung KW, Chung HM, Halliday NL. *Gross anatomy*. 8th edition. Wolters Kluwer. Philadelphia. 2015. 187-188.

Crawford SE, Fitchev P, Veliceasa D, Volpert OV. The many facets of PEDF in drug discovery and disease: a diamond in the rough or split personality disorder? *Expert opinion on drug discovery*. 2013; 8.(7), 769-792.

Crosignani PG, Colombo M, Vegetti W, Somigliana E, Gessati A, Ragni G. Overweight and obese anovulatory patients with polycystic ovaries: parallel improvements in anthropometric indices, ovarian physiology and fertility rate induced by diet. *Human reproduction*. 2003; 18.(9), 1928-1932.

Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara HE. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and sterility*. 2012; 98.(5), 1283-1290.

Dauod L, Schenker JG. *Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS): Pathogenesis and Prevention Reproductive Medicine for Clinical Practice*. 2018; 83-92.

Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2000;(2), CD001299-CD001299.

De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G, Smeenk J, Vidakovic S, Goossens V. ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human reproduction*. 2018; 33.(9), 1586-1601.

De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100.(19), 10972-10976.

Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude J, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, Hédon B, Déchaud H. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Human reproduction update*. 2011; 17.(1), 76-95.

Delilbaşı L. *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. 1. Baskı. Güneş Tıp Kitapevleri. Ankara. 2008; 90-94.

Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Human reproduction update*. 2002; 8.(6), 559-577.

Delvigne A, Rozenberg S. Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Human reproduction update*. 2003; 9.(1), 77-96.

Depalo R, Jayakrishan K, Garruti G, Totaro I, Panzarino M, Giorgino F, Selvaggi LE. GnRH agonist versus GnRH antagonist in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012; 10.(1), 26.

Deyhoul N, Mohamaddoost T, Hosseini M. Infertility-related risk factors: a systematic review. *Int J Womens Health Reprod Sci*. 2017; 5.(1), 24-29.

Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90.(12), 6609-6615.

Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007; 92.(10), 3958-3966.

Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2006; 147.(3), 1154-1158.

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek J TJ, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999; 140.(12), 5789-5796.

Eppig JJ. Oocyte-somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals. Paper presented at the Seminars in Developmental Biology. 1994.

Eroschenko VP. DiFiore's atlas of histology with functional correlations. 11th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore. 2008. 439-454.

Fernandois D, Na E, Cuevas F, Cruz G, Lara H, Paredes A. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *J Endocrinol*. 2016; 228.(3), 161-170.

Fiedler K, Ezcurra D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012; 10.(1), 32.

Findlay JK, Drummond AE. Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 1999; 10.(5), 183-188.

Franks S. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *International journal of obesity*. 2008; 32.(7), 1035-1041.

Gartner LP. *Textbook of Histology*. 4th edition. Elsevier Health Sciences. Philadelphia. 2017; 529-540.

Gartner LP, Hiath JL, Strum JM. *BRS cell biology and histology*. 6th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore. 2018; 294-298.

Gartner LP, Hiatt JL. *Color atlas and text of histology*. 6th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore. 2012; 416-420.

Gibson E, Mahdy H. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary*. StatPearls Publishing. 2019.

Golzar F, Javanmard SH. The effects of kisspeptin-10 on migration and proliferation of endothelial cell. *Advanced biomedical research*. 2015; 4.

Gómez RI, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*. 2002; 143.(11), 4339-4348.

Gómez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Zimmermann RC, Simon C, Gaytan F, Pellicer A. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011; 96.(8), 2484-2492.

Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. 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*. 2003; 68.(6), 2164-2171.

Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. Gap junctions in the ovaries. *Biology of reproduction*. 1997; 57.(5), 947-957.

Gürkan T, Gülerman C, Özyer Ş. IVF Sikluslarında Kontrollü Ovaryan Stimülasyon. *Türk Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Dergisi*. 2017; 1 (1), 47-53.

Hall JE. *Guyton and Hall: Textbook of Medical physiology*. 13th edition. Elsevier. Philadelphia. 2016; 1037-1043.

Harris S, Chand A, Winship I, Gersak K, Aittomäki K, Shelling A. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2002; 8.(8), 729-733.

Hart RJ. Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics. *Physiological reviews*. 2016; 96.(3), 873-909.

Hauge-Evans A, Richardson C, Milne H, Christie MR, Persaud S, Jones P. A role for kisspeptin in islet function. *Diabetologia*. 2006; 49.(9), 2131-2135.

Henríquez S, Kohen P, Muñoz A, Godoy A, Orge F, Strauss III JF, Devoto L. In-vitro study of gonadotrophin signaling pathways in human granulosa cells in relation to progesterone receptor expression. *Reproductive biomedicine online*. 2017; 35.(4), 363-371.

Holt JE, Jackson A, Roman SD, Aitken RJ, Koopman P, McLaughlin EA. CXCR4/SDF1 interaction inhibits the primordial to primary follicle transition in the neonatal mouse ovary. *Developmental biology*. 2006; 293.(2), 449-460.

Howard C, Reed M. Three-dimensional measurement in microscopy. *Unbiased Stereology*. Oxford, BIOS Scientific. 1998; 39-68.

Howie R, Kay V. Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *British Journal of Hospital Medicine*. 2018; 79 (4), 194-199.

Hu KL, Zhao H, Chang HM, Yu Y, Qiao J. Kisspeptin/kisspeptin receptor system in the ovary. *Frontiers in endocrinology*. 2018; 8, 365.

Hunjan T, Abbara A. Clinical Translational Studies of Kisspeptin and Neurokinin B. Paper presented at the Seminars in Reproductive Medicine. 2019.

Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update*. 2015; 21.(4), 411-426.

Jahromi BN, Parsanezhad ME, Shomali Z, Bakhshai P, Alborzi M, Vaziri NM, Anvar Z. Ovarian hyperstimulation syndrome: a narrative review of its pathophysiology, risk factors, prevention, classification, and management. *Iranian journal of medical sciences*. 2018; 43.(3), 248.

Jayaprakasan K, Chan Y, Islam R, Haoula Z, Hopkisson J, Coomarasamy A, Raine-Fenning N. Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresholds in a prospective cohort of 1,012 women. *Fertility and sterility*. 2012; 98.(3), 657-663.

Jayasena CN, Abbara A, Comminos AN, Nijher GM, Christopoulos G, Narayanaswamy S, Izzi-Engbeaya C, Sridharan M, Mason AJ, Warwick J. Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124.(8), 3667-3677.

Jayasena CN, Nijher GM, Chaudhri OB, Murphy KG, Ranger A, Lim A, Patel D, Mehta A, Todd C, Ramachandran R. Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009; 94.(11), 4315-4323.

Jayasena C, Comminos A, Nijher G, Abbara A, De Silva A, Veldhuis JD, Ratnasabapathy R, Izzi-Engbeaya C, Lim A, Patel D. Twice-daily subcutaneous injection of kisspeptin-54 does not abolish menstrual cyclicity in healthy female volunteers. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013; 98.(11), 4464-4474.

Jayasena C, Dhillon W, Bloom S. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans. *Peptides*. 2009; 30.(1), 76-82.

Jayasena C, Nijher G, Abbara A, Murphy K, Lim A, Patel D, Mehta A, Todd C, Donaldson M, Trew G. Twice-weekly administration of kisspeptin-54 for 8 weeks stimulates release of reproductive hormones in women with hypothalamic amenorrhea. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2010; 88.(6), 840-847.

Joshi S, Davies H, Sims LP, Levy SE, Dean J. Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. *BMC Developmental Biology*. 2007; 7.(1), 67.

Kafa İM, Eyigör Ö. Kisspeptinler ve kisspeptin nöronları: Üreme sistemi üzerine etkileri ve hipotalamik yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2011; 37.(1), 53-60.

Kahyaoğlu İ. Kontrollü Ovaryan Stimülasyonda Kullanılan Protokoller. *Her Yönüyle İn Vitro Fertilizasyon*. 2019; 32.

Kameyama N, Arisawa S, Ueyama J, Kagota S, Shinozuka K, Hattori A, Tatsumi Y, Hayashi H, Takagi K, Wakusawa S. Increase in P-glycoprotein accompanied by activation of protein kinase C α and NF- κ B p65 in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2008; 1782.(5), 355-360.

Kasap E, Turan GA, Eskicioğlu F, Cengiz H, Gur EB, Sivriköz ON, Genç M, Yılmaz O. Comparison between resveratrol and cabergoline in preventing ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Gynecological Endocrinology*. 2016; 32.(8), 634-640.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996; 226.(2), 324-328.

Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biology of reproduction*. 2005; 73.(5), 967-973.

Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology*: Elsevier Health Sciences. 2015.

Kitajima Y, Endo T, Manase K, Nishikawa A, Shibuya M, Kudo R. 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*. 2004; 81, 842-849.

Kitsou C, Kosmas I, Lazaros L, Tzallas C, Tinelli A, Mynbaev O, Prapas N, Prapas I, Dalkalitsis A, Georgiou I. The combination of Everolimus with Verapamil reduces ovarian weight and vascular permeability on ovarian hyperstimulation syndrome: a preclinical experimental randomized controlled study. *Gynecological Endocrinology*. 2016; 32.(11), 886-890.

Kummer NE, Weitzman VN, Benadiva CA, Schmidt DW, Engmann LL, Nulsen JC. In vitro fertilization outcomes in patients experiencing a premature rise in luteinizing hormone during a gonadotropin-releasing hormone antagonist cycle. *Fertility and sterility*. 2011; 95.(8), 2592-2594.

Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS letters*. 1999; 446.(1), 103-107.

Lee J, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88, 1731-1737.

Lee KH, Kim SH, Jee BC, Kim YJ, Suh CS, Kim KC, Lee WD. Comparison of clinical characteristics between early and late patterns in hospitalized patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and sterility*. 2010; 93.(7), 2274-2280.

Lee KF, Chow JF, Xu JS, Chan ST, Ip SM, Yeung WS. A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biology of reproduction*. 2001; 64.(3), 910-917.

Lee TH, Liu CH, Huang CC, Wu YL, Shih YT, Ho HN, Yang YS, Lee MS. Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Human reproduction*. 2008; 23.(1), 160-167.

Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, Reddy P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Developmental biology*. 2006; 299.(1), 1-11.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 2001; 25.(4), 402-408.

Luke B, Brown MB, Morbeck DE, Hudson SB, Coddington III CC, Stern JE. Factors associated with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) and its effect on assisted reproductive technology (ART) treatment and outcome. *Fertility and sterility*. 2010; 94.(4), 1399-1404.

MacDougall MJ, Tan SL, Balen A, Jacobs HS. A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilization. *Human reproduction*. 1993; 8.(2), 233-237.

Machtiger R, Combelles CM, Missmer SA, Correia KF, Williams P, Hauser R, Racowsky C. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human reproduction*. 2013; 28.(10), 2735-2745.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*. 2012; 9.(12).

Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 320.(2), 383-388.

Medicine P. C. o. t. A. S. f. R. Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: a guideline. *Fertility and sterility*. 2016; 106.(7), 1634-1647.

Merritt BA, Behr SC, Khati NJ. *Imaging of Infertility, Part 1: Hysterosalpingograms to MR imaging*. Radiologic Clinics. 2019.

Millar RP, Newton CL. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nature Reviews Endocrinology*. 2013; 9.(8), 451.

Miller I, Chuderland D, Grossman H, Ron-El R, Ben-Ami I, Shalgi R. The dual role of PEDF in the pathogenesis of OHSS: negating both angiogenic and inflammatory pathways. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016; 101.(12), 4699-4709.

Miller I, Chuderland D, Ron-El R, Shalgi R, Ben-Ami I. GnRH agonist triggering modulates PEDF to VEGF ratio inversely to hCG in granulosa cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015; 100.(11), E1428-E1436.

Nardo L, Bosch E, Lambalk C, Gelbaya T. Controlled ovarian hyperstimulation regimens: a review of the available evidence for clinical practice. Produced on behalf of the BFS Policy and Practice Committee. *Human fertility*. 2013; 16.(3), 144-150.

Nastri CO, Ferriani RA, Rocha IA, Martins WP. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2010; 27.(2-3), 121-128.

Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of reproduction*. 2003; 69.(4), 1265-1272.

Olooto WE, Amballi AA, Banjo TA. A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *J Microbiol Biotech Res*. 2012; 2.(3), 379-385.

Owens L, Abbara A, Lerner A, O'floinn S, Christopoulos G, Khanjani S, Islam R, Hardy K, Hanyaloglu A, Lavery S. The direct and indirect effects of kisspeptin-54 on granulosa lutein cell function. *Human reproduction*. 2018; 33.(2), 292-302.

Ozgun S, Oktem M, Altinkaya SO, Oktem EO, Cenksoy C, Erdem O, Elbeg S, Helvacı A, Erdem A, Erdem M. The effects of resveratrol on ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2018; 57.(3), 383-388.

Özpuolat F. Yardimci Üreme Teknikleri, Etik Ve Sağlık Personelinin Sorumluluklari. *Sağlık Akademisi Kastamonu*. 2017; 2.(2), 112-131.

Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bachvarova RF. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Developmental biology*. 1994; 161.(1), 194-205.

Palumbo A, Ávila J, Naftolin F. The Ovarian Renin–Angiotensin System (OVRAS) A Major Factor in Ovarian Function and Disease. *Reproductive Sciences*. 2016; 23.(12), 1644-1655.

Papanikolaou EG, Verpoest W, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P, Tournaye H. A novel method of luteal supplementation with recombinant luteinizing hormone when a gonadotropin-releasing hormone agonist is used instead of human chorionic gonadotropin for ovulation triggering: a randomized prospective proof of concept study. *Fertility and sterility*. 2011; 95.(3), 1174-1177.

Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*. 1999; 140.(9), 4262-4271.

Pellicer N, Galliano D, Pellicer A. Ovarian hyperstimulation syndrome The Ovary. *Elsevier*. 2019; 345-362.

Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology*. 1990; 127.(2), 965-967.

Ratna M, Bhattacharya S, Abdulrahim B, McLernon D. A systematic review of the quality of clinical prediction models in in vitro fertilisation. *Human reproduction*. 2020; 35.(1), 100-116.

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*. 2008; 319.(5863), 611-613.

Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, Lindgren P, Liu YX, Sun QY, Liu K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental biology*. 2005; 281.(2), 160-170.

Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development. Springer. 2016; 167-190

Roa J, Vigo E, Garcia-Galiano D, Castellano JM, Navarro VM, Pineda R, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008; 294.(6), E1088-E1096.

Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of cell science*. 1995; 108.(6), 2369-2379.

Roeckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Experimental cell research*. 1998; 241.(1), 161-170.

Ross MH, Pawlina W. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 2016. 834-390.

Roupa Z, Polikandrioti M, Sotiropoulou P, Faros E, Koulouri A, Wozniak G, Gourni M. Causes of infertility in women at reproductive age. *Health Science Journal*. 2009; 3.(2).

Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji*. Çeviren: Başaklar AC. 10.basım. Palme Yayıncılık. Ankara. 2011, s:313-355.

Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2012; 1822.(12), 1896-1912.

Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Ross LM, Lamperti ED. *Prometheus Anatomi Atlası: Baş, Boyun ve İç Organlar*. Çeviri Editörü: Yıldırım M. 1. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 2009; 244-254.

Scotti L, Abramovich D, Pascuali N, Irusta G, Meresman G, Tesone M, Parborell F. Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014; 144, 392-401.

Seminara SB, DiPietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Plant TM. Continuous human metastatin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male

Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology*. 2006; 147.(5), 2122-2126.

Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349.(17), 1614-1627.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995; 376.(6535), 62-66.

Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*. 1997; 385.(6616), 525-529.

Singh P, Krishna A. Effects of GnRH agonist treatment on steroidogenesis and folliculogenesis in the ovary of cyclic mice. *Journal of ovarian research*. 2010; 3.(1), 26.

Soares SR, Gómez R, Simón C, García-Velasco JA, Pellicer A. Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Human reproduction update*. 2008; 14.(4), 321-333.

Song WJ, Mondal P, Wolfe A, Alonso LC, Stamateris R, Ong BW, Lim OC, Yang KS, Radovick S, Novaira HJ. Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion. *Cell metabolism*. 2014; 19.(4), 667-681.

Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 2000; 127.(21), 4645-4654.

Starc A, Trampuš M, Pavan Jukić D, Grgas-Bile C, Jukić T, Polona Mivšek A. Infertility and Sexual Dysfunctions: A Systematic Literature Review. *Acta clinica Croatica*. 2019; 58.(3.), 508-515.

Sullivan SD, Castrillon DH. Insights into primary ovarian insufficiency through genetically engineered mouse models. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine. 2011.

Sun HY, Li Q, Liu YY, Wei XH, Pan CS, Fan JY, Han JY. Xiao-Yao-San, a Chinese medicine formula, ameliorates chronic unpredictable mild stress induced polycystic ovary in rat. *Frontiers in physiology*. 2017; 8, 729.

Szamatowicz M, Szamatowicz J. Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility. *Advances in Medical Sciences*. 2020; 65.(1), 93-96.

Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2017; 96.(6), 659-667.

Tang H, Hunter T, Hu Y, Zhai SD, Sheng X, Hart RJ. Cabergoline for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012; 2.

Tatar HK, Ürünsak İF, Khatib G, Güleç ÜK, Çetin T, Seydaoğlu G. Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon Uygulanan Olgularda Overyan Hiperstimülasyon Sendromu Görülme İnsidansı ve Risk Faktörleri. *Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2013; 23.(3), 176-185.

Tehraninejad ES, Hafezi M, Arabipoor A, Azimineko E, Chehrazi M, Bahmanabadi A. Comparison of cabergoline and intravenous albumin in the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: a randomized clinical trial. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012; 29.(3), 259-264.

Thomsen L, Humaidan P. Ovarian hyperstimulation syndrome in the 21st century: the role of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger and kisspeptin. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2015; 27.(3), 210-214.

Timmons D, Montrieff T, Koyfman A, Long B. Ovarian hyperstimulation syndrome: A review for emergency clinicians. *The American journal of emergency medicine*. 2019; 37 (8), 1577-1584.

Tng EL. Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore medical journal*. 2015; 56.(12), 649.

Tortora GJ, Derrickson BH. *Principles of anatomy and physiology*. 15th edition. John Wiley and Sons. USA. 2017; 1073-1076.

Tso LO, Costello MF, Albuquerque LET, Andriolo RB, Macedo CR. Metformin treatment before and during IVF or ICSI in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014; (11).

Turan GA, Eskicioglu F, Sivrikoz ON, Cengiz H, Adakan S, Gur EB, Tatar S, Sahin N, Yilmaz O. Myo-inositol is a promising treatment for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): an animal study. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2015; 292.(5), 1163-1171.

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human molecular genetics*. 2004; 13.(11), 1171-1181.

Udar N, Yellore V, Chalukya M, Yelchits S, Silva-Garcia R, Consortium B, Small K. Comparative analysis of the FOXL2 gene and characterization of mutations in BPES patients. *Human mutation*. 2003; 22.(3), 222-228.

van den Driesche S, Myers M, Gay E, Thong KJ, Duncan WC. HCG up-regulates hypoxia inducible factor-1 alpha in luteinized granulosa cells: implications for the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A in the human corpus luteum. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2008; 14.(8), 455-464.

van Wely M, Kwan I, Burt AL, Thomas J, Vail A, Van der Veen F, Al-Inany HG. Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011; (2).

Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*. 2018; 62, 2-10.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Toulis KA, Goulis DG, Papadimas I, Tarlatzis BC. Intravenous albumin administration for the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertility and sterility*. 2011; 95.(1), 188-196. e183.

Villasante A, Pacheco A, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco J. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007; 92.(1), 314-321.

Wahab F, Riaz T, Shahab M. Study on the effect of peripheral kisspeptin administration on basal and glucose-induced insulin secretion under fed and fasting conditions in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hormone and metabolic research*. 2011; 43.(01), 37-42.

Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PloS one*. 2010; 5.(1).

Wang T, Cui X, Xie L, Xing R, You P, Zhao Y, Yang Y, Xu Y, Zeng L, Chen H. Kisspeptin receptor GPR54 promotes adipocyte differentiation and fat accumulation in mice. *Frontiers in physiology*. 2018; 9, 209.

Wang YZ, Kou S, Gu LY, Zheng Q, Li M, Qi F, Zhao H, Wang L. Effects of Zuogui Pill (左归丸) and Yougui Pill (右归丸) on the expression of brain-derived neurotrophic factor and cyclic adenosine monophosphate/protein kinase a signaling transduction pathways of axonal regeneration in model rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Chinese journal of integrative medicine*. 2014; 20.(1), 24-30.

Wei LH, Chou CH, Chen MW, Rose-John S, Kuo ML, Chen SU, Yang YS. The role of IL-6 trans-signaling in vascular leakage: implications for ovarian hyperstimulation syndrome in a murine model. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013; 98.(3), E472-E484.

Williams CJ, Erickson GF. *Morphology and physiology of the ovary* Endotext: MDText. com, Inc. 2012.

Yilmaz E, Gul M, Melekoglu R, Koleli I. Immunohistochemical analysis of nuclear factor kappa Beta expression in etiopathogenesis of ovarian tumors. *Acta cirurgica brasileira*. 2018; 33.(7), 641-650.

Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental biology*. 1997; 184.(1), 122-137.

Youssef MA, Abou-Setta AM, Lam WS. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for final oocyte maturation triggering in IVF and ICSI cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016; (4).

Yuan YZ, Yuan F, Xu QY, Yu J, Li L, Zhang JI. Effect of Fufang Xueshuantong Capsule (复方血栓通胶囊) on a rat model of retinal vein occlusion. *Chinese journal of integrative medicine*. 2011; 17.(4), 296-301.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*. 2017; 32.(9), 1786-1801.

Zhai J, Liu J, Zhao S, Zhao H, Chen ZJ, Du Y, Li W. Kisspeptin-10 inhibits OHSS by suppressing VEGF secretion. *Reproduction*. 2017; 154.(4), 355-362.

Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *The American Journal of Human Genetics*. 2008; 82.(6), 1342-1348.

Zhu C, Zhang X, Qiao H, Wang L, Zhang X, Xing Y, Wang C, Dong L, Ji Y, Cao X. The intrinsic PEDF is regulated by PPAR γ in permanent focal cerebral ischemia of rat. *Neurochemical research*. 2012; 37.(10), 2099-2107.

10. EKLER

EK 1




T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
07.02.2018	5	31

Karar 31- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim 151348004 numaralı doktora programı öğrencisi Hülya BİRİNCİ'nin tez konusunun etik kurul onayı alınması kaydı ile "Deneyel OHSS Modelinde Kisspeptin-54 Uygulamasının Granüloza Hücrelerindeki VAGF ve PEDF Seviyelerine Etkisi" olarak belirlenmesine OY BİRLİĞİ ile karar verildi.

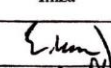
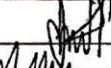
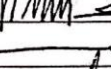
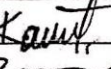
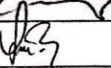
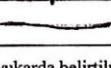
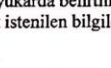

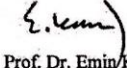
e-imzalıdır Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü	e-imzalıdır Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
e-imzalıdır Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	e-imzalıdır Doç. Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Doç. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye	e-imzalıdır Aynur PALAMUTÇUOĞLU Enstitü Sekreteri

Aslı Gibidir
01/06/2020


Ayşe ERTİK
Enstitü Sekreteri V.



T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	25/04/2017 / 77.637.435 -		
ARAŞTIRMANIN ADI	Deneysel OHSS Modelinde Kisspeptin-54 Uygulamasının Grantuloza Hücrelerindeki VEGF ve PEDF Seviyelerine Etkisi		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER - MCBÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Arş. Gör. Hülya Birinci, Prof. Dr. Mehmet Yüncü		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/>	Yüksek Lisans/Doktora <input type="checkbox"/>	Akademik <input checked="" type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	13 / 04 / 2017 / Tarih ve 16850 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM Müdürü		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<p>Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.</p> <p style="text-align: right;"> Prof. Dr. Emin KURT Başkan</p>			

ASLI GIBİDİR
Yaşın İŞİN
Fakülte Sekreteri



02 Kasım 2018

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı: Deneysel OHSS Modelinde Kisspeptin-54 Uygulamasının Granüloza Hücrelerindeki VEGF ve PEDF Seviyelerine Etkisi


Tezime ilişkin 04/05/2020 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza

04.05.2020

Adı Soyadı : Hülya Birinci
Öğrenci No : 151348004
Anabilim Dalı : Histoloji- Embriyoloji AD.
Programı : Doktora


DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-*İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir*; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- *Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.*
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	HÜLYA	Soyadı	BİRİNCİ
Doğum Yeri	Antakya	Doğum Tarihi	16.07.1989
Uyruğu	TC	Tel	05302221520
E-mail	hulya_brnc89@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2020
Yüksek Lisans	Gaziantep Üniversitesi	2016
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2012
Lise	Antakya Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi	Gaziantep Üniversitesi	2013-2016
Araştırma Görevlisi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2016-2017
Araştırma Görevlisi	Gaziantep Üniversitesi	2017-Devam ediyor

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
70								

Bilgisayar Bilgisi

Microsoft Office-İyi