



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GENÇ VE YAŞLI RATLARDA TEKRARLAYAN KONTROLLÜ  
OVARYUM HİPERSTİMULASYON TEDAVİSİNİN GENİTAL VE  
ENDOKRİN SİSTEM ORGANLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
MORFOMETRİK OLARAK İNCELENMESİ**

**E. Nazlı HAYIRLI**

**HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Oya EVİRGEN**

**2011-ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENÇ VE YAŞLI RATLARDA TEKRARLAYAN KONTROLLÜ  
OVARYUM HİPERSTİMULASYON TEDAVİSİNİN GENİTAL VE  
ENDOKRİN SİSTEM ORGANLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
MORFOMETRİK OLARAK İNCELENMESİ**

**E. Nazlı HAYIRLI**

**HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Oya EVİRGEN**

**Bu tez Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından  
10B 3330027 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2011-ANKARA**

## KABUL VE ONAY SAYFASI



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ



### DOKTORA YÜKSEK LİSANS TEZ SINAV TUTANAĞI

Öğrencinin Adı Soyadı : E. Nazlı HAYIRLI  
 Öğrenci No : 08713401  
 Anabilim Dalı : HISTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ  
 Programı : Yüksek Lisans (x) Doktora ( )  
 Tez Konusu : Genç ve Yaşlı Ratlarda Testislerin Kontrollü Ovaryum  
 Hiperstimülasyon Tedavisinin Genital ve Endokrin Sistem  
 Sınav Tarihi : 26.12.2011 Organları Üzerindeki Etkisinin Morfometrik  
 Sınav Başlama Saati : 14<sup>00</sup> - 15<sup>00</sup> Olarak İncelenmesi  
 Sınav Bitiş Saati :

**Karar:** Tez sınavı sonucunda, yukarıda konusu belirtilen tezin, aşağıdaki gerekçeler doğrultusunda:

- Kabulüne  
 Düzeltilmesine  
 Reddine

Oybirliği/oyçokluğu ile karar verilmiştir.

Gereke:

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Cevat AKBAY

Prof. Dr. Üye Belgin Can Buncal

Üye Doç. Dr. Sıvan Yılmaz  
Sunulur

Prof. Dr. Üye Öya Evirgen

Üye

Prof. Dr. Asuay Sungur

Ekler:

- Tez jürisi bireysel raporları
- Dinleyici listesi

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	ix
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Ovaryum	1
1.2 Ovaryum Histolojisi	1
1.3 Folikül Gelişimi	4
1.3.1 Primordiyal Foliküller	4
1.3.2 Primer Foliküller	6
1.3.3 Sekonder Foliküller	10
1.3.4 Olgun Folikül= Graaf Folikülü	13
1.4.Ovulasyon	14
1.5. Korpus Luteum	17
1.6.Ovaryumların Embriyolojisi	18
1.7.In Vitro Fertilizasyon Tarihi	19
1.8.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyonu (KOH)	21
1.8.1.KOH Tedavisinde Kullanılan Ajanlar	22
1.8.1.1.Klomifen Sitrat	22
1.8.1.2.Aromataz İnhibitörleri	23
1.8.1.3.İnsan Koryonik Gonadotropini(hCG)	23
1.8.1.4. Gonadotropinler	23
1.8.1.5 İnsan Menopozal Gonadotropini	24
1.8.1.6.Gonadotropin salgılatıcı hormon	24
1.8.1.6.1 Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonistleri	25
1.8.1.6.2 Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Antagonistleri	25
1.9.Ovaryum Stimülasyonunun Yan Etkileri ve Komplikasyonlar	26
1.9.1.Ovaryum Hiperstimülasyon Sendromu(OHSS)	26
1.9.2.Venöz Tromboembolizm(VTE)	26
1.9.3.Çoklu Gebelikler	26
1.9.4.İleri Dönem Ovaryum Kanseri Riski	27
<b>2.GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>28</b>
2.1.Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Eldesi	28
2.2.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyon(KOH) Protokolü	30
2.3.Işık Mikroskobik Değerlendirme İçin Yapılan Çalışmalar	31
2.4.Elektron Mikroskobu Doku Takibi İçin Yapılan Çalışmalar	33
2.5.Ovaryum Follikül sayımı için kullanılan Stereoloji Yöntemi	35
2.5.1.Sayım Kuralları ve Folikül Tanımlaması	37
2.6.İstatistiksel Değerlendirme İçin Yapılan Çalışmalar	38

<b>3.BULGULAR</b>	<b>39</b>
3.1. Işık mikroskobu Değerlendirme Bulguları	39
3.2. Stereolojik Yöntem Folikül Sayımı Bulgularının İstatistiksel Değerlendirmesi	47
<b>4.TARTIŞMA</b>	<b>49</b>
<b>5.SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>52</b>
<b>ÖZET</b>	<b>53</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>54</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>55</b>
<b>EKLER</b>	<b>58</b>
Ek-1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Karar Örneği	58
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>60</b>

## ÖNSÖZ

Kontrollü ovaryum hiperstimülasyonu(KOH) yardımıyla üreme tekniklerine(YÜT) başvuran hastalarda birden fazla oosit elde etmek, ovulasyon zamanını kontrol etmek ve tedavi sonrası gebelik oranını artırmak amacıyla uzun zamandır klinikte uygulanmaktadır. Ovaryumu stimüle etmek için kullanılan eksojen hormonlar zamanla geliştirilmiş ve günümüzde rekombinant teknoloji ile üretilen %99,9 oranında saflığa sahip FSH ve LH preparatları kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler devam ederken kullanılan eksojen hormonların ovaryum dokusunun yapısına, oosit kalitesine ve ovaryum rezervi üzerine etkileri de araştırmacılar tarafından merak konusu olmuştur. Bu yüksek lisans tezi çalışmasında da farklı tekrar sayılarında uygulanan KOH tedavisinin genç ve yaşlı ratlarda ovaryum dokusu yapısına ve ovaryum rezervine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından 10B 3330027 proje numarası ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca yetişmemde büyük emekleri geçen, her zaman destek ve anlayışla yaklaşan Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof.Dr. Canan AKBAY'a,

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmalarımda bilgi birikimi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda bana örnek ve yardımcı olan değerli tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Oya EVİRGEN'e,

Eğitimim boyunca emekleri geçen kıymetli hocalarım, Sayın Prof.Dr.Cengiz GÜVEN'e, Sayın Prof.Dr.Nurşen SARAÇ'a, Sayın Prof.Dr.Yüksel SARAN'a, Sayın Prof.Dr. Esra ERDEMLİ'ye, Sayın Prof.Dr.Alp CAN'a, Sayın Prof.Dr.Belgin CAN'a, Sayın Prof.Dr.Bizden SABUNCUOĞLU'na, Sayın Doç.Dr.Sevim AYDIN'a, Sayın Yrd.Doç.Dr.Deniz BİLLUR'a,

Tez çalışmalarım sırasında verdiği destekten dolayı Hacettepe Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Sinan YÜRÜKER'e,

Her zaman bana destek ve yardımcı olan arkadaşlarım Uzm.Dr.Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a, Arş.Gör.Dr.Hilal GÖKTÜRK'e, Arş.Gör.Dr.Zeynep GÜLHAN'a, Bio.Şule KIZIL'a, Vet.Hek.Masoud AFŞANI'ye, Bio.Deniz BALCI'ya, Arş.Gör.Bio.Fırat AKAT'a ve anabilim dalı çalışanlarımız Nezihe AKÇAKAYA, İlkay BEKTAŞ, Hüseyin SOLMAZ,Erdoğan ÇALIŞKAN, Kerim DİLBAZ ve Remzi ATA'ya,

Uzarlarda olacak olsada desteğini hep yanımda hissedeceğim sevgili arkadaşım Uzm.Psikolog Korhan BÜYÜKTÜRKÖĞLU'na, can dostlarım Pınar ÖNGÜN ve Aydan YÜCELEN'e,

Bu günlere gelmemde her türlü emek ve sabrı gösteren başta çok kıymetli ANNEM'e, BABAM'a ve ağabeylerime,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	: Kalsiyum iyonu
<b>E2</b>	: Östradiol
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>FSH</b>	: Folikül stimüle edici hormon
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>hCG</b>	: İnsan koryonik gonadotropini
<b>H-E</b>	: Hematoksilen eozin
<b>hMG</b>	: İnsan menopozal gonadotropini
<b>IGF-1</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
<b>IVF</b>	: In vitro fertilizasyon
<b>KL</b>	: Korpus luteum
<b>KOH</b>	: Kontrollü ovaryum hiperstimülasyonu
<b>LH</b>	: Lüteinize edici hormon
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>OHSS</b>	: Ovaryum hiperstimülasyon sendromu
<b>OMI</b>	: Oosit maturasyon inhibitörü
<b>PAS</b>	: Periyodik asit Schiff
<b>PMS</b>	: Pregnant mare serum (Hamile dişi at serumu)
<b>PMSG</b>	: Pregnant mare serum gonadotropin (Hamile dişi at serum gonadotropini)
<b>rhCG</b>	: Rekombinant insan koryonik gonadotropini
<b>rFSH</b>	: Rekombinant folikül stimüle edici hormon
<b>SRY</b>	: Cinsiyet belirleyici Y bölgesi
<b>TDF</b>	: Testis belirleyici faktör
<b>TNF</b>	: Tümör nekrozis faktör
<b>VTE</b>	: Venöz tromboembolizm
<b>YÜT</b>	: Yardımla üreme teknikleri
<b>ZP</b>	: Zona pellusida

## ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Ovaryum korteks ve medulla bölgelerini oluşturan elemanlar 3
- Şekil 1.2.A-B** Primordiyal Folikül, 1.2 A oklar: primordiyal folikül, GEp: germinal epitelyum, KL: korpus luteum, yıldız: primer folikül Hematoksilen-Eozin, Bar:20µm 1.2 B ok primordiyal folikül, yıldız: tek katlı yassı epitel, N: oosit çekirdeği yarı ince kesit , Toluidin Mavisi, Bar: 10µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı) 5
- Şekil 1.3.** Primer Foliküller **A.**ok başı: çok katlı primer folikül, ok: tek katlı primer folikül, H-E, X20 objektif Bar:20 µm **B.** Ok başları: kübik ve prizmatik folikül hücreleri, yıldız: primordiyal folikül, yarı ince kesit, toluidine Mavisi, X40 objektif, Bar:10 µm **C.** Ok başı çok katlı primer folikül, GH: granüloza hücreleri, OSp: Oosit sitoplazması, yıldız: zona pellusida, K:Kapiller, yarı ince kesit, toluidine mavisi, X20 objektif, Bar: 20 µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı) 7
- Şekil 1.4.**Sekonder folikül **A.** Ok başı: Sekonder Folikül, A: Yeni oluşmaya başlayan Antrum, N: Çekirdek, GH:Granüloza hücre tabakaları, Tk: Teka tabakası, ok: primordiyal folikül, H-E, X40 objektif, Bar: 10 µm **B.** Ok başı: Ovaryum korteksinde sekonder (Antral) folikül, A:Antrum boşlukları, GH:Granüloza hücre tabakaları, Tk: Teka tabakası, GEp: Germinal epitel, H-E, X20 objektif, Bar: 20 µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı) 12
- Şekil 1.5.** Sekonder folikül A: Antrum sıvı birikimi, ZP: Oositi çevreleyen zona pellusida, GH: granüloza hücre tabakaları, Ok başı:Teka tabakası, TI: Teka İnterna, TE: Teka eksterna, K: kapiller, Ok: primordiyal folikül, KL: korpus luteum, yarı ince kesit, Toluidine Mavisi, X20 objektif, Bar: 20 µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı) 13
- Şekil 1.6.** Ovaryum Korteksinde Graff folikülü A: Antrum boşluğu, KO: Kümülüs Ooforus, GH:Granüloza hücre tabakaları, Tk: Teka tabakası, KL:Korpus luteum, H-E, X10 objektif, Bar: 50 µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı) 14
- Şekil 1.7.** Ovulasyon (Kierszenbaum A.L, Histoloji ve Hücre Biyolojisi'nden alınmıştır) 17
- Şekil 2.1.** Dorso-ventral pozisyonda diseksiyon tahtasına yatırılarak sabitleme 30
- Şekil 2.2. A:** Abdominal kavite açıldıktan sonraki görünüm **B:** overlerin ucu künt bir pens yardımıyla etrafındaki yağ tabakası ile birlikte çıkarılması 30



- Şekil 2.3.** Seçilmiş ovaryum alanına yerleştirilmiş sayım çerçeveleri  
Yıldız: bir adet tarafsız sayım çerçevesi, Oklar X4 objektifte seçilmiş  
ovaryum alanı sınırları 36
- Şekil 2.4.** Primordiyal ve Primer Folikül Primordiyal F: Tek katlı yassı  
epitelle çevrili primordiyal folikül, Primer F1: Tek katlı kübik epitelle  
çevrili primer folikül, Primer F2: Tek katlı prizmatik epitelle döşeli ileri  
gelişmiş primer folikül, M: Mitozun metafaz evresindeki folikül hücresi ,  
N: Oosit Çekirdekleri, KL: Korpus luteum, yarı ince kesit, Toluidine mavisi,  
X100 objektif, Bar: 10µm 37
- Şekil 3.1.. A.** Gf: Graff folikülü, Sf: sekonder folikül, TU: tuba uterina  
enine kesiti, KL: korpus luteum, ok: değişik gelişim aşamalarındaki foliküller,  
H-E, X4 objektif, Bar: 100 µm **B.** Ok: zona pellusida, ok başı: folikül bazal  
membranı, PAS, X20 objektif, Bar: 20 µm **C.** GEp: germinal epitel, KL: korpus  
luteum, yıldızlar: stroma bağ dokusu, MA, X20, Bar: 20 µm 40
- Şekil 3.2.** Ovaryum Stromasında Foliküller Ok başı: Primer folikül, yıldızlar:  
primordiyal folikül, Atr F.: atretik folikül, H-E, X40 objektif, Bar: 10µm 41
- Şekil 3.3.** Ovaryum korteksinde primordiyal foliküller, GE: germinal epitelyum,  
KL: korpus luteum, yıldızlar: primordiyal foliküller, H-E, X20 objektif,  
Bar: 20µm 42
- Şekil 3.4.** Granüloza hücrelerinde mitoz, oklar: mitoz geçiren granüloza  
hücreleri, H-E, X40 objektif, Bar: 10µm 42
- Şekil 3.5.** Ovaryum germinal epiteli ile ilgili bulgular **A.** KL: korpus luteum,  
K: kapiller, yıldız: primordiyal folikül, ok: kübik epitel, ok başı: yassı  
epitel, H-E, X40 objektif, Bar: 10µm ; **B.** GE: germinal epitel, GLH:  
granüloza lütein hücreleri, KL: korpus luteum, yıldız: primordiyal folikül,  
ok: epitel hücre kümelenmesi, H-E, X40 objektif, Bar: 10µm; **C.** KL: korpus  
luteum, ok: yassı epitel, yıldız: prizmatik yüzey epiteli, ok başı: epitelin over  
stromasına yaptığı girinti, H-E, X20 objektif, Bar: 20µm; **D.** KL: korpus luteum,  
GLH: granüloza lütein hücreleri, GE: germinal epitel, yıldızlar: yüzey epiteli  
bazal membranı, PAS, X40 objektif, Bar: 10µm 45
- Şekil 3.6.** **A.** KH: korpus hemorajikum, yıldızlar: ovaryan medullada dilate  
damarlar ve staz, H-E, X40 objektif, Bar: 100µm; **B.** KL: korpus luteum,  
D: damar, M: mast hücreleri, yarı ince kesit, toluidine mavisi, X20 objektif,  
Bar: 20µm; **C.** L: damar lümeni, M: mast hücreleri, yarı ince kesit, toluidine  
mavisi, X40 objektif, Bar: 10µm 47

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1.</b> Deney grupları ve içerdikleri hayvan sayıları	29
<b>Çizelge 3.1.</b> Genç ve yaşlı ratlarda kontrol ve deney gruplarında ovaryumdaki toplam primordiyal, primer ve NGF sayıları	48

# 1.GİRİŞ

## 1.1 Ovaryum

Ovaryumlar birbiri ile ilişkili iki fonksiyona sahiptir;

1. Gametogenezis: Gametlerin üretimidir. Kadınlarda gamet üretimine oogenezis denmektedir.
2. Steroidogenesis: Steroid hormonların üretimidir. Ovaryumlar tarafından iki ana steroid hormon grubu salgılanmaktadır.
  - Östrojenler: İç ve dış cinsiyet organlarının büyüme ve olgunlaşmasını indükler. Pubertede kadın cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumludur. Ayrıca meme gelişiminde duktal ve stromal büyümeyi ve yağ doku birikimini stimule ederek meme bezi gelişimi üzerinde de etkilidir.
  - Progesteronlar: Endometriyumdaki sekresyon değişikliklerini uyararak uterusu doğuma hazırlar. Meme bezinde lobüler proliferasyonu indükleyerek laktasyona hazırlar.

İki hormon da uterus endometriyum tabakasını döllenmiş oositin implantasyonuna hazırlamada önemli bir role sahiptir. İmplantasyon gerçekleşmezse uterus endometriyumu dejenere olur ve menstruasyon kanaması ile endometriyum fonksiyonalsis tabakası dökülerek vajinal yolla dışarı atılır. (Ross ve Pawlina 2011).

## 1.2 Ovaryum Histolojisi

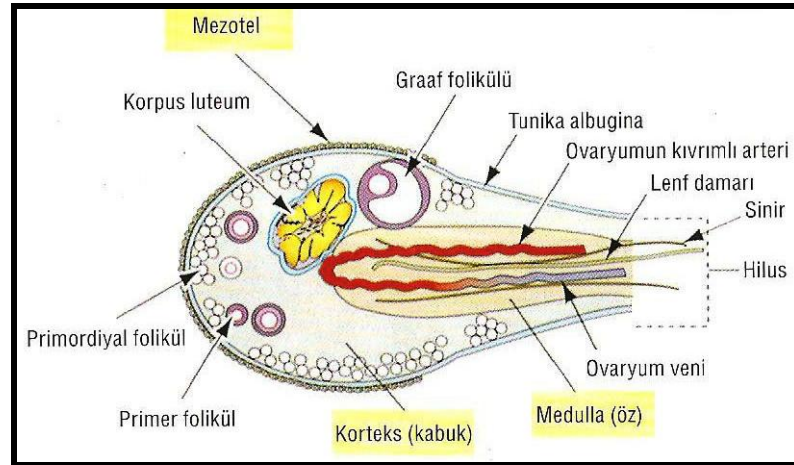
Doğum yapmamış kadınlarda ovaryumlar bir çift, badem şeklinde, pembemsi beyaz yapıda yaklaşık 3cm uzunlukta, 1,5cm genişlikte ve 1cm kalınlığındadır. Her ovaryum mezovaryum denen peritoneal katlantıyla broad ligamentin arka yüzüne tutunurlar. Tubal kutup ise pelvik duvara ovaryumun damar ve sinirlerini taşıyan asıcı bağı ile tutunur. Ovaryum yüzeyi puberteden önce düzdür ancak üreme dönemi

boyunca tekrarlayan ovulasyonlar nedeniyle giderek yaralı (skarlı) ve düzensiz hale gelir. Postmenopozal kadınlarda ovaryum büyüklüğü üreme dönemi süresince gözlenen boyutun dörtte biri kadardır.

Boyuna alınan bir ovaryum kesitinde iki belirgin bölge açığa çıkar (Ross ve Pawlina 2011). Medulla veya medullar bölge; ovaryumun merkezi kısmında saptanmış bağ dokusu hücreleri, interstisiyel hücreler ve hilar hücrelere ev sahipliği yapan damardan oldukça zengin fibroelastik bağ dokusudur. Ayrıca büyük kan damarları, lenfatik damarlar ve sinir fibrilleri içerir. Premenstrual insan ovaryumu östrojen salgılayan birkaç küme halinde epitelioid interstisiyel hücre içerir. Bu hücrelere topluca interstisiyel bez denir. Hilus hücreleri ise medulladaki diğer bir grup epitelioid hücre grubunu oluşturur. Testisdeki Leydig hücreleri ile benzer hücresel organizasyona sahiptir ve androjen salgırlar (Gartner ve Hiatt 2007).

Korteks veya kortikal bölge; ovaryumun medullayı kuşatan periferal kısmında bulunur. Korteks zengin hücreli bağ dokusunun içinde gömülü halde bulunan ovaryum foliküllerini içerir. Stromada foliküller etrafında dağınık düz kas fibrilleri bulunur. Medulla ve korteks arasındaki sınır belirsizdir (Ross ve Pawlina 2011).

Ovaryum yüzeyi tek katlı kübik hücrelerle bazı bölgelerde ise neredeyse yassı hücrelerle döşelidir. Bu hücre tabakası “germinal epitel” olarak bilinir ve mezovaryumu döşeyen mezotelyum ile devam eder. Germinal epitel terimi embriyonal gelişim sırasında dişi gamet (germ) hücrelerinin gelişim bölgesi olarak düşünülmüş olması nedeniyle geçmişten gelen yanlış bir tanımlama olmasına karşın bazı kaynaklarda halen kullanılmaktadır. Günümüzde primordiyal germ hücrelerinin ekstragonadal orijinli oldukları ve embriyonik yolk kesesinden embriyonik gonadın korteksine göç ettikleri ve ovaryumun farklılaşmasını indükledikleri bilinmektedir (Ross ve Pawlina 2011). Germinal epitelin hemen altında tunika albuginea denen damardan fakir, kaba düzensiz kollajen telleri içeren bağ dokusu kapsül bulunur (Gartner ve Hiatt 2007)(Şekil 1.1).



**Şekil 1.1.** Ovaryum korteks ve medulla bölgelerini oluşturan elemanlar (Kierszenbaum A.L, Histoloji ve Hücre Biyolojisi'nden alınmıştır)

Her biri tek oosit içeren çeşitli büyüklüklerdeki ovaryum folikülleri korteks stromasında dağınık halde bulunurlar. Folikülün büyüklüğü oositin gelişimsel durumunu belirtir. Oogenezin erken aşamaları mitotik bölünmelerle oogonia sayısının düzenli olarak arttığı fetal yaşam sırasında meydana gelir. Oositler doğumda gelişimin birinci mayoz bölünmesinde duraklamış halde bulunurlar. Puberte süresinde küçük folikül grupları siklik büyüme ve olgunlaşma dönemleri geçirirler. İlk ovulasyon menarştan bir yıl veya daha uzun süre sonra meydana gelmez. Foliküler olgunlaşma ve ovulasyonun siklik düzeni menstrual siklusla paralel olarak kurulur. Genelde her menstrual siklusta yalnızca bir oosit tam olgun hale ulaşır ve ovaryumdan salınır. Ovulasyonla birden fazla oositin olgunlaşp salınması çoklu zigot oluşumuna neden olur. Reprodüktif yaşam süresince bir kadın sadece 400 olgun oosit üretebilir. Doğumda mevcut olan tahmini 600.000 ile 800.000 kadar primer oosit olgunlaşmayı tamamlayamaz ve aşamalı olarak atrezi, spontan ölüm ve daha sonra rezorbsiyon aracılığı ile ortadan kaldırılır. Bu işlem fetal yaşamın beşinci ayı gibi erken bir zamanda başlar ve oositi çevreleyen hücrelerin apoptozu aracılığı ile gerçekleşir. Atrezi primer oositlerin sayısını logaritmik şekilde azaltarak fetüste yaklaşık 5 milyonken doğumda bu sayının yüzde yirmisinden daha az hale getirir. Menopozla birlikte aynen kalan oositler birkaç yıl içinde dejenere olurlar (Ross ve Pawlina 2011).

### 1.3 Folikül Gelişimi

Histolojik olarak gelişimsel aşamaları köken alan üç temel tip ovaryum folikülü tanımlanmıştır:

- Primordiyal foliküller
- Gelişmekte olan foliküller; primer ve sekonder (antral) olarak alt kategorilere ayrılır
- Olgun foliküller veya Graff folikülleri

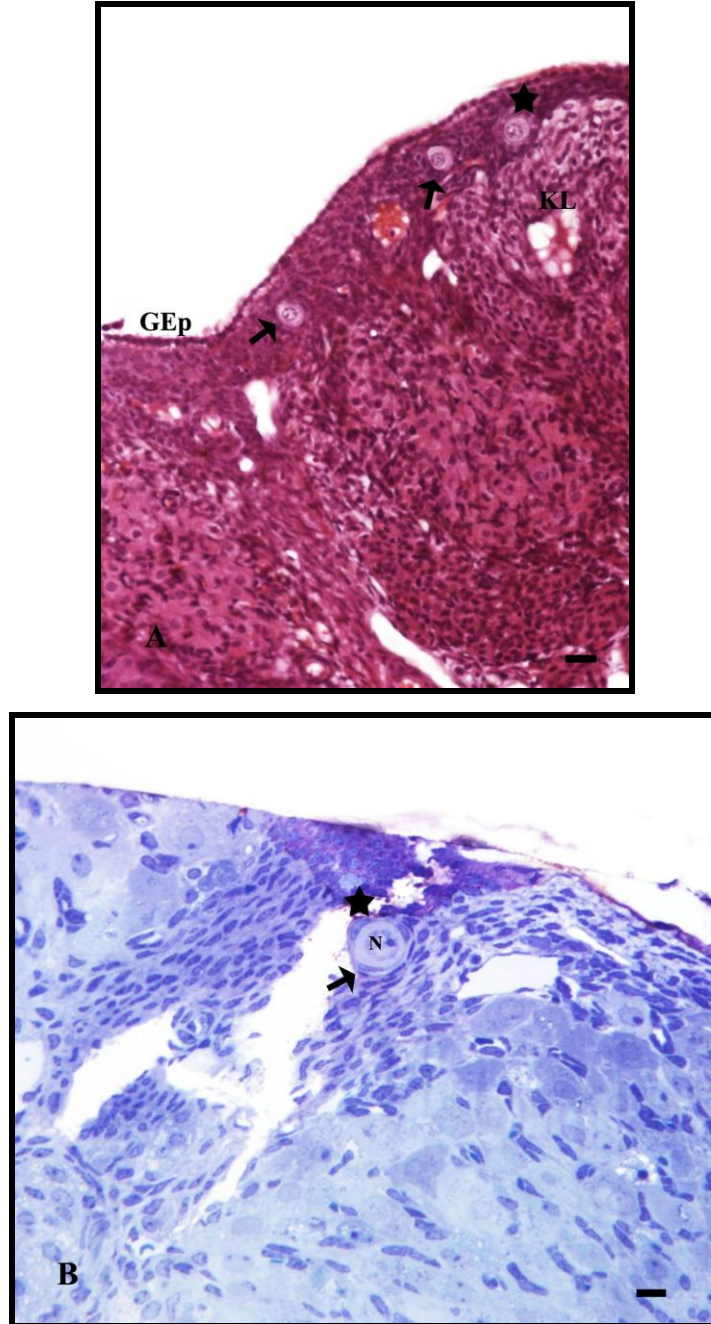
Siklik bir ovaryumda foliküller tüm gelişim aşamalarında bulunurlar ancak en fazla primordial foliküller gözlenir (Ross ve Pawlina 2011).

#### 1.3.1 Primordiyal Foliküller

Foliküler gelişimin en erken aşamasıdır. Ovaryumlarda ilk olarak fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkarlar. Primordiyal foliküllerin erken gelişim aşamaları gonadotropin uyarımından bağımsızdır. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stroması içinde tunika albuginea'nın hemen altında bulunurlar (Ross ve Pawlina 2011).

Primer oosit ve onu çevreleyen tek tabakalı yassı foliküler hücrelerden oluşurlar (Gartner ve Hiatt 2007). Folikül hücrelerinin dış yüzü bazal lamina ile sınırlanmıştır. Bu aşamada oosit ve etrafını saran folikül hücreleri birbirlerine sıkıca yanaşmıştır. Folikül içindeki oosit yaklaşık 30 µm çapında ve büyük, kenar duruşlu, iyi biçimde dağılmış kromatin, bir veya daha fazla iri nukleolus içeren çekirdeğe sahiptir (Ross ve Pawlina 2011) (Şekil1.2 A,B). Nükleoplazma sarmal yapmamış kromozomlar nedeniyle veziküler görünüme sahiptir (Gartner ve Hiatt 2007). Ooplazma olarak anılacak oosit sitoplazması Balbiani cismini içerir. Ultrastrüktürel seviyede Balbiani cisimi Golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondriyon ve lizozomların lokalize olarak birikimiyle meydana gelir. Buna ek olarak insan oositi annulat lameller ve sitoplazma boyunca dağılmış küçük sferik

mitokondriyonlarla birlikte çok sayıda küçük vezikül içerirler. Annulate lameller çekirdek zarı kesitlerinin kümelerini andırmaktadır. Yığının her bir katı por yapıları içermektedir ve bunlar morfolojik olarak çekirdek porlarıyla özdeşir (Ross ve Pawlina 2011).

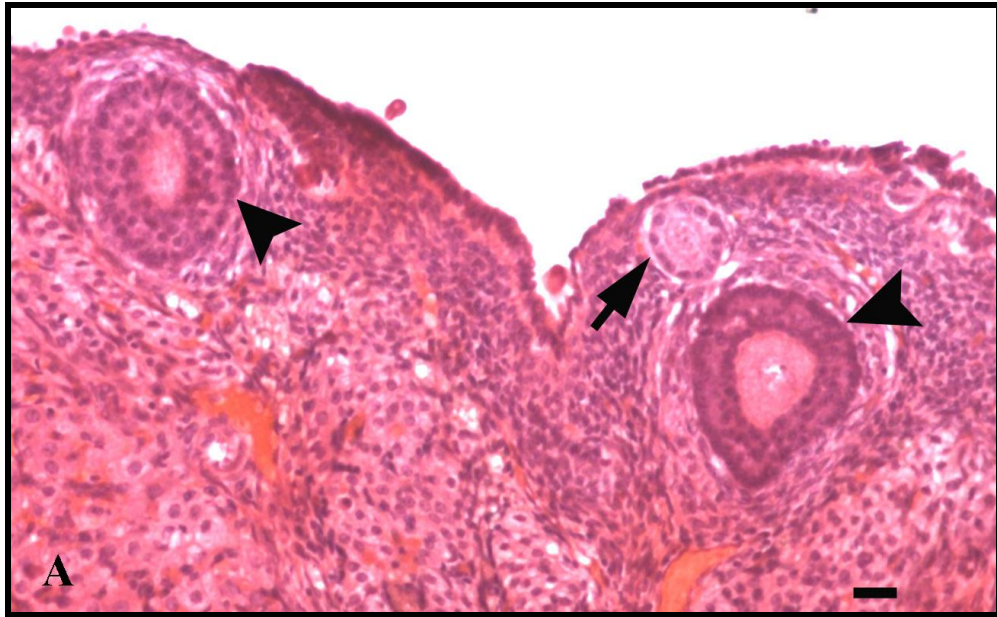


**Şekil 1.2.A-B** Primordiyal Folikül, 1.2 A oklar: primordiyal folikül, GEp: germinal epitel,KL: korpus luteum, yıldız: primer folikül Hematoksilen-Eozin, Bar:20µm 1.2 B ok primordiyal folikül,yıldız: tek katlı yassı epitel, N: oosit çekirdeği yarı ince kesit , Toluidin Mavisı, Bar: 10µm (Oya Evirgen-E.Nazlı Hayırlı)

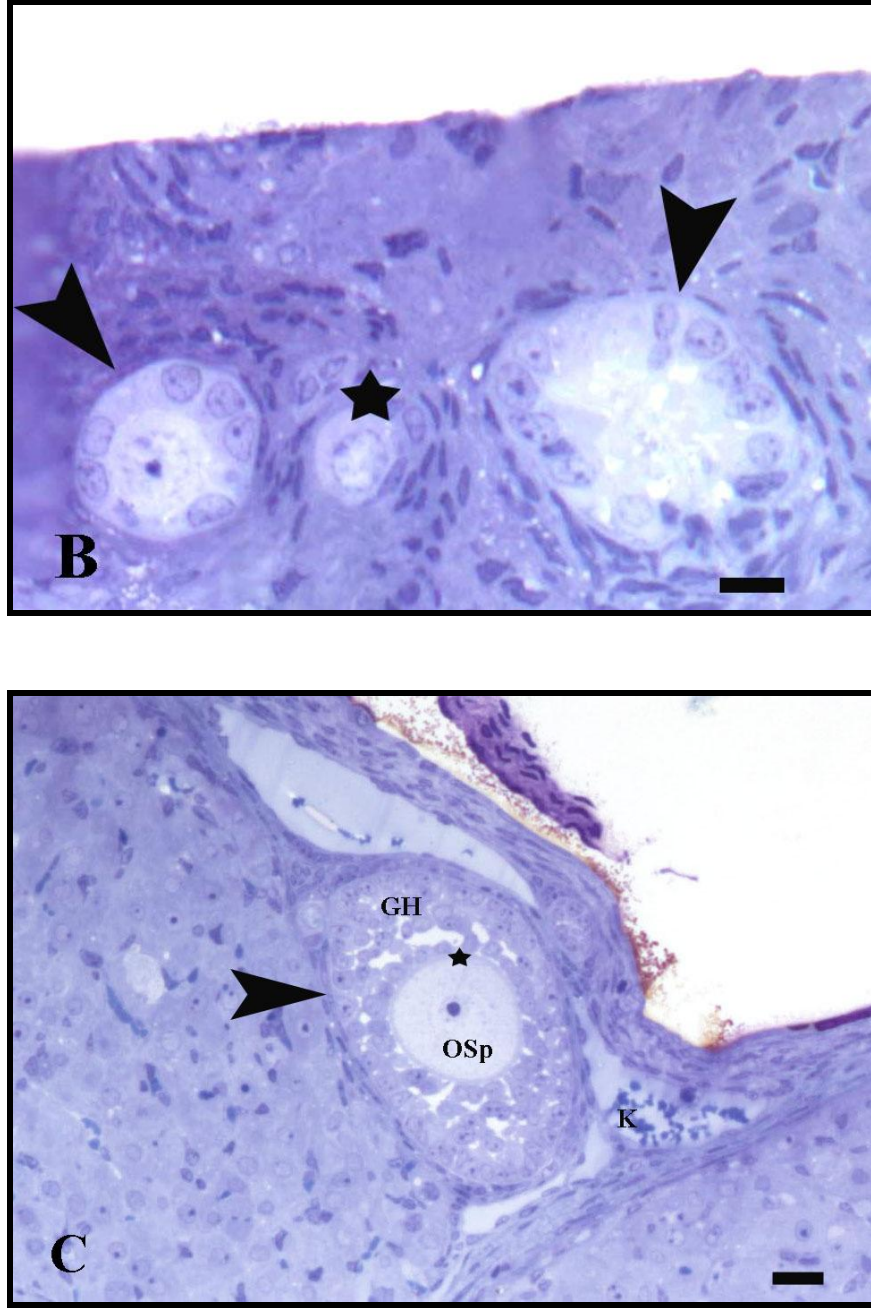
### 1.3.2 Primer Foliküller

Primordiyal foliküller gelişmekte olan folikül haline gelirken oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. İlk olarak, oosit genişler ve etrafını saran yassı folikül hücreleri kübik hale gelirler (Ross ve Pawlina 2011). Primer oositi çevreleyen folikül hücre tabaka sayısına göre iki tip primer folikül vardır.

- Tek tabakalı primer folikül (şekil 1.3 A)
- Çok tabakalı primer folikül (şekil 1.3 B)







**Şekil 1.3. Primer Foliküller** A.ok başı: çok katlı primer folikül, ok: tek katlı primer folikül, H-E, X20 objektif Bar:20 µm **B.** Ok başları: kübik ve prizmatik folikül hücreleri, yıldız: primordiyal folikül, yarı ince kesit, toluidine Mavisi, X40 objektif, Bar:10 µm **C.** Ok başı çok katlı primer folikül, GH: granüloza hücreleri, OSp: Oosit sitoplazması, yıldız: zona pellusida, K:Kapiller, yarı ince kesit, toluidine mavisi, X20 objektif, Bar: 20 µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı)

Primer oosit genişlemiş nukleusu ile birlikte 100-150 µm çapa ulaşır. Birkaç Golgi kompleksi hücreye dağılır, düz endoplazma retikulumları ribozomlarca zengin hale gelir, serbest ribozomlar bollaşır ve çok sayıda mitokondriyon hücrede dağınık halde bulunur (Gartner ve Hiatt 2007).

Oosit büyürken spesifik proteinler salgılar ve oosit ile komşu folikül hücreleri arasında ortaya çıkan bu ekstraselüler kılıfa zona pellusida (ZP) denir. İnsanlarda zona pellusidayı ZP-1, ZP-2 ve ZP-3 olarak adlandırılan üç sınıf sülfatlı asidik glikoproteinler oluşturur. Üçü arasında en önemlisi türe özgü akrozom reaksiyonunu henüz geçirmemiş spermatozoaların bağlanması için primer reseptör ve akrozom reaksiyonu başlatıcısı olan ZP-3tür, ZP-2nin akrozom reaksiyonunu tamamlamış spermatozoon için ikincil bağlanma reseptörü proteini olarak rol oynadığına inanılır, ZP-1 ise henüz fonksiyonel olarak karakterize edilmemiştir fakat zona için yapısal proteindir. Zona pellusida ışık mikroskopunda açıkça görülebilir. Periyodik asit Schiff (PAS) boyası ve asidofilik boyalarla boyanır. İlk olarak oosit yaklaşık 50-80µm büyüklüğe ulaşıp tek katlı kübik veya prizmatik folikül epiteli ile döşendiği zaman gözlenir.

Hızlı mitozlar geçiren folikül epitel hücreleri artık granüloza hücreleri olarak isimlendirilir ve oositi çevreleyen bu hücre tabakasına stratum granulozum denir (Ross ve Pawlina 2011). Granüloza hücrelerindeki proliferatif aktivite primer oosit tarafından üretilen sinyal molekülü aktivinle ilişkilidir (Gartner ve Hiatt 2007).

Bazal laminanın yeni konumu en dış prizmatik folikül hücre katı ile çevre bağ doku stroma arasındadır. Foliküler gelişim esnasında granüloza hücreleri arasında geniş oluklu bağlantılar meydana gelir. Testiste bulunan Sertoli hücrelerinin aksine granüloza hücrelerinin bazal katmanı sıkı bağlantılar içermez yani kan-folikül bariyeri yoktur. Besleyici maddelerin ve bilgi iletimini sağlayan makromoleküllerin kandan foliküler sıvıya geçişi normal oosit ve folikül gelişimi için gereklidir (Ross ve Pawlina 2011).

Stromal hücreler çok katlı primer folikülün çevresinde organize olmaya başlarlar (Gartner ve Hiatt 2007) ve hemen bazal laminaya komşu teka folikülü olarak bilinen bağ doku hücreleri ile sararlar (Ross ve Pawlina 2011).

Teka folikülü iki tabakaya ayrılır:

- Teka İnterna: Daha içte bulunan oldukça damarlı küboidal salgı yapan hücrelerden oluşan bir tabakadır. Tamamen diferansiyel olmuş teka interna hücreleri ultrastrüktürel yapıları bakımından steroid üreten hücrelere benzerler (Ross ve Pawlina 2011). Sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacığı biriktirirler, oldukça bol düz endoplazma retikulumları vardır ve tübüler kristallara sahip mitokondriyonlar mevcuttur (Gartner ve Hiatt 2007). Çok sayıda LH reseptörüne sahiptirler (Ross ve Pawlina 2011). Granüloza hücrelerine girerek aromataz enzimiyle östradiole çevrilen erkek seks hormonu androstenedionu üretirler (Gartner ve Hiatt 2007). Salgı yapan hücrelerin yanı sıra teka interna fibroblastlar, kollajen demetleri ve endokrin organlarda olduğu gibi zengin bir kılcal damar ağı içerir.
- Teka Eksterna: Bağ doku hücrelerinin dış tabakasıdır. Esas olarak düz kas hücreleri ve kollajen fibril demetleri içerir.

Teka tabakaları arasındaki ve teka eksterna ile çevreleyen stroma arasındaki sınırlar belirgin değildir. Ancak granüloza tabakası ile teka interna arasındaki bazal lamina kesin bir sınır oluşturur ve teka internanın zengin kapiller yatağı ile granüloza tabakasını ayırır (Ross ve Pawlina 2011).

Oosit olgunlaştıkça organellerin dağılımında değişiklikler meydana gelir. Serbest ribozomların, mitokondriyonların, küçük veziküllerin ve multiveziküler cisimlerin sayısı ve düz endoplazma retikulum miktarı artar. Lipid damlacıkları ve lipokrom pigment birikimleri de gözlenir. Memelilerin de içinde bulunduğu birçok türde oositler kortikal granüller olarak bilinen sekresyon yapan özel veziküllere sahiptir. Oolemmenin hemen altında bulunan bu granüller proteaz içerirler ve oosit sperme aktive olduğunda ekzositoz ile bırakılırlar. Çok sayıda düzensiz mikrovillus oositin

perivitellin aralığa doğru çıkıntı yaparlar. Aynı zamanda granüloza hücrelerinden de ince yollar gelişir, oosite doğru çıkıntı yaparlar ve oosit mikrovillusları ile karışırlar, bazen de oosit plazma membranına invajine olurlar. Hücrelerin plazma membranları temas edebilir ancak hücreler arasında sitoplazmik devamlılık kurulmaz (Ross ve Pawlina 2011).

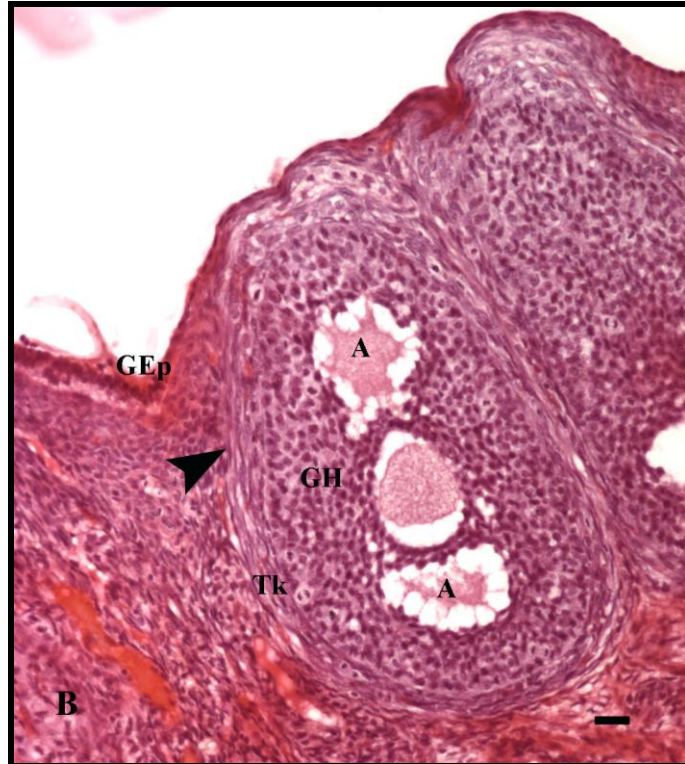
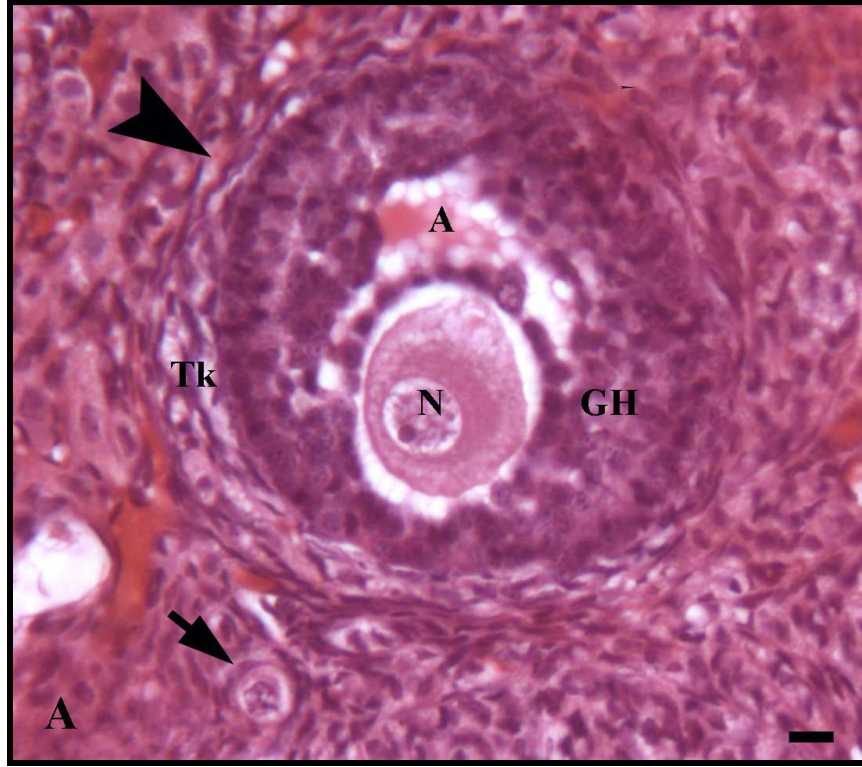
### 1.3.3 Sekonder Foliküller

Sekonder foliküller sıvı -likör folikülü (Gartner ve Hiatt 2007)- içeren antrum ile karakterizedir. Oosit ve folikül gelişimi için bazı faktörler gereklidir:

- Folikül stimüle edici hormon (FSH)
- Büyüme faktörleri (ör: epidermal büyüme faktörü [EGF], insülin benzeri büyüme faktörü-1 [IGF-I])
- Kalsiyum iyonları ( $Ca^{2+}$ ) (Ross ve Pawlina 2011).

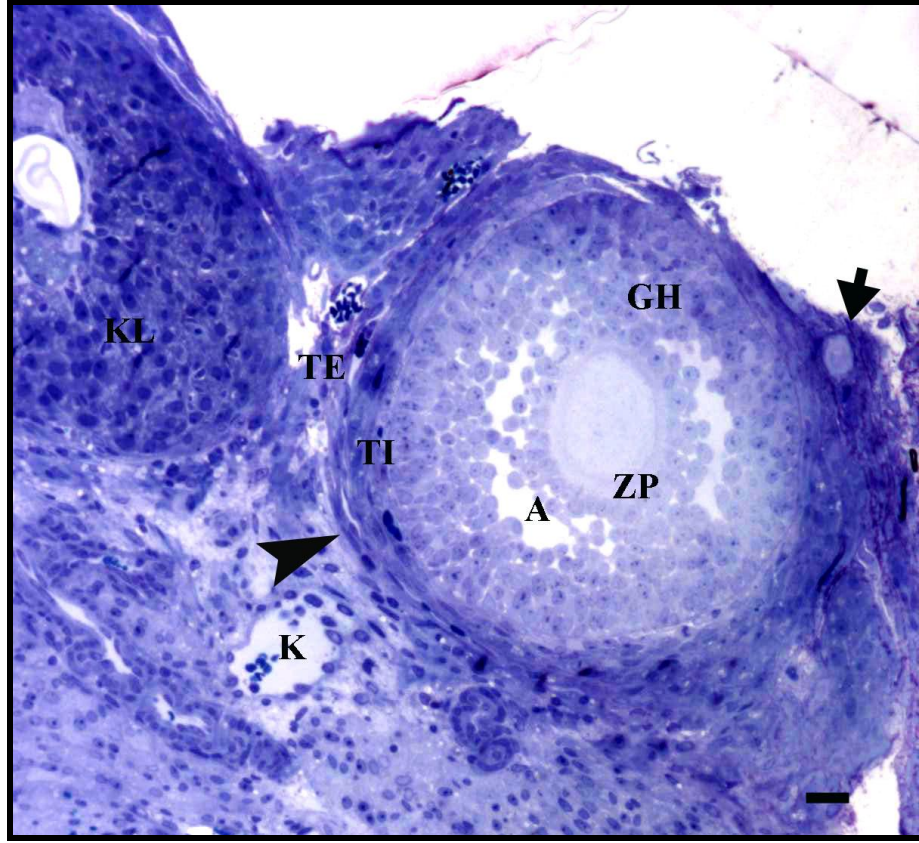
Çok katlı primer folikül gelişmeye devam eder ve çapını 200  $\mu m$ 'nin üzerine çıkartır (Gartner ve Hiatt 2007). Stratum granulozum tabakası 6-12 hücre katına ulaştığında granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar görülmeye başlanır (Ross ve Pawlina 2011)(Şekil 1.4 A-B ve 1.5). Glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve steroid-bağlanma proteinleri içeren bu sıvı granüloza hücreleri tarafından üretilir. Bunlardan başka lüteinleştirici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormonun (FSH) salınımını kontrol eden hormonlar olan progesteron, östradiol, inhibin, follükülostatin ve aktivin hormonlarını da içerir (Gartner ve Hiatt 2007). Sıvı birikmeye devam eder, boşluklar birleşmeye başlar ve sonunda hilal şeklinde antrum denen tek bir boşluk haline gelir. Artık folikül sekonder veya antral folikül olarak tanımlanır. 125 $\mu m$  çapa ulaşan ve kenarda yerleşen oosit artık daha fazla büyümmez. Büyümenin inhibisyonu granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salınan 1-2 kD ağırlığındaki bir peptid olan oosit maturasyon inhibitorü (OMI) tarafından gerçekleştirilir. OMI konsantrasyonu ile sekonder folikül büyüklüğü arasında bir korelasyon belirlenmiştir. Konsantrasyon küçük foliküllerde daha yüksek, olgun

foliküllerde ise daha düşüktür. Folikül, sıvının ilk gözükmeye başladığı erken sekonder folikül evresinde 0,2 mm çapa sahipken büyüme ve birikme devam ettikçe 10mm ve daha büyük hale gelir (Ross ve Pawlina 2011). Sekonder foliküldeki granüloza hücrelerinin proliferasyonunun devamı hipofizin ön lobundaki bazofilik hücrelerden salgılanan FSH'a bağımlıdır (Gartner ve Hiatt 2007). Stratum granulozum oositle ilişkili olduğu bölge dışında nispeten benzer kalınlığa sahiptir. Burada granüloza hücreleri antruma doğru kumulus ooforus adı verilen bir tepecik meydana getirirler. Kumulus ooforus hücreleri kısa sürede oositin etrafını sararlar ve korona radiata adını alırlar. Korona radiata hücreleri zona pellusidaya doğru mikrovilluslarını gönderirler ve oluklu bağlantılar aracılığıyla oositin mikrovilluslarıyla iletişim kurarlar. Ekstraselüler olarak bulunan PAS ile yoğun boyanma özelliği gösteren Call-Exner cisimcikleri granüloza hücrelerinin arasında görülebilir. Bu cisimcikler granüloza hücreleri tarafından salgılanırlar ve hiyaluronan ve proteoglikanları içerirler (Ross ve Pawlina 2011).



**Şekil 1.4.** Sekonder folikül **A.** Ok başı: Sekonder Folikül, A: Yeni oluşmaya başlayan Antrum, N: Çekirdek, GH: Granüloza hücre tabakaları, Tk: Teka tabakası, ok: primordiyal folikül, H-E, X40 objektif, Bar: 10  $\mu$ m **B.** Ok başı: Ovaryum korteksinde sekonder (Antral) folikül, A: Antrum boşlukları, GH: Granüloza hücre tabakaları, Tk: Teka tabakası, GEp: Germinal epitel, H-E, X20 objektif, Bar: 20  $\mu$ m (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı)

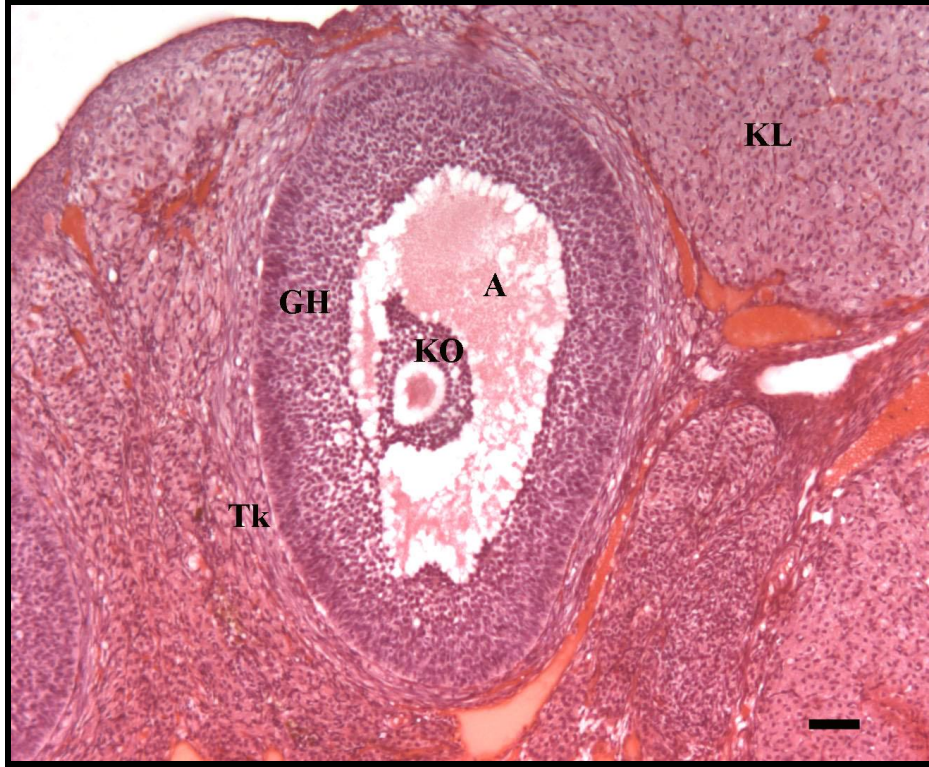




**Şekil 1.5.** Sekonder folikül A: Antrum sıvı birikimi, ZP: Oositi çevreleyen zona pellusida, GH: granüloza hücre tabakaları, Ok başı: Teka tabakası, TI: Teka İterna, TE: Teka eksterna, K: kapiller, Ok: primordiyal folikül, KL: korpus luteum, yarı ince kesit, Toluidine Mavisı, X20 objektif, Bar: 20 µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı)

### 1.3.4 Olgun Folikül=Graaf Folikülü

Granüloza hücrelerinde devam eden proliferasyon ve devam eden likör folikülü oluşumu olgun folikül olarak da bilinen Graaf folikülü (Şekil1.6) oluşumu ile sonuçlanır ve ovulasyon esnasında yaklaşık 2,5cm büyüklüğe ulaşabilir (Gartner ve Hiatt 2007). Folikül maksimum büyüklüğüne yaklaştıkça granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi düşer. Ovulasyona hazırlanmak için granüloza hücrelerinin arasında boşluklar oluşur. Oositin etrafındaki korona radiata hücreleri ve bunlara zayıf şekilde tutunmuş olan kumulus hücreleri ovulasyonda oositle birlikte kalırlar. Bu dönemde teka interna hücre sitoplazmasında lipid damlacıkları görülmeye başlanır ve ultrastrüktürel olarak tipik steroid sentezleyen hücre görünümü kazanırlar (Ross ve Pawlina 2011).



**Şekil 1.6.** Ovaryum Korteksinde Graff folikülü A: Antrum boşluğu, KO: Kümülüs Ooforus, GH:Granüloza hücre tabakaları, Tk: Teka tabakası, KL:Korpus luteum, H-E, X10 objektif, Bar: 50 µm (Oya Evirgen- E.Nazlı Hayırlı)

#### 1.4.Ovulasyon

Ovulasyon hormon bağımlı bir süreçtir ve olgun folikülden sekonder oositin salıverilmesi ile sonuçlanır (Ross ve Pawlina 2011). Menstrual siklusun 14.gününde çoğunlukla gelişen graaf folikül tarafından ve sekonder foliküller tarafından yapılan östrojen üretimi kan östrojen seviyesinde aşağıdaki etkilerin görülmesi için yeterince yükselmiş olur.

- Negatif geri besleme inhibisyonu ile ön hipofizden FSH salınımını durdurmak.
- Ön hipofizin bazofil hücreleri tarafından salınan LH da ani dalgalanma oluşturmak.



LH seviyesindeki dalgalanma sonucunda ovaryumlara doğru olan kan akımı artar, teka eksterna içine kapiller damarlardan plazma sızmaya başlar ve ödeme neden olur. Olgun folikül çevresine salınan histamin, prostaglandinler ve kollajenazda ödem oluşumuna eşlik eder. Ayrıca folikül içinde plazminojen aktivatör proteini seviyesi de artar ve yeni oluşan plazmin membrana granülozanın proteolizisine yardımcı olur (Gartner ve Hiatt 2007).

LH dalgalanmasına yanıt olarak granüloza hücreleri üzerindeki LH reseptörleri desensitize olurlar ve östrojen üretimini durdururlar (Ross ve Pawlina, 2011).

Bunlara ek olarak LH dalgalanması aşağıdaki olaylardan da sorumludur.

1. Mayoz uyarıcı faktör salınır
2. Mayoz uyarıcı faktörün etkisiyle graaf folikülün primer oositi kaldığı yerden 1.mayoz bölünmeye devam eder ve tamamlar. Sonuçta sekonder oosit ve birinci polar cisim oluşur.
3. Yeni oluşan sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeye girer ve metafaz evresinde duraklar.
4. Granüloza hücreleri tarafından üretilmeye devam eden proteoglikan ve hyalüronik asit su çeker ve sadece graaf folikülünün büyüklüğünde değişmeye neden olmaz aynı zamanda membrana granülozada gevşeme olur.
5. Ovulasyondan hemen önce graaf folikülün tunika albugineaya baskı yaptığı bölgede ovaryum yüzeyinde kan akımı zayıflar.
6. Bu incelen avasküler bölgenin rengi beyazlaşır ve stigma olarak adlandırılır. Stigma bölgesindeki bağ dokusu ve folikül duvarı dejenere olur. Peritoneal boşluk ile graaf folikülün antrumu arasında bir açıklık meydana gelir.

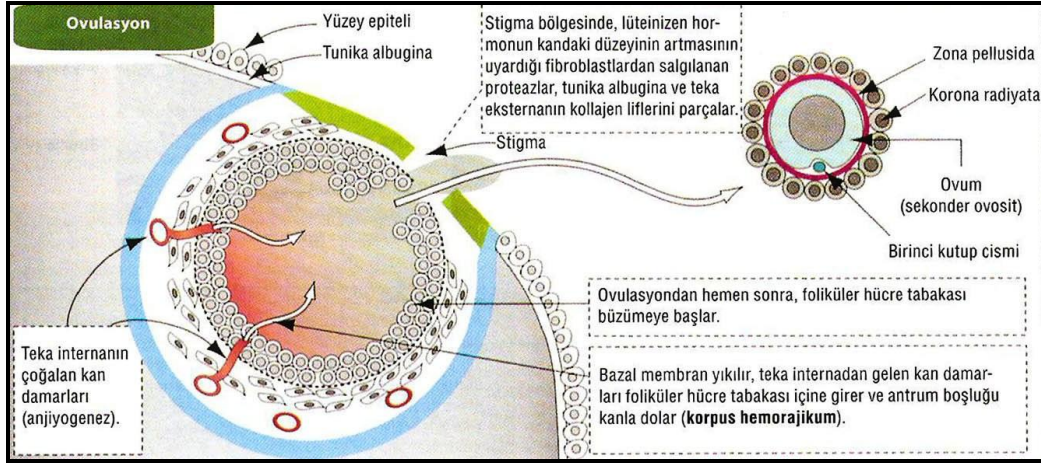
Bu açıklıktan sekonder oosit, eşlik eden foliküler hücreler ve likör folikülünün bir kısmı nazikçe ovaryumdan salınır ve ovulasyonla sonuçlanır (Gartner ve Hiatt 2007).

Menstrual siklusun yaklaşık 14. gününde sekonder oositin salınmasından bir dizi hormonal değişiklik ve enzimatik etkiler sorumludur. Bu faktörler;

- Foliküler sıvının hacminin ve yaptığı basıncın artması
- Aktive edilmiş plazminojen ile foliküler duvarda enzimatik proteolizis
- Oosit-kumulus kompleksi ile granüloza hücreleri arasına hormon etkisiyle glikozaminoglikanların birikmesi
- Prostaglandinlerin tetiklemesiyle teka eksterna tabakasındaki düz kasların kasılmasını içerir (Ross ve Pawlina, 2011).

Ovulasyonla aynı zamanda uterin tüp fimbriyaları ovaryum yüzeyine iyice yaklaşırlar ve kumulus hücre yığını içindeki oositi fimbriyaları ile nazikçe süpürerek uterin tüplerin abdominal ostiumu içine alırlar. Kumulus yığını fimbriyalara yapışır ve uterin tüpün içini kaplayan siliyalı hücreler tarafından periton boşluğuna kaçmasını önlemek için aktif olarak taşıyırlar.

Ovulasyondan sonra sekonder oosit yaklaşık 24 saat hayatta kalabilir. Eğer fertilizasyon bu süreçte gerçekleşmezse dejenere olur. Sekonder oositin ikinci mayoz bölünmesi sadece fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanır. İkinci mayoz bölünmesini tamamlayan sekonder oosit 23 kromozom setini taşıyan maternal pronükleus haline gelir. Bu bölünme sonucunda oluşan diğer hücre ise ikinci kutup cisimciği olarak adlandırılır ve fertilize oosit iki polar cisimciğe sahip olması ile teşhis edilir. Polar cisimcikler gelişme yeteneğinde değildirler ve apoptoza giderler (Ross ve Pawlina, 2011).



Şekil 1.7. Ovulasyon (Kierszenbaum A.L, Histoloji ve Hücre Biyolojisi'nden alınmıştır)

### 1.5. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra yıkılmış olan folikül corpus luteum olarak yeniden organize olur. İlk olarak teka interna tabakasındaki kapiller damarlardan folikül lümenine sızan kan merkezi bir pıhtı ile birlikte korpus hemorajikumun oluşmasına yol açar. Stromada bulunan bağ dokuda daha önceki foliküler boşluğu istila eder. Granüloza ve teka interna hücreleri lüteinizasyon denen bir süreçle granüloza luteal ve teka luteal hücrelerine dönüşürler. Dramatik bir değişim geçiren bu hücreler büyürler ve içleri lipid damlacıkları ile dolar. İki tip luteal hücre tanımlanmıştır:

1. Granüloza hücrelerinden köken alan yaklaşık 30µm çapında büyük hücreler olan merkezi yerleşimli granüloza lütein hücreleri
2. Teka interna tabakasından türemiş daha küçük yaklaşık 15 µm çapında olan daha koyu boyanan ve kenar yerleşimli olan teka lütein hücreleri

Korpus luteum içinde zengin bir damar ağı meydana gelir. Bu yapı progesteron ve östrojen salgılamaya başlar. Bu hormonlar gelişmekte olan zigotun implantasyonuna hazırlanması için endometriyumun gelişme ve salgı aktivitesini düzenlerler. Eğer fertilizasyon meydana gelmezse menstruasyon korpus luteumu meydana gelir ve sadece 14 gün aktif kalır. İnsan koryonik gonadotropini ve diğer luteotropinlerin

yokluğunda progesteron ve östrojenin salgılanması azalır ve korpus luteum ovulasyondan yaklaşık 10-12 gün sonra dejenere olmaya başlar. Hücreler yağla dolar boyutları küçülür ve otolize gider. Bu hücreler içinde hiyalin materyal birikimi olur ve beyaz bir skar dokusu olan korpus luteum albicans oluşur. Korpus luteum albicans ovaryum korteksinin derinlerine doğru göçer ve birkaç ay içinde kaybolur (Ross ve Pawlina, 2011).

### **1.6.Ovaryumların Embriyolojisi**

Cinsiyet farklanması otozomal genlerin de katıldığı birçok geni içeren karmaşık bir olaydır. Farklanmanın anahtarı ise Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki SRY( sex-determining region of the Y chromosome) bölgesinin üretimini sağladığı testis farklılaştırıcı faktörün (TDF- Testis Determining Factor) varlığıdır. Bu faktörün yokluğunda dişi gonadı gelişir (Tekelioğlu, 2002).

Cinsiyet genetik açıdan fertilizasyonda belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildirler (Sadler, 2005). Bu döneme kadar farklanmamış dönem olarak bilinir (Tekelioğlu, 2002).

İlk primordiyal germ hücreleri yaklaşık 3. haftada allantoise komşu vitellüs kesesinin endodermal hücreleri arasında gözlenir. Bunlar iri, soluk görümlü ve alkalin fosfatazla boyanan hücrelerdir (Tekelioğlu, 2002).

Dördüncü ve altıncı haftalar arasında, yaklaşık 10–100 primordiyal germ hücresi pasif olarak embriyonun bükülmesi (Tekelioğlu, 2002), aktif olarak amoeboid hareketlerle vitellüs kesesinden bağırsak tüpüne, oradan da mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına göç ederler.

Arka vücut duvarında yaklaşık olarak 2500–5000 primordiyal germ hücresi 10.toraksik vertebra seviyesinde mezenşim içinde bulunur ve mezonefroz hücreleriyle

söloomik örtü epitelinin hücrelerini, bir çift genital kabarıklık oluşturmak üzere, çoğalmak için uyarır (Kierszenbaum, 2007). Çoğalan söloom epiteli hücreleri altındaki mezenşime doğru düzensiz primitif cinsiyet kordonlarını meydana getirirler (Tekelioğlu, 2002). Bu söloomik epitelyal kordonlar farkanmamış gonadın dış korteks ve iç medulla bölgelerini oluştururlar (Kierszenbaum, 2007). Primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır ve primitif germ hücrelerini içeren bu kümeler daha çok ovaryumun medüller bölgesinde yerleşmişlerdir. Bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya (ovarian medulla) bırakırlar. Dişi gonadın yüzey epiteli çoğalmaya devam eder ve yüzey epitelden 7.haftada alttaki mezenşim içine gömülmesine rağmen gene de yüzeye yakın kalmaya devam eden ve kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonlar gelişir (Sadler, 2005). Bu kordonlar yüzeyle bağlantılarını korurlar bu nedenle ovaryumun tunika albugineası testise kıyasla incedir (Tekelioğlu, 2002).

Dördüncü ayda bu kordonlar her biri bir veya daha çok sayıda primitif germ hücrelerini çevreleyen izole hücre toplulukları haline gelirler. Bu germ hücreleri zamanla oogoniaya dönüşür (Sadler, 2005). Kortikal kordonlar da dağılarak primordiyal germ hücrelerini çevreler ve folikül hücrelerini yaparlar (Tekelioğlu, 2002). Fötal ovaryumda oogonyumlar primer oosit olmak için 1.mayoz bölünmenin profaz evresine girer ve crossing-overin tamamlanmasından sonra bu evrede beklerler (Kierszenbaum, 2007). Çekirdek kromatininin seyrek ve düzensiz bir yapılanma gösterdiği bu istirahat haline diploten dönemi denir (Sadler, 2005).

### **1.7.In Vitro Fertilizasyon(IVF) Tarihi**

Hayvan gametleri kullanılarak yapılan ilk IVF girişimleri Shenk (1878) ve Long (1912) tarafından yayınlanmıştır. Ancak Shenk ve Long'un raporları şüpheli bir değere sahiptir çünkü patojen aktivasyonunda sıcaklık değişiminin rolü 1936'ya kadar tanımlanmış değildi. Ayrıca fertilizasyonu tanımlamada da oldukça hatalı kriterler kullanılmıştır.

1951 yılı muhtemelen kritik bir seneydi. Sperm kapasitasyonunun Colin Austin ve M.C. Chang tarafından bağımsız olarak tanımlanmasıyla modern bir çağın başlangıcıdır.

Akabinde Austin ve Bishop (1958) spermin zona pellusidaya penetre olmasından önce oluşan akrozom reaksiyonu hakkındaki ilk bulguları yayınlamıştır. Kapasite olmuş sperm kullanılarak ilk başarılı IVF denemesi Yanagimachi ve Gang (1963) tarafından yapılmıştır (Clarke, 2006).

İnsan in vitro fertilizasyonu ile ilgili ilk rapor birkaç oositte pronukleus oluşumunun gözlemleyen Edwards ve ark. tarafından 1969'da yayınlanmıştır. 1970'de 16 hücreli aşamaya kadar embriyonik gelişim sağladıklarını bildirmişlerdir (Edwards ve ark. 1970). İnsan oositinin in vitro fertilizasyonundan sonra elde edilen ilk hamilelik Lancet'de Monash takımı tarafından 1973'de yayınlanmış ancak sadece birkaç gün sürdürülebilmektedir. Günümüzde biyokimyasal gebelik olarak adlandırılmaktadır. Bunu Steptoe ve Edwards'ın Bob Edwards ile başarılı ortaklıkları sonucu 1978'de Louise Brown (Edwards, 1980) ve Oldham'daki isimsiz bir diğer doğum takip etmiştir. Bunlar dünyanın ilk IVF bebekleridir (Kovacs, 2007).

Bunları Melbourne'de 1980'de Candice Reed'in doğumu izlemiştir ve bu klomifen sitrat ve insan koryonik gonadotropinin oosit maturasyon zamanının kontrolü için kullanıldığı stimüle edilmiş sikluslardır. Bu kontrol durumu in vitro fertilizasyonu klinik tedavi için bir araştırma konusu haline dönüştürmüştür (Trounson, Leton ve ark. ,1981; Kovacs, 2007).

Norfolk Virginia'daki simüle edilmiş siklusları Jones takımı FSH kullanımı ile birleştirilerek daha da geliştirilmiştir (Jones, Jones ve ark. ,1982; Kovacs,2007). Bu uygulama daha sonradan kontrollü ovaryum hiperstimulasyonu(KOH) olarak bilinmeye başlanmıştır.

KOH'un ilk kez uygulandığı 1981'de ilginç olarak hamilelik oluştuktan sonra hiç düşük görülmemiştir. İlk zamanlarda alınan sonuçlar açıkça KOH'un IVF için avantajlarını işaret etmektedir. Normal menstruasyona sahip kadınlarda KOH kullanımına ait başarı bugün dünyada birçok IVF programında kullanılmasına yol açmıştır (Jones 2008).

### **1.8.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyonu (KOH)**

Endokrin hipofizyal gonadal aksinin 20.yy'ın başlarında hipofizin ön lobunda gözlenen lezyonların genital organlarda atrofiye yol açmasıyla kanıtlanmıştır. İki ayrı gonadotropin (başlarda Prolan A ve B olarak adlandırılan) varlığını destekleyen ilk ikna edici kanıt 1931'de Fevold ve ark. tarafından ortaya konmuştur. LH ve FSH sonradan izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. 1928'de Ascheim ve Zondek hamile kadınlardan elde edilen idrarın gonadal fonksiyonları stimüle etme kapasitesini tanımlamışlardır. 1940'da Hamblen saflaştırılmış hamile dişi at serumunun (PMS) insanlarda intravenöz uygulamayla ovulasyonu indüklediğini bildirmiştir. Hayvanlardan elde edilen gonadotropinlerin insanda hızlı immunolojik cevap yaratmaları nedeniyle bu hormonlar insan kaynaklarından elde edilmeye çalışılmıştır.

1950'lerin sonunda yapılan klinik denemelerde insan hipofizinden elde edilen ekstraktların gonad fonksiyonunu düzenlemede kullanılabileceği ispat edilmiştir. Akabinde deneyler gonadotropik hormonların her ikisinin de postmenopozal kadınların idrarından ekstraksiyonunu kapsamış ve insan menopozal gonadotropini (hMG) preparatlarının gelişimine yol açmıştır.1960'ların başında bu hormonlar gonadal fonksiyonun stimülasyonu için insanda kullanılmıştır (Macklon ve ark. ,2006). Günümüzde hormonal preparatlar rekombinant teknoloji ürünü olarak elde edilmeye başlanmıştır.

## Kontrollü Ovaryum Hiperstimulasyonunun (KOH) Amaçları

- 1) Birden fazla sayıda olgun oosit elde etmek
- 2) Ovulasyon zamanını kontrol edebilmek
- 3) Yardımla üreme teknikleri tedavisi sonrası gebelik oranını artırmak olarak özetlenebilir.

### 1.8.1.KOH Tedavisinde Kullanılan Ajanlar

**1.8.1.1.Klomifen Sitrat:** 1956 yılında sentezlenmiştir. 1961’de tartışmasız büyüklükte bir terapötik atılım meydana gelmiş ve estradiolun nonsteroidal bir analogu olan klomifen sitratın anovulatuvar infertil kadınlarda ovaryum fonksiyonlarını stimüle ettiği Greenblatt ve grubu tarafından keşfedilmiştir.

Hipotalamustan hipotalmik-hipofiz portal akımına gonadotropin salgılatıcı faktör (GnRH) salgılanmasını artırarak ve bu sayede hipofiz kaynaklı gonadotropinlerinin artışına yol açarak işlev görür.

En yaygın yan etkileri ateş basması (%10), abdominal distansiyon, şişkinlik veya rahatsızlık (%5), göğüste rahatsızlık (%2), mide bulantısı ve kusma (%2), optik semptomlar ve baş ağrısı (%1.5). Bu etkiler nadirdir ve tedavinin kesilmesinin ardından kaybolur, kalıcı bir etkiye sahip değildir. Ancak bazı raporlar uzun süreli (>12 ay) klomifen sitrat terapisinin gelecekteki ovaryum kanserine yakalanma riskinde küçük bir artışla ilişkilendirmiştir. Bu raporlardan dolayı İngiltere’deki İlaç Güvenlik Komitesi (CSM) doktorlara üreticinin önerilerine sadık kalarak tedaviyi maksimum 6 ayla sınırlandırmayı tavsiye etmiştir (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).



**1.8.1.2.Aromataz İnhibitörleri:** Aromataz sitokrom P-450 bağımlı bir enzimdir. Östrojen sentezinin son basamağında rol oynar ve androjenlerin östrojene dönüştürülmesini katalizler. Aromataz inhibitörleri aromataz enzim sistemlerinin kompetitif inhibitörüdür ve androjenlerin östrojene dönüşmesini inhibe eder.

Aromataz inhibitörlerin (letrozole: AstraZenica) ovulasyon indüksiyonu için klinik çalışmalarda ilk kullanımı Mitwally ve Casper tarafından 2001 yılında yayınlanmıştır. Letrozole tedavisiyle polikistik overli hastaların %75'inde ovulasyon meydana gelmiş, %25'inde gebelik oluşmuştur.

Bildirilen yan etkileri kemik ağrısı (%20), ateş basması (%18), sırt ağrısı (%17), mide bulantısı (%15) ve dispne (%14). Bu yan etkiler tipik olarak uzun dönem uygulamalardan sonra gözlenir (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).

**1.8.1.3.İnsan koryonik gonadotropini(hCG):** İki hormonun arasındaki homoloji derecesi nedeniyle hCG, LH yerine kullanılabilir. En önemlisi iki hormonda aynı doğal fonksiyona sahiptir, lüteinizasyonu indüklemek ve lütein hücrelerini desteklemek. hCG'nin uzun bir serum yarı ömrüne sahip olması klinik uygulamalarda istenmeyen bir özelliktir. Korpus luteumun sürekli yüksek seviyede stimülasyonu gonadotropin terapisinin başlıca komplikasyonu olan ovaryum hiperstimülasyon sendromuna (OHSS) yol açabilir.

Rekombinant teknolojiye son gelişmelerle birlikte, rekombinant hCG (rhCG) klinik kullanım için ulaşılabilir hale gelmiştir. Yüksek dozda rhCG kullanımı, örneğin 500µg, daha fazla oosit elde edilmesiyle sonuçlanır ancak OHSS oluşmasında 3 misli yükselmeye neden olur (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).

**1.8.1.4.Gonadotropinler:** 1927'de Aschheim ve Zondek hamile kadınların idrarında anterior hipofizdeki gonadotropik faktörlerle aynı etkiye sahip bir madde keşfettiler. Bu maddeye gonadotropin veya "prolan" dediler. Ayrıca prolan A ve prolan B olmak üzere iki farklı hormon olduğuna inanıyorlardı. Daha sonra bulgularını kendi adlarını

taşıyan gebelik testini geliştirmek için kullandılar. 1930'da Zondek gonadotropinlerin aynı zamanda postmenopozal kadınların idrarında da bulunduğunu rapor etti. Cole ve Hart gonadotropinleri hamile kısırakların serumunda da buldular. Hamile at serum gonadotropini denen bu hormonun (PMSG) hayvanlarda güçlü bir gonadotropik etkiye sahip olduğu bulundu. Bununla birlikte 1937 yılında Cartland ve Nelson bu hormonun saf halini üretmeyi başardılar. 1948'e gelmeden Stewart, Sano ve Montgomery'nin yaptığı bir çalışmanın sonucunda hamile kadınların idrarındaki gonadotropinlerin kaynağının hipofiz değil koryonik villuslar olduğu gösterilmiştir. Akabinde 'koryonik gonadotropin' olarak tanımlanmıştır. Yıllar içinde primat olmayan kaynaklardan elde edilen gonadotropin özütlerinin terapotik etkilerini nötralize eden antikorların gelişimi nedeniyle klinik kullanım için sınırlı bir değere sahip olduğu anlaşılmıştır. 1947'de Pierro Donini adlı Roma'lı bir kimyacı hMG'yi saflaştırmaya çalışmıştır. İlk idrar özütü gonadotropin LH ve FSH içermekteydi ve 'Pergonal' olarak adlandırılmıştı. 1961'de sekonder amenoreli bir hastanın Pergonal ile tedavisinin ardından ilk hamilelik gerçekleşmiştir ve 1962'de ilk normal kız bebeğin doğumuyla sonuçlanmıştır (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).

**1.8.1.5.İnsan Menopozal Gonadotropini:** 75 IU FSH ve 75 IU LH'a eşit değerde in-vivo biyoaktiviteye sahiptir. Çeşitli hMG preparatları içinde TNF bağlanma proteini I, transferin, ürokinaz, Tamm-Horsfall glikoproteini, epidermal büyüme faktörü ve immünoglobulin ilişkili proteinlerini de içeren değişik proteinler bulunmuştur. Bununla birlikte hMG preparatları etkili ve nispeten güvenlidir; lokal yan etkiler örneğin ağrı ve alerjik reaksiyonlar, muhtemelen gonadotropin olmayan proteinlerle ilişkili olan immün reaksiyonlardır ve kesin vakalarla belgelenmiştir (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).

**1.8.1.6.Gonadotropin salgılatıcı hormon:** Gonadotropin salgılatıcı hormon medial bazal hipotalamustaki ve ventral hipotalamusun preoptik alanında bulunan bir grup birbiriyle zayıf bağlantılı nöron tarafından üretilir ve salgılanır. Hücre gövdesinde sentezlenir, akson boyunca sinapsa kadar taşınır ve pulsatil biçimde hipofiz bezinin portal sisteminin kapiller ağına salınır.

Gonadotropin salgılatıcı hormon ilk olarak birbirinden bağımsız olarak 1971 yılında Andrew Schally ve Roger Guillemin tarafından izole edilmiş, tanımlanmış ve sentezlenmiştir. Akabinde bu başarılarından dolayı Nobel ile ödüllendirildiler. Yapısı insanda dahil bütün memelilerde ortaktır ve etkisi hem kadınlarda hem erkeklerde benzerdir (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).

**1.8.1.6.1. Gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri:** Doğal GnRH'lar kısa plazma yarı ömrüne sahiptir ve hızlıca enzimatik parçalamayla inaktive edilir. Analoglar GnRH'ın enzimatik kırılım konumunda yapısal bir değişimle oluşturulmuş, daha uzun yarı ömre ve daha yüksek reseptör aktivitesine sahiptir. 1000'den fazla GnRH analogu sentezlenmiş ve test edilmiş ancak yalnızca birkaç tanesi klinik kullanıma sunulmuştur. GnRH agonistik analogların akut uygulanması gonadotropin salgılanmasını artırır ve genellikle hipofiz supresyonuna ulaşmak için 7-14 gün süreye ihtiyaç duyar. Uzun süreli uygulamalar GnRH reseptörlerinin down regülasyonuna neden olur. GnRH agonist terapisinin yan etkileri düşen sex hormon serum düzeyleriyle ilişkilidir. Düşük serum östrojen konsantrasyonunun başlıca semptomu ateş basması, libidonun düşmesi, iktidarsızlık, vajinal kuruluk, göğüs ölçüsünde küçülme ve duygusal dengesizlik. Östrojen azalmasının endişe verici önemli etkilerinden biri kemik mineral yoğunluğu üzerinedir. Östrojen osteoporozisin gelişmesini önlemede büyük öneme sahiptir (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).

**1.8.1.6.2. Gonadotropin salgılatıcı hormon antagonistleri:** GnRH antagonist analogları direkt inhibitör reversibl supresif etkiye sahiptir. Antagonistik moleküller hipofiz GnRH reseptörleri için yarışır ve isgal ederler. Agonistik analoglarla karşılaştırıldıklarında etkili bir baskılama için yüksek dozda antagoniste ihtiyaç vardır. Birbirinden farklı binlerce hasta insan herhangi bir sistemik veya lokal deri reaksiyonu belirtisi göstermeden üçüncü jenerasyon GnRH antagonistleri ile tedavi edilmiş ve yan etkiler nedeniyle hiçbir terapi kesintiye uğramamıştır. Gözlenen en yaygın yan etkileri enjeksiyon alanındaki reaksiyonlar ve mide bulantısı, baş ağrısı, bitkinlik, huzursuzluk ihtimal dahilindedir. GnRH antagonistlerinin ovaryum, oositler, granuloza hücreleri, endometrium ve fertilité ve implantasyonla ilişkili

olarak embriyo üzerine etkileri incelenmiştir (Gardner, Informa (Firm). Informa Healthcare. ve ark. 2009).

## **1.9.Ovaryum Stimulasyonunun Yan Etkileri ve Komplikasyonlar**

**1.9.1.Ovaryum Hiperstimulasyon Sendromu(OHSS):** OHSS ovaryum büyümesi, yüksek serum seks steroidleri ve ilk olarak periton boşluğunda damar dışı sıvı birikimi ile karakterize potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir komplikasyondur. Şiddetli olgularda hipotansiyon, artmış koagülasyon, azalmış böbrek perfüzyonu ve oligüri meydana gelebilir. OHSS etiyojisi ovaryum stimulasyonu ile bağlantılı olarak yükselmiş LH, FSH, hCG ve E2 düzeyleri ile ilişkilidir. Bozulmuş karaciğer fonksiyon testleri, venöz ve arteriyel tromboz, böbrek yetmezliği ortaya çıkabilir ve ölümler rapor edilmiştir. Hafif formu IVF sikluslarının %20-35'ini, orta dereceli formu %3-6 ve şiddetli formu ise %0,1-0,2'sinde meydana gelir.

**1.9.2.Venöz Tromboembolizm(VTE):** VTE, IVF için yapılan ovaryum stimulasyonunun nadir bir komplikasyonudur. Ölümle sonuçlanabilir. IVF tedavisinden sonra ortaya çıkan derin ven trombozu ile ilgili raporlar sıklıkla OHSS ile veya hCG uygulamasından sonra 5-10 haftalar arasında erken gebelikle ilişkili olduğunu belirtmektedir.

**1.9.3.Çoklu Gebelikler:** Çoklu doğumların sıklığının ve sonuçlarının IVF nedeniyle artışı Dünya genelinde IVF organizasyon ve uygulamalarında esas yakınma sebebi olarak durmaktadır. Amerika'daki ikiz doğum oranı 1980 ile 2000 yılları arasında %75 oranında yükselmiş ve halen toplam doğumların %3'ünü oluşturmaktadır. Benzer gidiş Avrupa ülkelerinde de rapor edilmiştir. İnfertilite terapileri, uygulanmaları sonucu oluşan %1-3 tek, %30-50 ikiz ve %75'den fazla daha yüksek mertebeden çoklu doğumlardan sorumludur (Macklon, Stouffer ve ark. 2006).

**1.9.4.İleri Dönem Ovaryum Kanseri Riski:** Over kanserlerinin yaklaşık %90'ı over yüzey epitelinden köken almaktadır (Scully, 1977). Yüksek mortaliteye sahip (Parker, Tong ve ark., 1996) over kanserlerinin oluşumunu açıklamak için iki ana hipotez öne sürülmüştür. Bunlardan birincisi sürekli ovulasyona bağlı over kanseri riski ile açıklanan ovulasyon hipotezidir (Fathalla,1971; Russell , Hickey ve ark.,1990). Fathalla'nın (1971) bu hipotezine göre aralıksız ovulasyon ovaryum epitel kanseri için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Diğeri ise östrojeni de arttıran gonadotropin düzeylerinin artması ile açıklanan pituiter gonadotropin hipotezidir (Cramer ve Welch,1983 ). Yapılan bazı çalışmalarda ovaryan kanserlerin postmenopozal kadınlar ve ovulasyon indüksiyon tedavisi almış kadınlar gibi gonadotropinlerin yüksek olduğu durumlarda daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Whittemore ve Harris ,1992; Rao ve Slotman , 1991; Shoham, 1994; Balen, 1995).

Rosing ve ark. genel popülasyonla karşılaştırdıklarında klomifen sitratın ovaryum yüzey epiteli üzerine etkili olduğunu ve birçok histopatolojik değişimlere neden olduğunu göstererek ovaryum kanser gelişimini artırdığını bildirmişlerdir. İki den fazla ovaryum stimülasyonu uygulanmış kadınlarda ovaryum yüzey epitelinde değişimlerin indüklediği gösterilmiştir (G. Chene, F. Penault-Llorca ve ark.,2009).

Ayrıca ovaryum stimülasyon ajanlarının uygulanmasının implantasyon oranını, ovaryum rezervini, embriyo gelişim kalitesini olumsuz yönde etkilediğine dair kanıtlar literatürde gösterilmiştir (H.T Chao,S.Y.Lee ve ark.,2005; G.Ertzeid ve R.Storeng,2001;L.Liang, B.Xu ve ark,2009;Z.Ozcan,H.Celik ve ark,2009). Bu etkilerin artan tekrar sayılarıyla birlikte olan değişimlerine de literatürde yer verilmiştir.

Bu çalışmada yaşlı ve genç ratlarda primordiyal ve primer follikül sayılarının ışık mikroskopunda incelenen iki boyutlu ovaryum kesit görüntülerinde tarafsız stereolojik optik dissektör sayım yöntemi kullanılarak üç boyutlu ovaryum dokusundaki toplam sayılarının belirlenmesi ile aralıksız ve çok sayıda tekrarlanan KOH uygulamalarının ovaryum rezervine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1.Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Eldesi

Bu çalışma, deney hayvanları kullanılarak Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulunun 02.09.2009 tarih ve 2009-46-230 karar numaralı onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından 42 adet *Wistar albino* türü dişi rat sağlandı. Hayvanların 21 tanesi 6 aylık olup ovaryan siklusları düzenli olarak devam eden yaşlı deney grubunu oluştururken kalan 21 tanesi ise doğumlarını takiben 5. haftanın sonunda deneye alınan puberteye girmiş ve ovaryan siklusları başlamış genç deney grubunu oluşturdu. Genç ve yaşlı hayvan grupları, her birinde 7'şer rat olacak şekilde kontrol ve deney gruplarına rastgele seçilerek ayrıldı.

Deney grupları

GK= Genç Kontrol

G2= Genç iki tekrar KOH uygulanan

G8= Genç sekiz tekrar KOH uygulanan

YK=Yaşlı Kontrol

Y2= Yaşlı iki tekrar KOH uygulanan

Y8= Yaşlı sekiz tekrar KOH uygulanan

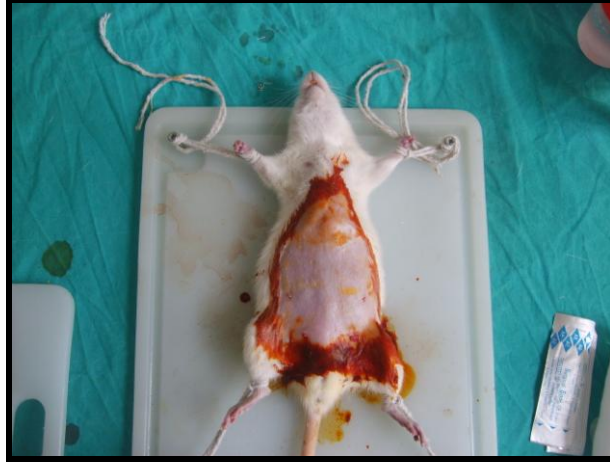
Toplamda oluşturulan 6 grup ve bu gruplara ait hayvan sayıları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1.** Deney grupları ve içerdikleri hayvan sayıları

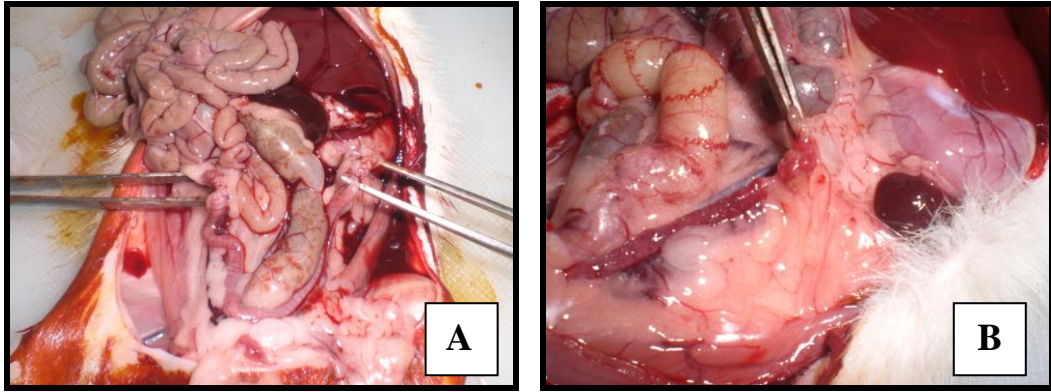
	Kontrol	2 Tekrar KOH	8 Tekrar KOH
Genç 5 haftalık	7(GK)	7(G2)	7(G8)
Yaşlı 6 aylık	7(YK)	7(Y2)	7(Y8)

Genç ve yaşlı 2 tekrar deney gruplarına 2'şer, genç ve yaşlı 8 tekrar deney gruplarına ait hayvanlara 8'er kez haftada bir defa olacak şekilde kontrollü ovaryum hiperstimülasyon(KOH) protokolü uygulandı. Kontrol gruplarına ise %0,9'luk NaCl çözeltisi verildi. Tüm uygulamalar kas içine insülin iğnesi kullanılarak yapıldı. Hayvanlarda kas dokusu harabiyeti oluşturmayı engellemek için enjeksiyonlar her hafta farklı taraftan yapıldı.

KOH uygulamaları sonlanan gruplarda son HCG verilişinden bir hafta sonra ketamin ksilazin anestezisi altında bilateral ooforektomi işlemi gerçekleştirildi. Anestezi sonrası ratlar dorso-ventral pozisyonda diseksiyon tahtasına yatırıldı ve abdominal bölge üzerindeki tüyler temizlendi (Şekil 2.1). Temizlenen bölgede orta hattın bisturi ile abdominal deri insizyonu yapıldı. Periton geçilerek, sağ ve sol overler ucu künt bir pens yardımıyla etrafındaki yağ tabakası ile birlikte çıkarıldı (Şekil 2.2 A-B). Yağ tabakası ovaryum dokusuna zarar vermeyecek şekilde temizlendi. Sol ovaryumlar bütün olarak Bouin solüsyonuna alınırken; sağ ovaryumun bir parçası ince yapı incelemeleri için %2,5'lük glüteraldehite, kalan parçası ise %10'luk tamponlu formalin çözeltisine alınarak tespit edildi.



Şekil 2.1. Dorso-ventral pozisyonda diseksiyon tahtasına yatırılarak sabitlenme



Şekil 2.2. **A:** Abdominal kavite açıldıktan sonraki görünüm **B:** overlerin ucu künt bir pens yardımıyla etrafındaki yağ tabakası ile birlikte çıkarılması

## 2.2.Kontrollü Ovaryum Hiperstimülasyon(KOH) Protokolü

Bu protokole göre ilk gün deney gruplarında bulunan hayvanlara 15 IU/0,2ml/rat dozunda r-FSH (Gonal-F, Merck İlaç Ecza ve Kimya Tic. A.Ş., İstanbul) verildi. r-FSH uygulamasından 48 saat sonra ovulasyon için 5 IU/0,1ml/rat olacak şekilde HCG (Pregnyl, Schering-Plough Tıbbi Ürünler Tic.A.Ş., İstanbul) enjekte edildi. Kontrol gruplarında bulunan hayvanlara ise aynı miktarda olması amacıyla r-FSH yerine 0,2ml izotonik %0,9 NaCl ve bu uygulamadan 48 saat sonra HCG yerine 0,1ml izotonik %0,9 NaCl çözeltisi verildi.



### 2.3.İşık Mikroskobik Değerlendirme İçin Yapılan Çalışmalar

Tüm hayvanlara ait sol ovaryumlar Bouin solüsyonuna alınarak 24-48 saat fiske edildi. Fiksasyon için kullanılan solüsyonun içeriği aşağıdadır

Bouin Solüsyonu Hazırlanışı:

- Suda doymuş pikrik asit.....300cc
- Formaldehit.....100cc
- Glasiyal asetik asit.....20cc (solüsyon kullanılacağı zaman eklenmiştir.)

Fikse olan ovaryum dokularının takip işlemleri aşağıdaki protokole göre yapıldı.

Bouin Solüsyonu Sonrası Dehidratasyon İçin Uygulanan Takip Protokolü

- %50'lik etanol.....1 saat
- %50'lik etanol.....1 saat
- %70'lik etanol.....2 saat (3 damla lityum karbonat çözeltisi damlatıldı)
- %70'lik etanol.....3 saat
- %80'lik etanol.....2 saat
- %96'lık etanol.....1 gece
- %100'lük etanol.....1,5 saat

Dehidratasyon işleminden sonra dokular ksilene alınarak şeffaflanmaları tamamlanana kadar bekletildi. Şeffaflştırılan dokular ksilol-sıvı parafine alındı 30 dakika bekletildi. Ovaryum doku örnekleri 2 kez değiştirilen sıvı parafinle 60°C'de 2 saat inkübe edildi. Parafin infiltrasyonundan sonra dokular sert parafin bloklara gömüldü.

Bloklar buzdolabında +4 °C’de bekletildi. Kesim işlemine başlamadan birkaç saat önce -18°C’ye alınan bloklardan Leica SM 2000R model mikrotom kullanılarak 60µm kalınlığında seri kesitler alındı. Sistemik rastgele örnekleme ile her ikinci kesit sayım için seçilerek hematoksilin eozin ile boyandı. Kalan kesitlere ise Mallory Azan ve Schiff’in Periyodik Asit boyası uygulandı. Kullanılan boyaların hazırlanışı ve uygulama protokolleri şu şekildedir:

#### Hematoksilen-Eozin(H-E) Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol serisi ile hidrasyon
- Suda yıkama
- Hematoksilin solüsyonu, 1 dakika
- Suda yıkama
- Eozin solüsyonu, 1 dakika
- Suda yıkama
- %75, %96 ve %100’lük etanol serisi ile dehidrasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapatma

#### Mallory Azan Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol serisi ile hidrasyon
- Suda yıkama
- %0,1 Azokarmin G solüsyonu ( 60°C etüvde 1 saat)
- Suda yıkama
- %1 anilin alkolde farklandırma
- %1 asetik alkolde durulama
- %5 fosfofungistik asitle mordanlama
- Suda yıkama

- %0,25 anilin mavisi- %1 orange G solüsyonu (1 saat)
- Suda yıkama
- %75, %96 ve %100'lük etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapatma

#### Schiff'in Periyodik Asit Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Periyodik asit solüsyonu, 10 dakika
- Suda yıkama
- Schiff solüsyonu, 15 dakika
- Metabisülfid solüsyonu, 3 ayrı şalede 3'er dakika
- Suda yıkama
- %75, %96 ve %100'lük etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapatma

#### **2.4.Elektron Mikroskobu Doku Takibi İçin Yapılan Çalışmalar**

Sağ ovaryumlardan elektron mikroskobik inceleme için alınan parçalar aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

- Ovaryum doku parçaları 0,1 M fosfat tamponu içinde %2,5 gluteraldehit ve %2 paraformaldehit içeren 7,2-7,4 pH'ya sahip solüsyonda +4°C'de 2-4 saat 1. tespit
- 0,1 M fosfat tamponunda 2x15dakika rotatorda 1.yıkama

- 0,1 M fosfat tamponu içinde %1 OsO<sub>4</sub> ile rotatorda ve karanlıkta 2 saat 2. tespit
- 0,1 M fosfat tamponunda 3x20 dakika 2. yıkama
- Distile su ile yıkama
- %70 etanolde %0,5 uranil asetat ve %1 fosfotungistik asitle rotatorda karanlıkta 2 saat blok boyama
- %70, %96, %100 alkol, propilen oksit ile dehidratasyon
- 1:1 oranda propilen oksit/araldite rotatorda 1 saat
- Araldite 2 saat
- Kapsül içine konan ovaryum doku parçaları üzerine araldite eklenmesi ile bloklama işlemi yapıldı.
- Araldite blokları polimerizasyon için 80°C etüvde 1 gece tutuldu sonrasında etüv kapatılarak bloklar kendi halinde soğumaya bırakıldı.

Bu bloklardan ultramikrotomla 800–1000 nm kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve aşağıdaki protokole uygun olarak boyandı.

#### Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü

- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu.
- Distile su içinde %1boraks, %1 toluidin mavisi, %1 Azur II içeren toluidin mavisi/Azur II boyasıyla 50°C-60°C ısıtıcıda boya kuruyana kadar bekletildi.
- Distile su ile yıkandı
- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu
- Soğutulduktan sonra ksilene alındı
- Entellanla kapatıldı

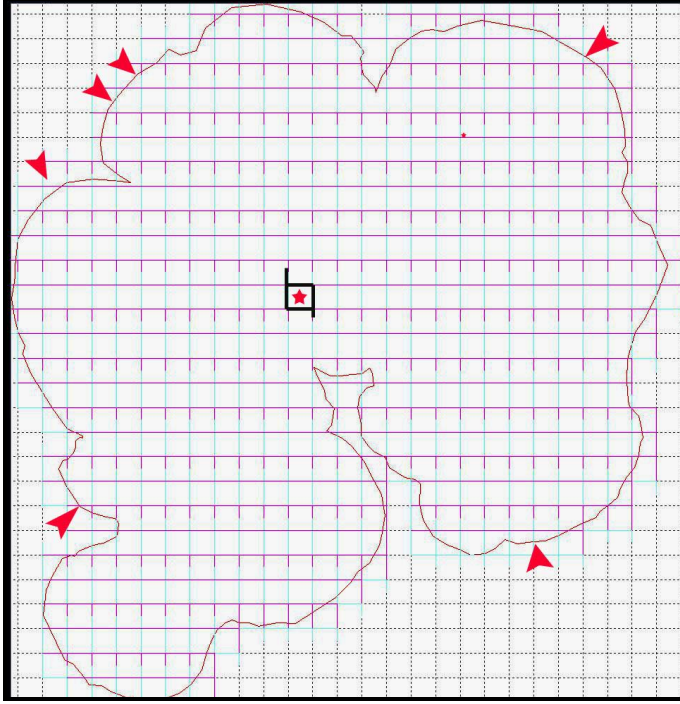
## 2.5.Ovaryum Follikül Sayımı İçin Kullanılan Stereoloji Yöntemi

60µm kalınlığında alınan ve H-E ile boyanan seri kesitlerden Sistematik rastgele örnekleme ile her ikinci kesit sayım için seçildi ( $f1$ ).

Bu kesitlerde primordiyal ve primer folikül sayıları optik disektör metoduyla sayıldı. Sistematik rastgele örnekleme kurallarına göre seçilen kesitler ile değerlendirmeye başlamadan önce pilot çalışma gerçekleştirildi. Elde edilen veriler ışığında her bir ovaryumda yeterli sayıda folikül sayımının gerçekleştirilebileceği sayım çerçevesi boyutları ( $a$ ) ve çerçevelerin yerleştirilme adım aralıkları ( $b$ ) belirlendi. Buna göre 100x100µm'lik adım aralıklarıyla 100x100µm'lik tarafsız sayım çerçeveleri yine sistematik rastgele örnekleme kurallarına uygun olarak kesitler üzerine yerleştirildi ( $f2= a/b$ ).

Sayım için kullanılan stereoloji sistemi; mikroskop (Leica DM3000B) üzerine takılı bilgisayar kontrollü XYZ ekseninde hareketli bir tabla (Ludl MAC6000), dijital kamera (Qimaging) ve tüm bunları kontrol eden stereoloji yazılımından (MBFBioscience, Stereo Investigator) oluşuyordu.

Ovaryum alanı belirlenmesi ve tarafsız sayım çerçevelerinin yerleştirilmesi işlemi x4 objektif büyütmesinde (Şekil 2.3), sayımlar ise x40 objektif büyütmesinde yapıldı.



**Şekil 2.3.** Seçilmiş ovaryum alanına yerleştirilmiş sayım çerçevesi Yıldız: bir adet tarafsız sayım çerçevesi, Oklar X4 objektifte seçilmiş ovaryum alanı sınırları

Sayım işlemi tamamlandıktan sonra tüm ovaryumdaki toplam primordiyal ve primer folikül sayılarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$N (\text{Toplam folikül sayısı}) = \sum Q \times 1 / (f1 \times f2 \times f3)$$

$f1$  = Bir ovaryumda yapılan seri kesitin tamamından sayıma dahil edilen kesit oranı

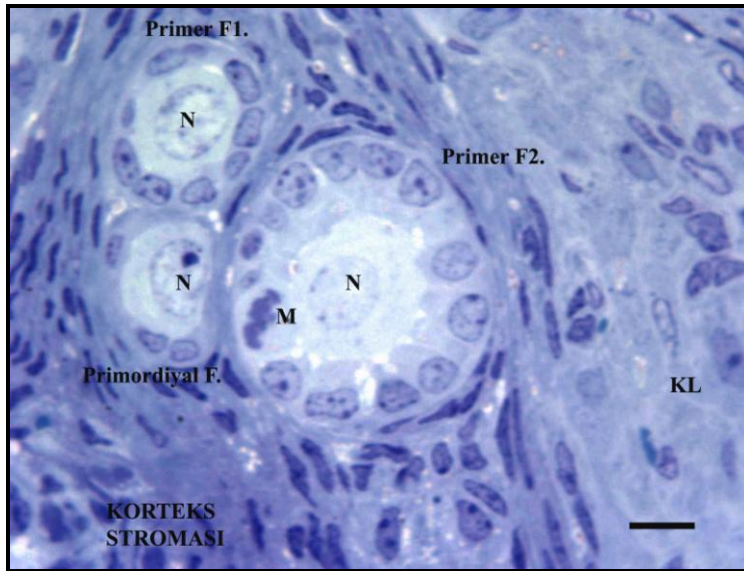
$f2$  = Sayım yapılan preperattaki sayım alanının tüm kesit alanına oranı

$f3$  = Kesit kalınlığı içinde ölçüm yapılan kalınlığın tüm kesit kalınlığına oranı

### 2.5.1.Sayım Kuralları ve Folikül Tanımlaması

Çalışmada sayımı hedeflenen primordiyal ve primer foliküller aşağıdaki kriterler çerçevesinde sayıldı:

Primer oositi çevreleyen tek tabaka yassı granüloza hücrelerinin gözleendiği foliküller **Primordiyal folikül** olarak (Şekil 2.4), primer oositi çevreleyen bir tane bile yassı hücre içermeyen tek tabaka kübik granüloza hücrelerinin gözleendiği foliküller ise **Primer folikül** (Şekil 2.4) olarak tanımlandı. (Hansen, Knowlton ve ark. 2008).



**Şekil 2.4.** Primordiyal ve Primer Folikül Primordiyal F: Tek katlı yassı epitelle çevrili primordiyal folikül, Primer F1: Tek katlı kübik epitelle çevrili primer folikül, Primer F2: Tek katlı prizmatik epitelle döşeli ileri gelişmiş primer folikül, M:Mitozun metafaz evresindeki folikül hücresi , N: Oosit Çekirdekleri, KL: Korpus luteum, yarı ince kesit, Toluidine mavisi, X100 objektif, Bar:10µm

Optik disektör sayım çerçevesinin üst ve sağ yan sınırlarına değen ve tamamen içinde kalan oosit çekirdeğinin net izlendiği foliküller sayıma dahil edilirken, sayım çerçevesinin alt ve sol yan sınırlarına değen ve dışında olan foliküller sayıma dahil edilmedi.

## 2.6.İstatistiksel Değerlendirme İçin Yapılan alışmalar

Bütün kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların ovaryum doku bloklarından hazırlanan 60µm kalınlığında alınan seri kesitler içerisinden seçilen H-E ile boyanmış preparatlarda elde edilen primordiyal ve primer folikül sayım sonuçları formüle uygulanarak her bir hayvanda tüm ovaryum dokusundaki toplam folikül sayıları belirlendi. Tüm ovaryum için elde edilen toplam primordiyal ve primer folikül sayıları One Way ANOVA ve Bonferroni istatistik testleri kullanılarak değerlendirildi. 0,05'in altındaki p değerleri ( $p<0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

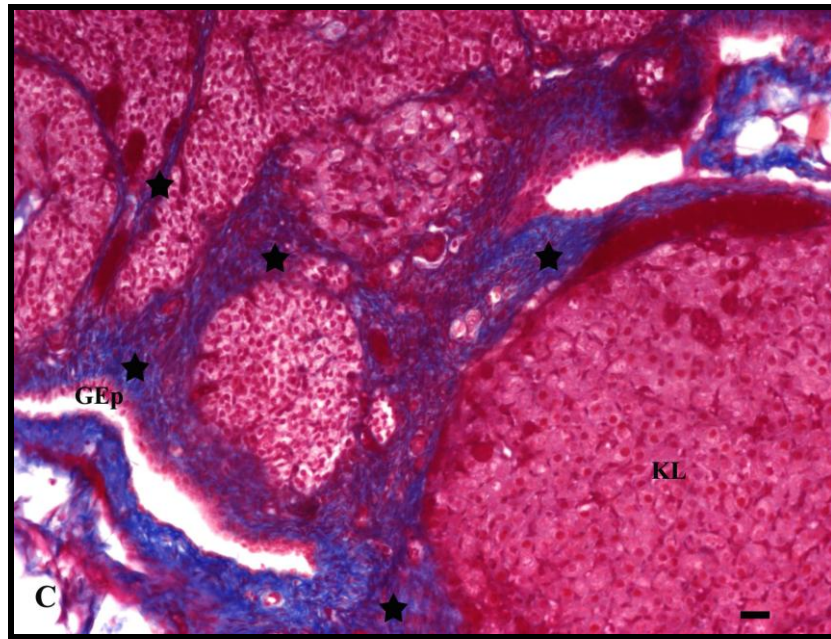
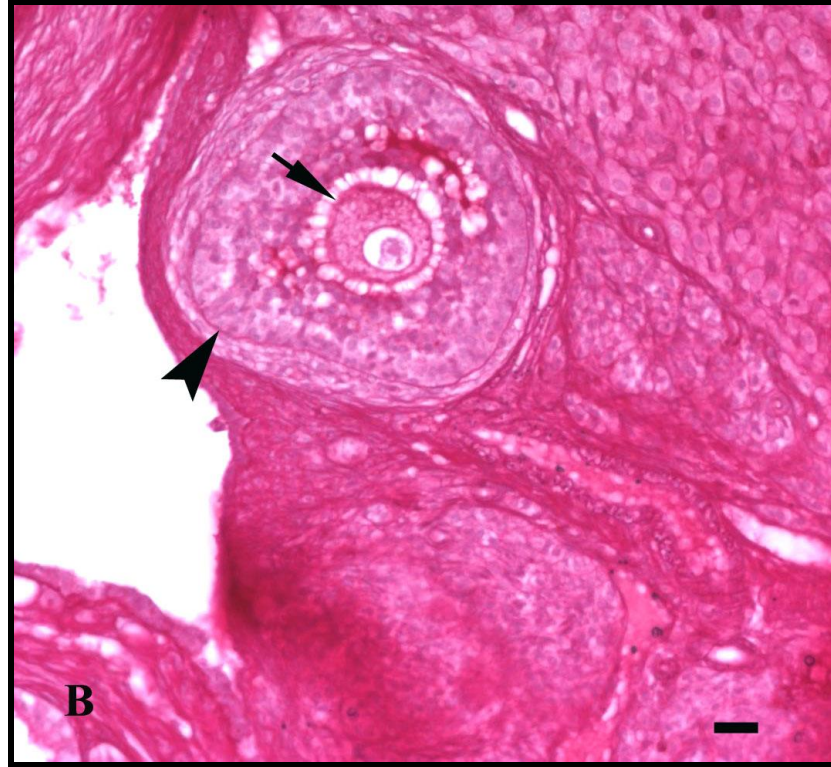


### 3.BULGULAR

#### 3.1. Işık mikroskobu Değerlendirme Bulguları

Genç ve yaşlı rat kontrol ve deney gruplarında H-E ile boyanan kesitlerde ovaryum yapısı normal görünümdeydi. Ovaryum germinal epitelinin yer yer kübik, prizmatik ve yassı epitel hücrelerinden oluştuğu gözlemlendi. Ovaryum korteksinde değişik gelişim aşamalarında ovaryum folikülleri belirgin olarak izlendi. Foliküllerin yanı sıra yeni ve gerileyen korpus luteum yapıları da vardı (Şekil 3.1 A). PAS boyasıyla boyanmış preparatlarda folikül bazal membranı ve oositi çevreleyen zona pellusida açıkça görüldü (Şekil 3.1.B). Mallory azanla boyanma sonrası anilin mavisiyle boyanan kollajen teller ve bağ dokusu elemanları normal görünüme sahipti (Şekil 3.1.C).

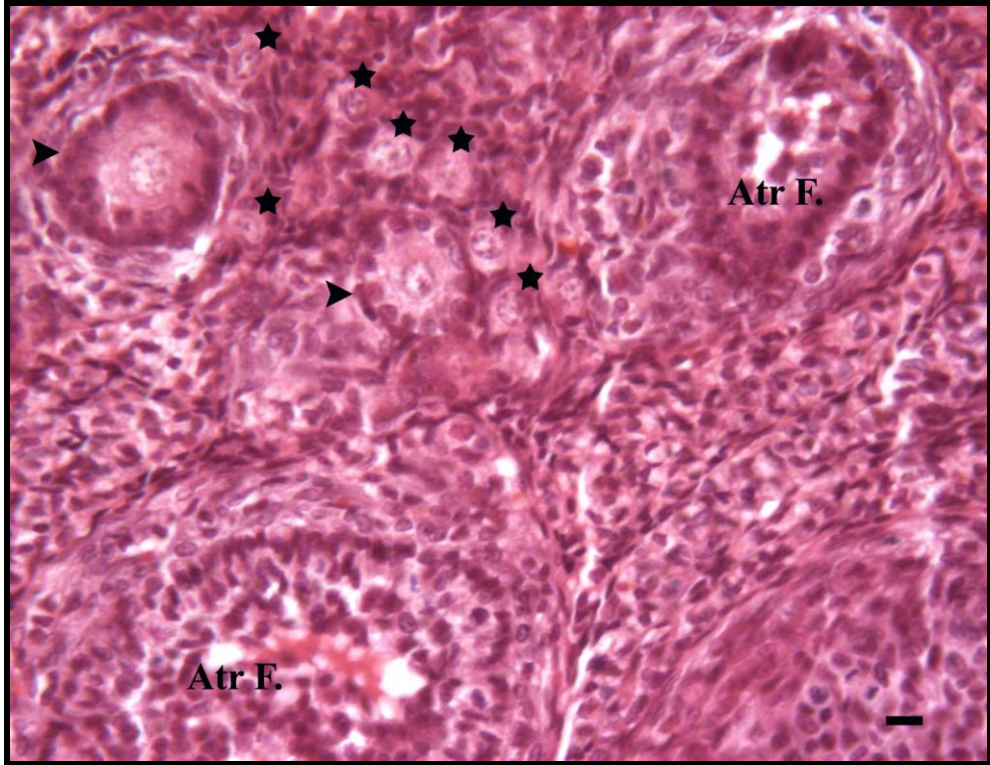




**Şekil 3.1.** A. Gf: Graff folikülü, Sf: sekonder folikül, TU: tuba uterina enine kesiti, KL: korpus luteum, ok: değişik gelişim aşamalarındaki foliküller, H-E, X4 objektif, Bar:100  $\mu$ m **B.** Ok: zona pellusida, ok başı: folikül bazal membranı, PAS, X20 objektif, Bar: 20  $\mu$ m **C.** GEp: germinal epitel, KL: korpus luteum, yıldızlar: stoma bağ dokusu, MA, X20, Bar: 20  $\mu$ m

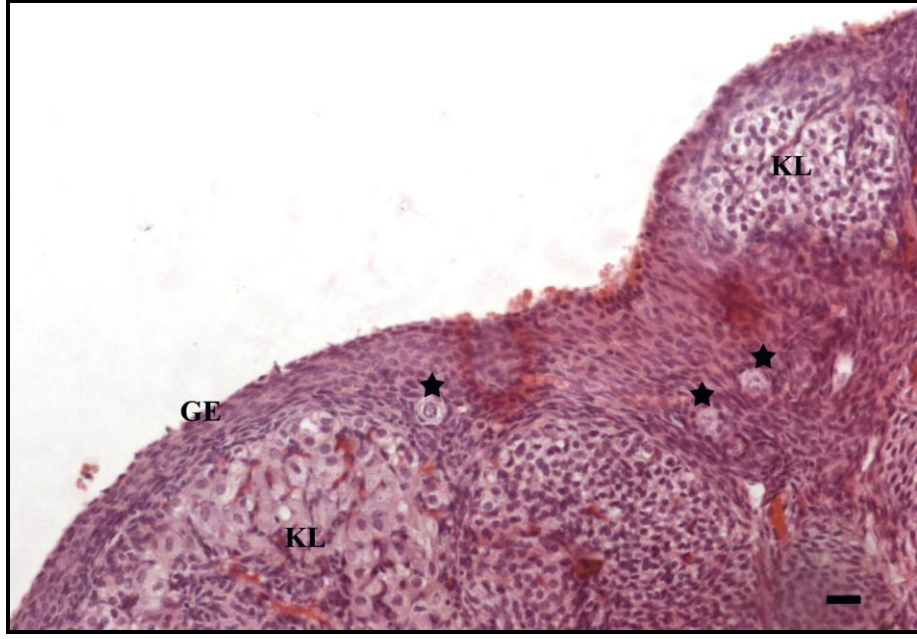


Genç rat deney gruplarında ovaryum stroması içerisinde tek katlı yassı epitel ile çevrili primordiyal ve tek katlı kübik epitelle çevrili primer foliküller daha sık izlendi. Primordiyal foliküller sadece germinal epitel altında değil çeşitli gelişim aşamalarında bulunan diğer foliküllerin aralarındaki bağ dokusunda da oldukça fazla sayıda mevcuttu. Çoğunlukla sağlam görünüme sahip olmakla birlikte arada atretik foliküller de gözlemlendi (Şekil 3.2).

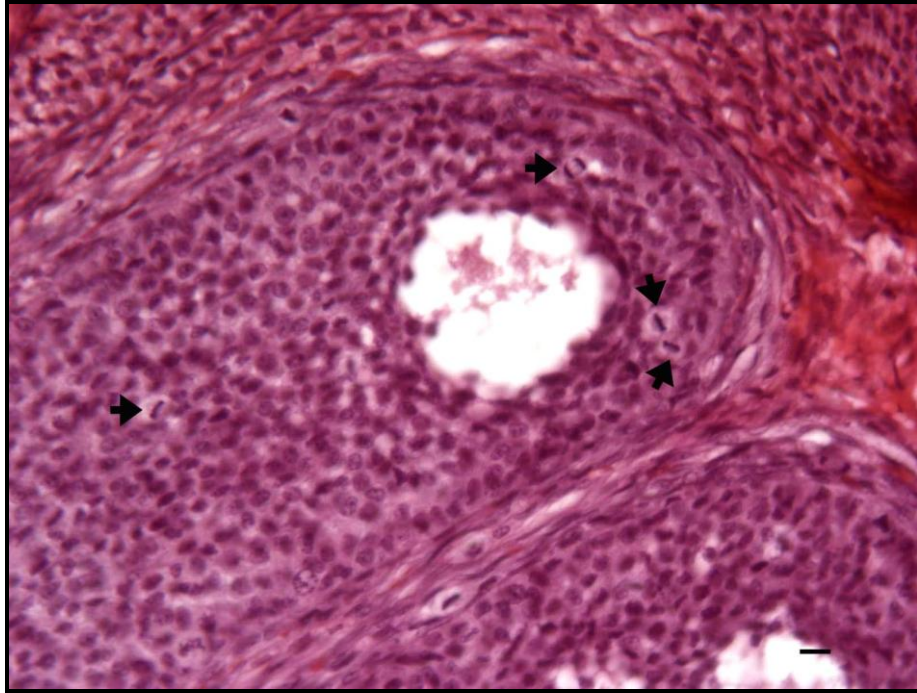


**Şekil 3.2.**Ovaryum Stromasında Foliküller Ok başı: Primer folikül, yıldızlar: primordiyal folikül, Atr F.: atretik folikül, H-E, X40 objektif, Bar:10µm

Yaşlı rat gruplarında primordiyal foliküller kortekste germinal epitel altında yerleşimli ve daha az sayıda gözlemlendi (Şekil 3.3). Gelişmekte olan folikül granuloza hücrelerinde mitozlar belirgindi (Şekil 3.4).

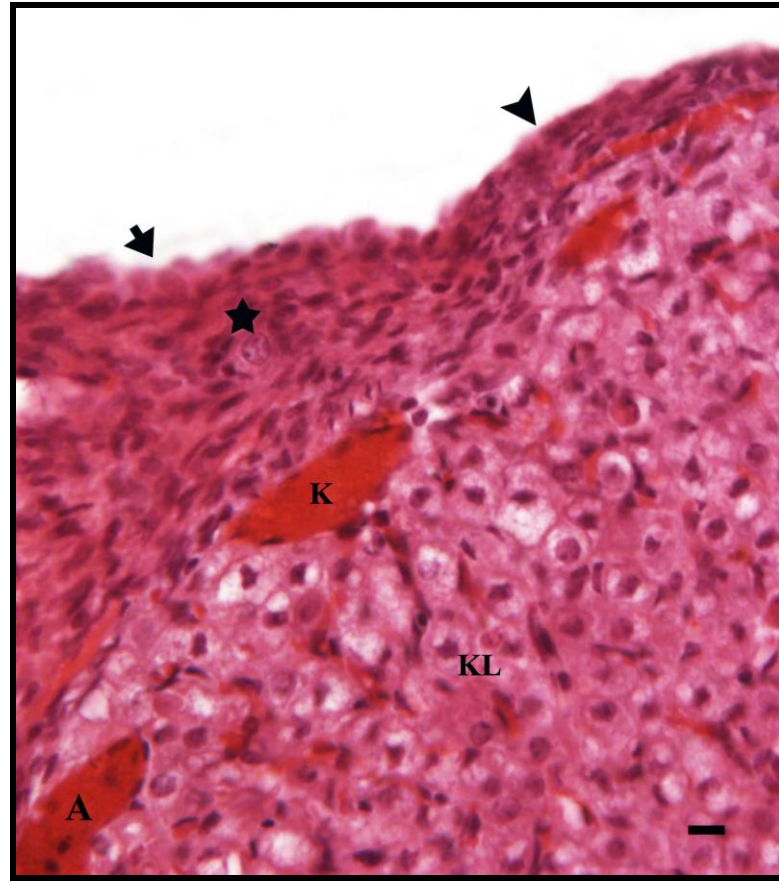


**Şekil 3.3.** Ovaryum korteksinde primordiyal foliküller, GE: germinal epitel, KL: korpus luteum, yıldızlar: primordiyal foliküller, H-E, X20 objektif, Bar: 20µm

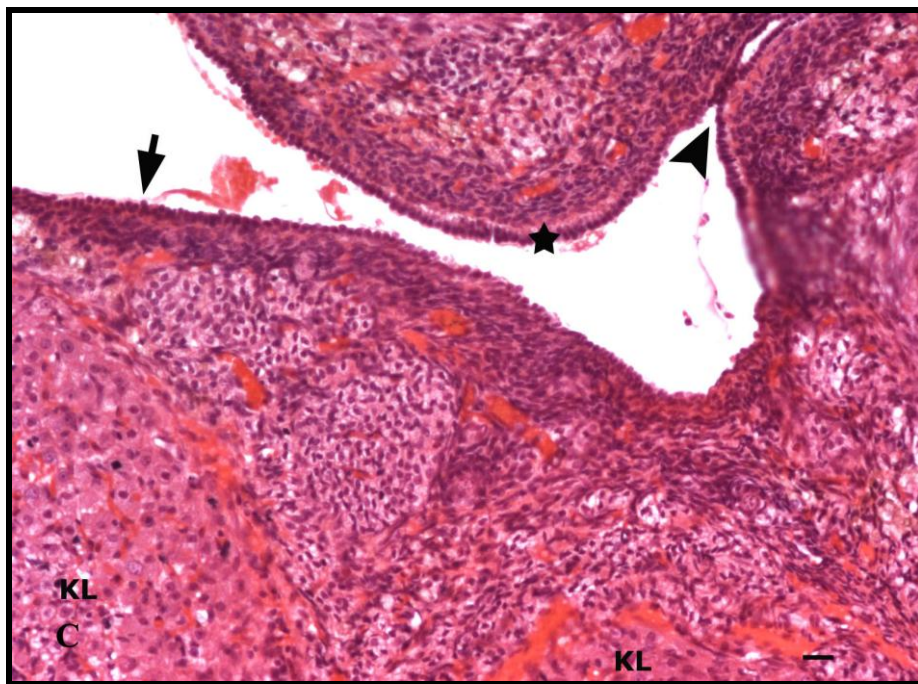
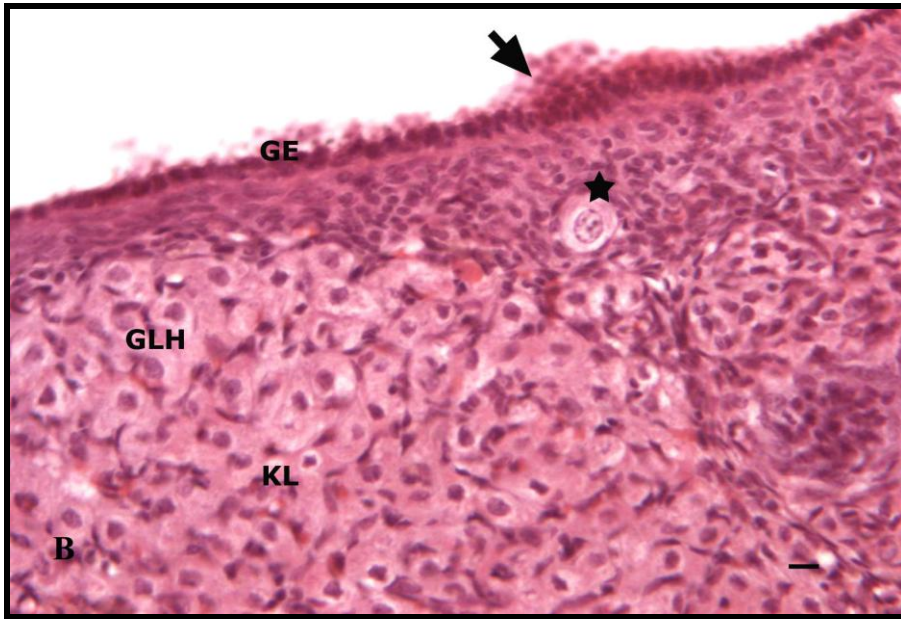


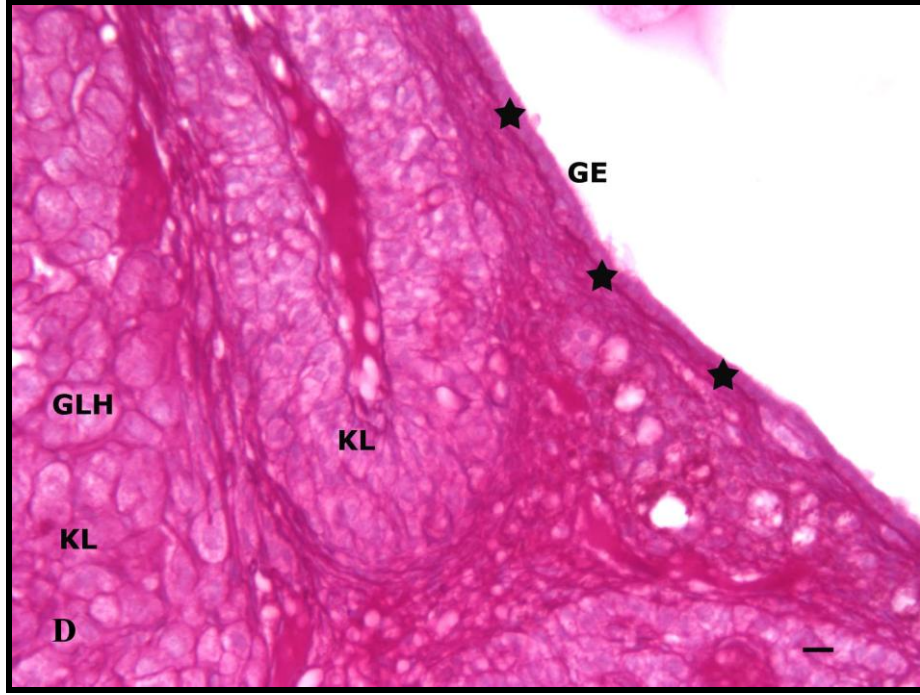
**Şekil 3.4.** Granüloza hücrelerinde mitoz, oklar: mitoz geçiren granüloza hücreleri, H-E, X40 objektif, Bar: 10µm

Ovaryumu çevreleyen germinal epitel hem genç hem yaşlı rat kontrol ve deney gruplarında çoğunlukla tek katlı kübik veya prizmatik epitel özelliğinde izlendi. Yer yer epitel hücre tabakasında artış ve epitel hücre kümelenmeleri gözlemlendi. Germinal epitel korpus luteum ve Graff foliküllerin ovaryum korteks yüzeyine yakın olduğu bölgelerde tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşmaktaydı. Ovulasyondan sonra oluştuğu bilinen, kortikal stromaya doğru yüzey epitelini de içeren yarıklar gözlemlendi. Germinal epitelin bazal membranı PAS boyamada düzenli olarak izlendi (Şekil 3.5. A-B-C-D).





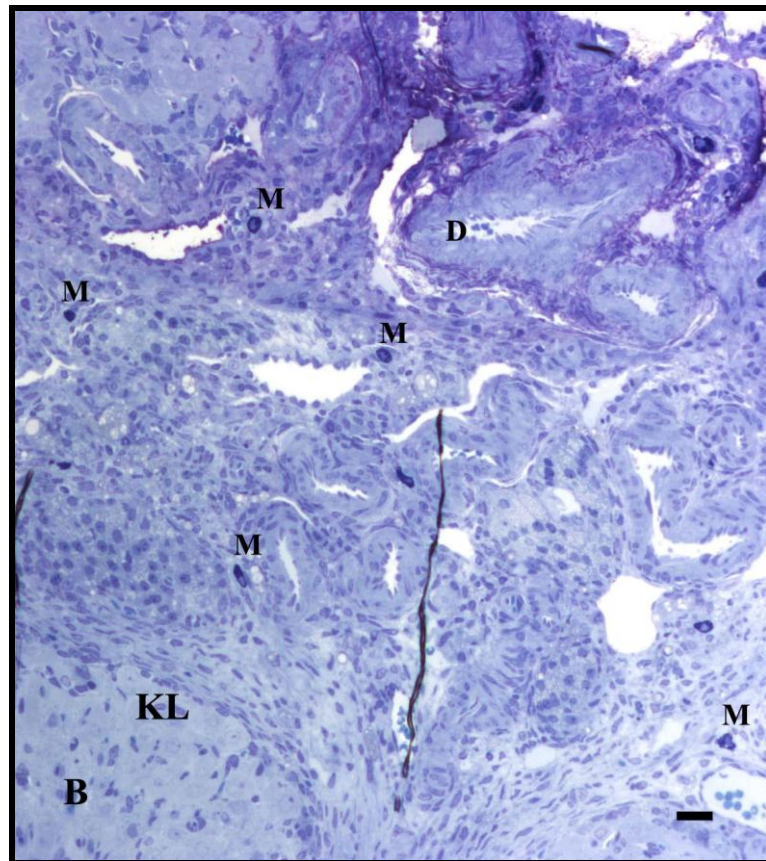
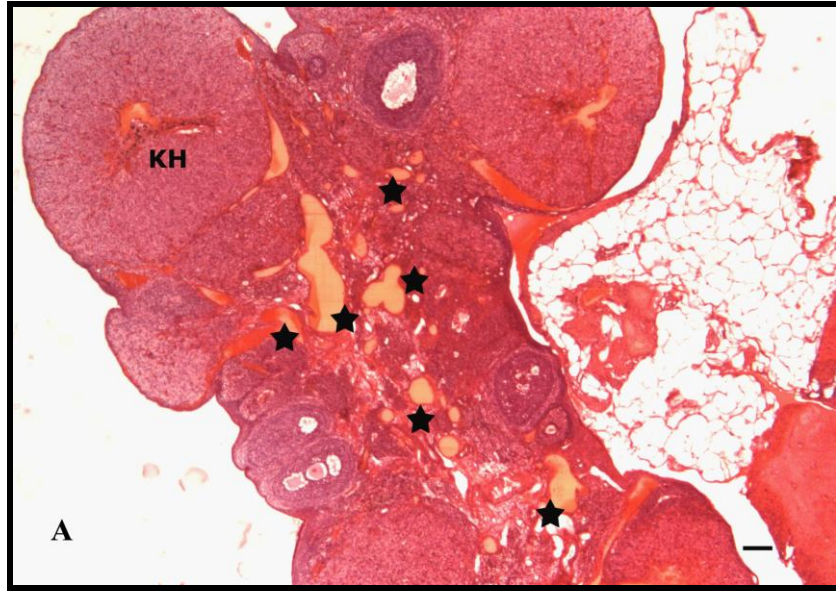




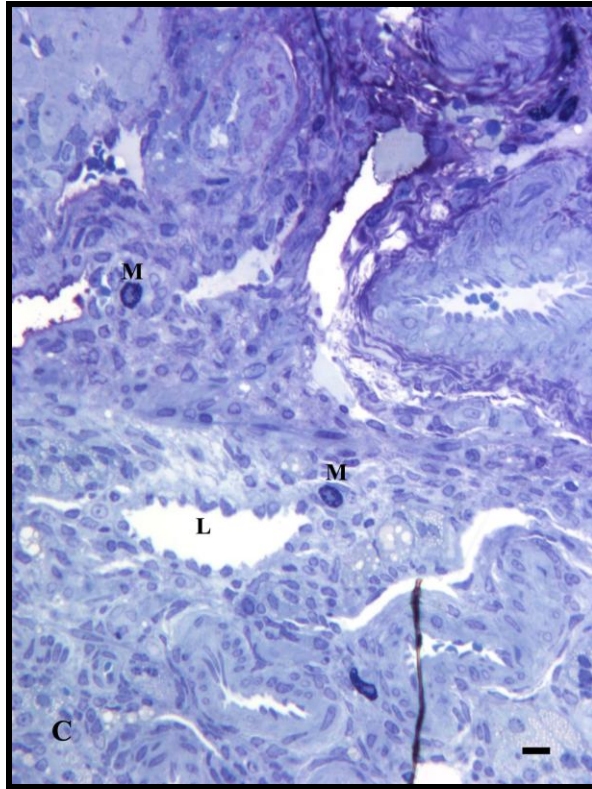
**Şekil 3.5.**Ovaryum germinal epiteli ile ilgili bulgular **A.** KL:korpus luteum, K:kapiller, yıldız:primordiyal folikül, ok: kübik epitel, ok başı: yassı epitel, H-E, X40 objektif, Bar:10 $\mu$ m ; **B.**GE: germinal epitel, GLH: granüloza lütein hücreleri, KL: korpus luteum, yıldız:primordiyal folikül, ok: epitel hücre kümelenmesi, H-E, X40 objektif, Bar: 10 $\mu$ m; **C.** KL: korpus luteum, ok:yassı epitel, yıldız: prizmatik yüzey epiteli, ok başı:epitelin over stromasına yaptığı girinti,H-E, X20 objektif, Bar: 20 $\mu$ m; **D.** KL:korpus luteum, GLH: granüloza lütein hücreleri, GE: germinal epitel, yıldızlar: yüzey epiteli bazal membranı, PAS,X40 objektif, Bar: 10 $\mu$ m

Yaşlı ratlarda 8 tekrar KOH uygulaması yapılan deney grubunda yarı ince kesitlerde özellikle damarların çevresinde, bağ dokusu içerisinde çok sayıda mast hücrelerine rastlandı. Işık mikroskopunda H-E boyamada bu grupta damarlar dilate idi ve staz mevcuttu (Şekil 3.6 A-B-C)









**Şekil 3.6.** A.KH: korpus hemorajikum, yıldızlar: ovaryan medullada dilate damarlar ve staz, H-E, X4objektif, Bar: 100µm; B.KL: korpus luteum, D:damar, M:mast hücreleri, yarı ince kesit, toluidine mavisi, X20 objektif, Bar: 20µm; C. L:damar lümeni, M: mast hücreleri, yarı ince kesit, toluidine mavisi, X40 objektif, Bar: 10µm

### 3.2. Stereolojik Yöntem Folikül Sayımı Bulgularının İstatistiksel Değerlendirmesi

Primordiyal folikül sayıları (226,11 karşılık 79,80) ve ovaryum rezervini gösteren non-growing folikül sayıları ( 269,33 karşılık 95,76) kıyaslandığında kontrol grubunda genç ratlarda yaşlı ratlara göre daha fazla sayıda olduğu bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

Yaşlı ratlarda kontrol, 2 ve 8 tekrar KOH uygulaması sonrasında ovaryumdaki toplam primer folikül sayıları genç ratlara göre daha düşük bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (15,96; 55,20; 33,25 karşılık 43,23; 63,84; 37,08) (Tablo 3.1).

**Çizelge 3.1.**Genç ve yaşlı ratlarda kontrol ve deney gruplarında ovaryumdaki toplam primordiyal, primer ve NGF sayıları

FOLİKÜL TİPİ	GENÇ			YAŞLI		
	KONTROL GRUBU (mean±SD)	2 TEKRAR DENEY GRUBU (mean±SD)	8 TEKRAR DENEY GRUBU (mean±SD)	KONTROL GRUBU (mean±SD)	2 TEKRAR DENEY GRUBU (mean±SD)	8 TEKRAR DENEY GRUBU (mean±SD)
PRİMORDİYAL	226,11±76.54*	174.23±53.62	174.23±23.14	79.80±58.44*	137.17±32.93	125.69±78.95
PRİMER	43.23±9.31	63.84±32.43	37.08±24.23	15.96±3.76	55.20±5.90	33.25±23.04
NGF	269.33±82.68**	237.91±85.75	211.47±45.84	95.76±60.85**	192.37±37.78	158.94±100.90

\* Primordiyal folikül sayısı açısından genç kontrol ve yaşlı kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).

\*\* Non-growing folikül (NGF) sayısı açısından genç kontrol ve yaşlı kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).

## 4.TARTIŞMA

Bu çalışmada kontrollü ovaryum hiperstimülasyon (KOH) ajanlarının ovaryum folikül rezervine ve ovaryum yapısına etkileri araştırılmıştır.

Ovaryumlarda oosit rezervi fetal hayatta belirlenir ve tüm üreme hayatı boyunca bu rezerve ait primordial foliküller olgunlaşma periyoduna girerek Graff folikülünün ovulasyonu ile giderek tükenir. Bu rezervin insanda sadece %1'i rodentlerde ise %10'u ovulasyon aşamasına kadar olgunlaşır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tanımına göre infertilite bir yıl korunmasız koitus rağmen gebeliğin oluşmamasıdır ve üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'inde görülmektedir. İnfertilite çiftlerin %40'ında erkek kaynaklı, %40'ında kadın kaynaklı ve %20'sinde de çiftlerin her ikisinden kaynaklanmaktadır (Wüffel, 2003). Kadınlardaki en önemli infertilite problemi ovulatuvar disfonksiyondur (Speroff ve ark., 1999). KOH uygulaması çok sayıda oosit elde etmek amacıyla yardımcı üreme teknikleri de dahil olmak üzere infertilite tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde de yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmelere karşın birçok infertil çift hamile kalabilmek için birden fazla kez KOH uygulamasına ihtiyaç duymaktadır. Tekrarlayan ovaryum stimülasyon protokollerinin oosit kalitesinde düşmeye, birbirini takip eden sikluslarda elde edilen oosit sayısında azalmaya, embriyonal gelişimin bozulmasına neden olabileceği literatürde bildirilmiştir. Ovaryum stimülasyonu için uygulanan eksojen hormonların ovaryum rezervi için tamamen risksiz bir prosedür olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. (Liang, Xu ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda ovaryum rezervinde bulunan erken gelişim aşamasındaki aktive olmamış foliküllerin aktivasyonunda gonadotropinlerin etkili olabileceği gösterilmiştir (Flaws ve ark., 1997; Meredith ve ark., 1986). Rodentlerde yapılan çalışmalar da erken foliküllerin gelişiminin gonadotropinlerin etkisiyle olduğunu düşündürmüştür bununla birlikte hayvanlarda ve insanlarda dolaşımdaki minimal FSH veya defektif FSH reseptörleri varlığında bile foliküllerin antral evreye dek ulaşmış olmaları nedeniyle preantral folikül gelişiminin gonadotropin bağımsız olduğunu düşündüren çalışmalar da

mevcuttur (McGee ve Hsueh, 2000). Preantral aşamadan sonra Sekonder (antral) foliküllerde FSH östrojen ile birlikte granüloza hücrelerinde mitotik etki gösterir ve granüloza hücre proliferasyonunu uyarır. Bu nedenle preantral ve antral foliküllerde granüloza hücrelerinde mitotik figürlere sıklıkla rastlanır. Çalışmamızda da ovaryum kesitlerinde preantral ve antral foliküllerde, granüloza ve teka hücrelerinde mitotik figürler daha sık gözlemlendi.

Ovaryum hiperstimülasyon tedavisinin ovaryum yanıtına, toplanan oosit sayısına, oosit sitoplazma ve çekirdek olgunlaşmasına, embriyon kalitesine, implantasyon oranına etkisiyle ilgili pek çok klinik ve deneysel çalışma literatürde mevcuttur (Ertzeid ve Storeng, 2001; Combelles ve Albertini, 2003; Van Blerkom ve Davis, 2001, Chao, Lee ve ark., 2005).

Tekrarlayan ovaryum stimülasyon sikluslarında yüksek doz gonadotropinlerin gelişecek folikül kohortunda bir artış yapmadığını ve dominant folikül seçimi sürecinde fizyolojik olarak atreziye gidecek foliküllerin korunmasını sağladığı bildirilmiştir (Serna ve Velasco, 2005). Yapılan bir çalışmada ard arda tekrarlanan KOH uygulamalarının folikül rezervi üzerine kötü etkisi olmadığı, buna karşın primordiyal ve primerr folikülerde hasara yol açacağı da bildirilmiştir (Liang ve ark.,2009)

Çalışmamızda stereolojik folikül sayımı sonuçlarına göre primordiyal ve non-growing folikül sayılarının kontrol gruplarında genç ratlarda yaşlı ratlara göre daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Genç rat kontrol grubunda primordiyal folikül sayılarının yaşlı kontrol grubuna göre fazla olması fizyolojik olarak yaşlı ratların ovaryum rezervlerinin azalmış olması nedeniyle beklenen bir sonuçtur.

Çalışmamızda ara vermeden yapılan 2 ve 8 tekrar KOH uygulaması sonucunda genç ve yaşlı deney gruplarında primer folikül sayılarının kontrol gruplarına göre artmış olması, kullanılan eksojen gonadotropinlerin aktive olmamış foliküllerin ileri gelişimi için aktivasyonunu sağladığını düşündürmüştür.

Gonadotropinlerin kanser oluşumunu stimule edebileceği ve tekrarlayan uygulamaların ovaryum kanserine neden olma ihtimalinin in-vivo ortamda tam olarak bilinmediği literatürde yer almaktadır (Liang ve ark.,2009).

Literatürde KOH uygulamaları ile artan sayıda ovulasyonun oluşturduğu epitel defektini kapatmak üzere yüzey epiteli hücrelerinin sürekli prolifer olmaları sonucunda transformasyona uğrayarak ovaryum kanseri gelişimine katkıda bulunabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Liang ve ark.,2009).

Çalışmamızda da genç ve yaşlı ratlara ait kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde ovaryum yüzey epiteli çoğunlukla kübik epitel hücrelerinden oluşmaktaydı, ancak yer yer prizmatik hücreler ve yassı hücrelerin bulunduğu bölgeler de izlendi. Ovaryum yüzeyinde bazı bölgelerde epitel tabaka sayısında artış ve epitel hücre kümelenmeleri gözlemlendi. Yaşlı ratlarda çok sayıda korpus luteumun gözlemlendiği ovaryumlarda derin epitel yarıklarının ovaryum stromasına doğru uzandığı görüldü. Bu bulgular normal ovaryum sikluslarında izlenebilen bulgular olarak değerlendirildi.

Ancak KOH tedavisi sırasında kullanılan ajanlarla ovarian epitelyal kanserleri arasındaki ilişki açısından karşıt görüşlü yayınların mevcut olması (Rossing ve Daling, 1994) ve infertilite tedavisinde KOH'un sıklıkla uygulanması nedeniyle ovaryum kanseri açısından dikkatli olunmalıdır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamız sonuçlarına göre genç ve yaşlı ratlarda tekrarlayan KOH uygulamasının ovaryum folikül rezervi üzerine olumsuz etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Yaşlı ratlarda kontrol grubunda fizyolojik olarak ovaryum rezervinin genç rat kontrol grubuna göre az olduğu, 2 ve 8 tekrar deney gruplarında ise stimülasyon tedavisi ile gelişmekte olan primer folikül sayılarının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da artış gösterdiği izlenmiştir.

Ancak 8 tekrar deney grubunda 2 tekrar deney grubuna göre primer folikül sayısı azalmış olarak bulunmuştur. Bu sayısal azalmanın tekrarlanan KOH uygulamalarının neden olduğu bildirilen folikül hasarına bağlı gelişmiş olabileceği kanısına varılmıştır.

Genç ratlarda 2 tekrar deney grubu primer folikül sayısı kontrole ve 8 tekrar deney grubuna göre yüksek bulunmuştur.

Genç ratlardaki 8 tekrar deney grubunda primer folikül sayısının kontrole göre daha az bulunması, yaşlı 8 tekrar grubundaki gibi tekrarlanan KOH uygulamalarının neden olduğu bildirilen folikül hasarına bağlı gelişmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Aralıksız uygulanan 8 tekrar KOH tedavisinin ileri gelişime giden primer folikül sayısının genç ve yaşlı ratlarda 2 tekrar KOH tedavi gruplarına göre azalması, fazla sayıda ve aralıksız KOH tedavisinin primer follikül hasarı yarattığını bu nedenle KOH tedavileri arasında dinlenme fazı bırakılmasının bir sonraki uygulama siklusunda elde edilecek sağlıklı folikül sayısını olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmüştür.

## ÖZET

### **Genç ve yaşlı ratlarda tekrarlayan kontrollü ovaryum hiperstimülasyon tedavisinin genital ve endokrin sistem organları üzerindeki etkisinin morfolojik olarak incelenmesi**

Kontrollü ovaryum hiperstimülasyonu(KOH) yardımıyla üreme tekniklerinde(YÜT) birden fazla oosit elde etmek, ovulasyon zamanını kontrol etmek ve IVF sonrası gebelik oranını artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Yardımla üreme tekniklerindeki gelişmelere rağmen birçok infertil çift hamile kalabilmek için birden fazla sayıda kontrollü ovaryum hiperstimülasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bizde çalışmamızda KOH tedavisinin ovaryum primordiyal ve primer folikül havuzuna ve ovaryum yapısına etkisini incelenmeyi amaçladık.

Çalışmamızda 21 adeti genç (5haftalık), 21 adeti yaşlı (6aylık) olmak üzere toplam 42 adet *Wistar albino* dişi rat kullanıldı. Genç ve yaşlı hayvan grupları kontrol, 2 tekrar ve 8 tekrar alt gruplarına ayrıldı. Kontrol gruplarına %0,9luk NaCl, 2 tekrar gruplarına 2 siklus, 8 tekrar gruplarına da 8 siklus KOH protokolü uygulandı. KOH protokolü 15IU/0,2ml/rat rFSH ve bundan 48 saat sonra ovulasyonu sağlamak için 5IU/0,1ml/rat HCG uygulamasından oluşmaktaydı. KOH uygulaması sonrası oofektomi ile elde edilen ovaryumlar Bouin solüsyonu ile fiske edildi. H-E ile boyanan histolojik kesitlerde primordiyal ve primer foliküller tarafsız stereolojik optik dissektör sayım yöntemi kullanılarak sayıldı.

Çalışmamız sonucunda kontrol gruplarında yaşlı ratlarda primordiyal ve non-growing folikül havuzunun genç ratlara oranla daha az olduğu ortaya konmuştur. Primer folikül sayılarının genç ve yaşlılarda aralıksız 2 tekrar KOH uygulaması ile en fazla sayıda olduğu bulunmuştur ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ). Yaşlı ve genç ratlarda 8 tekrar KOH uygulamasının muhtemelen folikül hasarına bağlı olarak gelişmekte olan primer folikül sayılarında azalma oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** kontrollü ovaryum hiperstimülasyonu, ovaryum, primer folikül, primordiyal folikül

## SUMMARY

### **The effects of repeated controlled hyperstimulation on genital and endocrine system organs in young and old rats**

Controlled ovarian hyperstimulation(COH) is used for multiple ovarian follicle growth and to control the ovulation time, to increase the number of oocytes for collection and the success rate of in vitro fertilization treatment in assisted reproduction techniques (ART). Despite the increasing success rate of ART, most infertile couples need more than one cycle of COH to achieve pregnancy. The aim of this study was to investigate the effect of repeated COH treatment on ovarian primordial and primary follicle pool and ovarian structure.

We used 21 young (5 week) and 21 old (6month) total 42 Wistar albino female rats in this study. Young and old rat groups separate randomly control, 2 cycle COH and 8 cycle COH subgroups. Control groupes injected with %0,9 NaCl, 2cyle and 8 cycle groupes used 2 and 8 times COH protocol. The COH protocol is contain 15IU/0,2ml/rat rFSH and after 48 hours 5IU/0,1ml/rat HCG injection. At the end of the COH treatments rats were killed and ovaries were fixed in Bouin's fluid. In the H-E stained sections primordial and primary follicles numbers were counted with an unbiased stereological optical disector method.

In control groupes primordial and non-growing follicle numbers were found to be less in old rat groupes than young rat groupes. Two times repeated COH treatment tended to increase the primary follicle numbers in both young and old rats and the difference was significant ( $p<0,05$ ). However the decrease in primary follicle numbers in both young and old rat groupes that were administered 8 cycles of COH suggested that multiple COH treatments may induced damage in primary follicles of rat ovary.

**Key words:** controlled ovarian hyperstimulation, ovary, primary follicle, primordial follicle



## KAYNAKLAR

- Balen A. The effects of ovulation induction with gonadotropins on the ovary and uterus and implications for assisted reproduction, *Human Reproduction*, 1995; **10**: 2233-7
- Chao H-T, Lee S-Y, Lee H-M, Liao T-L, Wei Y-H Ve Kao S-H, (2005), Repeated Ovarian Stimulations Induce Oxidative Damage and Mitochondrial DNA Mutations in Mouse Ovaries, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1042**: 148–156
- Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk II. Inferences regarding pathogenesis, *Journal of the National Cancer Institute*, 1983; **71**: 717-21
- Combelles C.M.H ve Albertini D.F,(2003), Assessment of Oocyte Quality Following Repeated Gonadotropin Stimulation in the Mouse, *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **68**, 812–821
- Edwards RG, Bavister BD and Steptoe PC (1969) Early stages of fertilization in vitro of human eggs matured in vitro. *Nature* **221**,632–635.
- Edwards RG, Steptoe PC and Purdy JM (1970) Fertilisation and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. *Nature* **227**,1307–1309.
- Edwards RG, Steptoe PC and Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* **87**,737–756
- Ertzeid G. , Storeng R. , The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice, *Human Reproduction* , **Vol.16**, No.22 pp. 221-225, 2001
- Fathalla MF. Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*. 1971; **2**: 163
- Flaws, J.A., et al., Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 1997. **57**(5): p. 1233-7.
- Gardner, D. K., Informa (Firm). Informa Healthcare., ve ark. (2009). Textbook of assisted reproductive technologies laboratory and clinical perspectives. London, Informa Healthcare.; 1 online resource (xv, 912 p.).
- Gartner, L. P. and J. L. Hiatt (2007). Color textbook of histology. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier.
- Hansen, K. R., N. S. Knowlton, ve ark. (2008). "A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause." *Human Reproduction*, **23**(3): 699-708.
- Jones, H. W., Jr. (2008). "The use of controlled ovarian hyperstimulation (COH) in clinical in vitro fertilization: the role of Georgeanna Seegar Jones." *Fertility and Sterility*, **90**(5): e1-3.
- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G. The program for in vitro fertilization at Norfolk Fertil Steril.1982;**38**:14-21.
- Kierszenbaum, A. L. (2007). Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık
- Kierszenbaum, A. L. and L. L. Tres (2012). Histology and cell biology : an introduction to pathology. Philadelphia, PA, Elsevier Saunders.

- Liang L. , Xu B. , Zhu G. , (2009) Effects of repeated gonadotropin stimulation on ovarian reserves and proliferation of ovarian surface epithelium in mice, *Frontiers of Medicine in China* **3**(2):220-226,
- Macklon, N. S., R. L. Stouffer, ve ark. (2006). "The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization." *Endocrine Reviews*, **27**(2): 170-207.
- McGee E ve Hsueh A.J.W, (2000)İnitial and Cyclic Recruitment of Ovarian follicles, *Endocrine Reviews*, **21**(2):200-214
- Meredith, S., D. Kirkpatrick-Keller, and R.L. Butcher, The effects of food restriction and hypophysectomy on numbers of primordial follicles and concentrations of hormones in rats. *Biology of Reproduction*, 1986. **35**(1): p. 68-73.
- Ozcan, Z., H. Celik, ve ark. (2009). "Effects of ovulation induction agents on ovarian surface epithelium in rats." *Reproductive Biomedicine Online* **19**(3): 314-318.
- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 1996; **46**: 5-27
- Rao BR, Slotman BJ. Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. *Endocrine Reviews*, 1991; **12**: 14-26
- Rossing, M.A., Daling, J.R., Weis, N.S. *et at*(1994) Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *The New England Journal of Medicine*, **331**, 771-776.
- Ross, M. H. and W. Pawlina (2011). *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Russell SE, Hickey GI, Lowry WS, White P, Atkinson Rj. Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer. *Oncogene* 1990; **5**: 1581-3
- Sadler TW. (2005), *Langman Medikal Embriyoloji*, Palme Yayıncılık
- Scully RE. Ovarian tumors. A review. *The American Journal of Pathology*, 1977; **87**: 686-720
- Serna J.ve Velasco J.A.G.,(2005), Effect of repeated assisted reproduction techniques on the ovarian response, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2005, **17**:233–236
- Shoham Z. Epidemiology, etiology, and fertility drugs in ovarian epithelial carcinoma: where are we today. *Fertility and Sterility* 1994; **62**: 433-48
- Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Sixth edition. 1999. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- Tekelioğlu, M. (2002) *Özel Histoloji –İnce Yapı ve Gelişme*, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ANTIP A.Ş.Yayımları.
- Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J. Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science*. 1981;**212**:681-2.
- Van Blerkom J. ve Davis P. , (2001), Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II Mouse oocytes matured in vivo and in vitro, *Human Reproduction* **16**(4):757-764

Whittemore AS, Harris R, Itnyre J, and Collaborative Ovarian Cancer Group. Charecteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. American Journal of Epidemiology, 1992; **136**: 1184-203

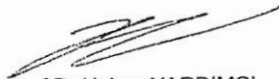
Würfel, W., How to improve results in assisted reproduction., ed. e.M.-p. GmbH. 2003

**EKLER****Ek-1: HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL ONAYI****ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ**

**TOPLANTI TARİHİ** :02/09/2009  
**TOPLANTI NO** :2009-46  
**DOSYA NO** :2009-187  
**KARAR NO** :2009-46-230

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Oya Evirgen'in araştırma yürütücüsü olduğu ve Bio.Emine Nazlı Hayırlı'nın ortak çalışmaları olan "Genç ve yaşlı ratlarda tekrarlayan kontrollü ovaryum hiperstimulasyon tedavisinin genital ve endokrin sistem organları üzerindeki etkisinin morfolometrik olarak incelenmesi" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

**ASLININ AYNIDIR**  
02/09/2009

  
Prof.Dr.Hakan YARDIMCI  
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel  
Etik Kurulu Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

### Emine Nazlı HAYIRLI

Batı Sitesi Mahallesi Altındağ Sitesi 11/3 06370 Batıkent/ ANKARA

Ev: 0 (312) 2556669 / Cep: 0 (554) 6892332

[nazlihayirli@gmail.com](mailto:nazlihayirli@gmail.com)

### Kişisel Bilgiler

---

Uyruğu: T.C  
Doğum Tarihi: 10.07.1986  
Doğum Yeri: Ankara  
Cinsiyet: Kadın  
Medeni Durum: Bekar  
Sürücü Belgesi: B Sınıfı

### Eğitim Bilgileri

---

<b>2009-</b>	<b>Ankara Üniversitesi</b> Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Yüksek Lisans Programı (Tez Dönemi)
<b>2004-2008</b>	<b>Ankara Üniversitesi</b> Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
<b>2000-2004</b>	<b>Ankara Etimesgut Anadolu Lisesi</b>

### Kongre ve Sempozyum

---

- 10.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 17-20 Mayıs 2010, İzmir
- Laboratuar Hayvanları Bilimi ve Deneysel Araştırmalar Sempozyumu 15-16 Ekim 2009, Kırıkkale-Ankara
- Uluslararası Katılımlı 19.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 22-25 Haziran 2009, Trabzon
- Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 8-11 Eylül 2007, İstanbul
- 14.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 3-6 Eylül 2007, Konya
- 13.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 20-23 Eylül 2006, İzmir

### Kurs-Çalıştay-Sertifika

---

- I. Uygulamalı Temel Hücre Kültürü Teknikleri Kursu, 2-4 Şubat 2011, Denizli
- Stereoloji Kursu Katılım Belgesi, Mayıs 2010, İzmir
- Deneysel Hayvanı Kullanım Sertifikası 12-23 Ekim 2009, Ankara
- II. Temel Hücre Kültürü Kursu Katılım Belgesi 17 Ekim 2009, Ankara
- International Course on Stereotaxy, Microsurgery and Stereology, 5-7 Ekim 2009, Samsun
- Q-PCR Çalıştayı Katılım Belgesi, Eylül 2007, İstanbul

**Kongrelerde Sunulan Poster ve Bildiriler**

---

- Rat Böbrek dokusunda İmmünsüpresif İlaç (FK506) Toksisitesinin Ultrastrüktürel Düzeyde İncelenmesi, 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Trabzon, 2009
- İmmün Baskılanma Sonrası Dalak Beyaz Pulpa Kompartımanlarında Gözlenen Morfolojik Değişiklikler, X. Ulusal Histoloji- Embriyoloji Kongresi, İzmir, 2010
- İnsan Böbrek Biyopsi Örneklerinde Transmisyon Elektron Mikroskop(TEM) Bulgularının Tanıdaki Yeri ve Önemi: AÜTF Histoloji-Embriyoloji ABD TEM Laboratuvarı Gözlemleri, 20.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Antalya,2011
- Glomerül Hastalıklarının Tanısında Geçirimli (Transmisyon) Elektron Mikroskopunun (TEM) Rolü Ve Önemi, 20.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Antalya,2011

**Görev Aldığı Projeler**

---

- Genç ve yaşlı ratlarda tekrarlayan kontrollü ovaryum hiperstimulasyon tedavisinin genital ve endokrin sistem organları üzerindeki etkisinin morfometrik olarak incelenmesi, AÜ BAP (Proje No: 10B3330027)

**Yabancı Dil**

---

İngilizce

---