

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

**UZMANLIK TEZİ
Dr. FERHAT YİĞİT**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SUNA ÖMEROĞLU**

**ANKARA
EYLÜL 2020**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

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

**UZMANLIK TEZİ
Dr. FERHAT YİĞİT**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SUNA ÖMEROĞLU**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2019-54 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
EYLÜL 2020**

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerinin (BAP) tarafından 01/2019-54 proje kodu ile desteklenmiştir.

Uzmanlık tezi çalışmamın yürütülmesinde ve tamamlanmasında büyük bir özveri ile bana destek olan, asistanlığım boyunca her zaman yanımda olan, yol gösteren, sabrı ve içtenliği ile bilimsel ve manevi anlamda beni her zaman destekleyen değerli Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na,

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen bölümümüz hocalarından Prof. Dr. Gülnur Take KAPLANOĞLU, Prof. Dr. Çiğdem ELMAS ve Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN' a,

Deney çalışmalarımnda bana destek veren Doç. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL, Arş. Gör. Dr. Saadet Özen Akarca DİZAKAR ve asistanlığım ve tezim boyunca çok yoğun bir özveri ile çalışan ve beni sürekli motive eden çok değerli arkadaşlarım Dr. Ecz. Zübeyir ELMAZOĞLU'na ve Doktora öğrencisi sevgili Ayşe KÖYLÜ'ye,

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan sevgili Babam, Annem, Ablam ve Kardeşim'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Sevgi ve Saygılarımla.

Dr. FERHAT YİĞİT

KISALTMALAR

A-1	Anjiotensin 1
A-2	Anjiotensin 2
ACE	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
AFMK	N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin
AIF	Apopitoz İndükleyici Faktör
AKT	Protein Kinaz B
AMH	Anti Müllarian Hormon
AMK	N1-asetil-5-metoksikinuramin
ARDS	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
BCL-2	B Hücreli Lenfoma 2
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
Casp-3	Kaspaz 3
CAT	Katalaz
CC	Klomifen Sitrat
CuZnSOD	Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz
CYP11A	Kolesterol Yan Zincir Klivaj Enzimi
Cyt c	Sitokrom C
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E2	Estradiol
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
ET	Endotelin
FDA	Food and Drug Administration
FH	Folikül Hücreleri
FS	Folikül Sıvısı
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GC	Granüloza Hücreleri
GER	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
H&E	Hematoksilen Eozin
H2O2	Hidrojen peroksit
hMG	İnsan Menopozal Gonadotropin
HPA	Hipotalamik Hipofizial Adrenal Aks
HPO	Hipotalamik Hipofizier Ovaryan Aks
Htc	Hematokrit
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL-1	İnterlökin 1
IL-1alfa	İnterlökin 1 Alfa
IL-1beta	İnterlökin 1 Beta
IL-2	İnterlökin 2
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
IL-10	İnterlökin 10
I-kB	İnhibitörler kinaz beta
IR	İnsülin Direnci
IU	Uluslararası Birim
IUI	İntrauterin İnseminasyon
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
IVM	İn Vitro Oosit Olgunlaşması
i.p.	İntraperitoneal
kDa	Kilodalton
KO	Kümüls Ooforus
KOH	Kontrollü Ovaryan Stimülasyon
LH	Lüteinize Edici Hormon
LPA	Lizofosfatidik Hormon
Mac-1	Makrofaj 1 Antijeni
MnSOD	Manganez Bağımlı Süperoksit Dismutaz
mRNA	Mesajcı RNA
MT1	Melatonin 1
MT2	Melatonin 2
NF-kB	Nükleer Faktör kappa beta
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NO	Nitrik Oksit
O₂	Süperoksit İyonu
OH	Hidroksil Radikali
OHSS	Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu
OMI	Oosit Matürasyon İnhibitörü
OVRAS	Ovaryan Renin-Anjiotensin Sistemi
PAS	Periyodik Asit-Schiff
PEDF	Pigment Kaynaklı Epitelyal Faktör
pg	Pikogram
PGF_{2a}	Prostoglandin F2 Alfa
PKOS	Polikistik Over Sendromu
PMN	Polimorfonükleer Nötrofil
PMSG	Gebe Kısrak Serum Gonadotropin Peptidi
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
s.c.	Subkutan
sER	Granülsüz Endoplazmik Retikulum
SG	Stratum Granülozum

SHBG	Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
SOCS	Sitokin Sinyal Baskılayıcı
SOD	Süperoksit Dismutaz
TE	Teka Eksterna
TI	Teka İnterna
TNF-alfa	Tömör Nekroz Faktör Alfa
TVUS	Transvajinal Ultrasonografi
USG	Ultrasonografi
ÜYTE	Üremeye Yardımcı Teknikler
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF-A	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A
VEGF-C	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü C
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
VEGFR-2	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
VPF	Vasküler Geçirgenlik Faktörü
WBC	Beyaz Kan Hücreleri
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri
ZP-1	Zona Pellusida 1

İÇİNDEKİLER

Teşekkür
Kısaltmalar
İçindekiler
Tablolar Dizini
Resimler Dizini
Şekiller Dizini

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Ovaryum	6
2.1.1. Ovaryum embriyolojisi	6
2.1.2 Ovaryumun anatomisi	9
2.1.3. Ovaryum histolojisi	12
2.2. Folliküler Gelişim	14
2.3. Ovulasyon	25
2.4. Anovulasyon	27
2.4.1. Anovulasyon sınıflandırılması	28
2.5. Ovulasyon İndüksiyonu	30
2.6. Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)	35
2.6.1. OHSS için risk faktörleri	36
2.6.2 OHSS sınıflandırılması	37
2.6.3. OHSS patofizyolojisi	41
2.6.3.1. Ovaryan renin–anjiotensin sistemi (OVRAS) ve OHSS	42
2.6.3.2. Sitokinler ve OHSS	44
2.6.3.3. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve OHSS	49
2.6.3.4. Pigment epitel kaynaklı faktör ve OHSS	50
2.6.4. OHSS'nin önlenmesi	51
2.6.4.1. KOH ve GnRH antagonistleri	52
2.6.4.2. Ovulasyonun tetiklenmesi	52
2.6.4.3. Coasting yaklaşımı	53
2.6.4.4. Siklus iptali	53
2.6.4.5. Yardımcı ilaçlar	53

2.6.4.6. Embriyo kriyoprezervasyonu (cryopreservation)	54
2.6.4.7. In vitro oosit olgunlaşması	54
2.7. Melatonin	55
2.7.1. Oksidatif hasar ve melatoninin overler üzerindeki koruyucu etkisi	56
2.7.2. Melatoninin ovaryan folliküller üzerine etkisi	57
2.7.3. Melatoninin korpus luteum üzerine etkisi	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM	63
3.1. Deney Hayvanları	63
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	64
3.3. Deney Grupları	65
3.3.1. Deney prosedürünün sonlandırılması	66
3.4. Örneklerin Toplanması	67
3.5. Histolojik Değerlendirme	68
3.5.1. Ovaryum dokularının alınması	68
3.5.2. Doku takibi ve parafin bloklara gömme	68
3.5.3. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi	69
3.5.4. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi	71
3.6. ELISA Analizleri	73
3.7. İstatistiksel Analizler	73
4. BULGULAR	75
4.2. Vücut Ağırlıkları Ölçümü	76
4.3. Ovaryum Ağırlıklarının Ölçümü	77
4.4. Histomorfometrik Değerlendirme Sonuçları	78
4.4.1. Ovaryum morfolojilerinin analizi	78
4.4.1.1. Kontrol grubu	78
4.4.1.2. KOH grubu	78
4.4.1.3. OHSS grubu	79
4.4.1.4. Melatonin uygulanmış OHSS grubu	80
4.4.2. Ovaryum follikül sayısı	80
4.4.2.1. Sekonder (antral) follikül sayısı	81
4.4.2.2. Atretik follikül sayısı	82
4.4.2.3. Korpus luteum sayısı	83
4.4.2.4. Graafian (olgun) follikül sayısı	84
4.4.3. Ovaryum çapı değerlendirilmesi	86

4.4.4. İmmunohistokimyasal bulgular	86
4.4.5. ELISA testi bulguları	87
4.4.5.1. IL-6 analizi değerlendirilmesi	88
4.4.5.2. VEGF analizi değerlendirilmesi	89
4.4.5.3. Estradiol (E2) analizi değerlendirilmesi	90
5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇ	106
7. KAYNAKLAR	108
8. ÖZET	121
9. ABSTRACT	121
10. ÖZGEÇMİŞ	123

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. OHSS'nin klinik olarak sınıflandırılması.	39
Tablo 2. Deneyde kullanılan cihaz ve kimyasalların listesi.	64
Tablo 3. Deney protokolü.	66
Tablo 4. Parafin doku takibi protokolü.	69



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Deney hayvanlarının ovaryum (ok) ve uteruslarının çıkarılması görüntüleri.	75
Resim 2. Kontrol grubuna ait hematoksilen&eoizin ile boyanmış kesitler.	91
Resim 3. KOH grubuna ait hematoksilen&eoizin boyalı kesitlerin görüntüleri	92
Resim 4. OHSS grubu ovaryum kesitlerinin hematoksilen&eoizin boyanmış kesitlerinin görüntüsü.	93
Resim 5. Melatonin uygulanmış OHSS grubunun hematoksilen&eoizin ile boyanmış kesitlerinin görüntüsü.	94
Resim 6. <u>OHSS grubuna ait hematoksilen&eoizin boyalı kesitlerin görüntüleri.</u> VEGF-A antikorunun tüm grup ovaryum kesitlerindeki immünreaktivitesine ait görüntüler.	95
Resim 7. VEGF-C antikorlarının ovaryum kesitlerindeki immünreaktiviteye ait görüntüler. <u>VEGF-A antikorunun tüm grup ovaryum kesitlerindeki immünreaktivitesine ait görüntüler.</u>	96
Resim 8. <u>VEGF-C antikorlarının ovaryum kesitlerindeki immünreaktiviteye ait görüntüler.</u> OHSS grubuna ait hematoksilen&eoizin boyalı kesitlerin görüntüleri. <u>VEGF-C antikorlarının ovaryum kesitlerindeki immünreaktiviteye ait görüntüler.</u>	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ovaryumların embriyolojik gelişimi.	7
Şekil 2. Dişi üreme organlarının şematik görünümü.	11
Şekil 3. Ovaryum içinden bir kesitin şematik çizimi.	15
Şekil 4. Primordiyal follikül.	17
Şekil 5. Erken primer follikül.	18
Şekil 6. Sekonder follikül.	22
Şekil 7. Gelişimin geç aşamasındaki sekonder follikül.	24
Şekil 8. OHSS patogeneğinde rol oynayan mediatörler .	42
Şekil 9. Melatonin yokluğunda lipid peroksidasyonuna yol açan olaylar (panel A) ve melatoninin ovaryum dokusunda lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkileri (panel B).	57
Şekil 10. Overlerde ROS ve RNS tarafından indüklenen DNA hasarına yol açan apoptoz kaskadının şematik çizimi (A). Melatonin, Bcl-2 ekspresyonunu indükleyerek, sitokrom c salımını modüle ederek ve kaspaz 3 aktivitesini azaltarak (B) intrinsik mitokondriyal apoptoz yolağının indüksiyonunu önler. Melatonin ayrıca elektron transferi yoluyla DNA'yı onarabilir. ROS, reaktif oksijen türleri	60
Şekil 11. Deney gruplarının deneyin 1. ve 7. günü ölçülen vücut ağırlıklarının istatistikî grafiğı. Ort.değer±SEM	76
Şekil 12. Deney gruplarının ovaryum- ve uterus ağırlıklarının ölçümünün istatistikî grafiğı. Ort.değer±SEM	77
Şekil 13. Deney gruplarının sekonder (antral) follikül sayılarının ortalama değerlerinin istatistikî grafiğı. Ort.değer±SEM	81
Şekil 14. Deney gruplarının atretik follikül sayılarının ortalama değerlerinin istatistikî grafiğı. Ort.değer±SEM	82
Şekil 15. Deney gruplarının korpus luteum sayılarının ortalama değerlerinin istatistikî grafiğı. Ort.değer±SEM	83
Şekil 16. Deney gruplarının Graafian (olgun) follikül sayılarının ortalama değerlerinin istatistikî grafiğı. Ort.değer±SEM	84

Şekil 17. Deney gruplarının folliküler kist sayılarının ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM	85
Şekil 18. Deney gruplarının ovaryum çaplarının ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM	86
Şekil 19. Deney gruplarının peritoneal aspirat sıvısındaki IL-6 seviyelerinin ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM	88
Şekil 20. Deney gruplarının peritoneal aspirat sıvısındaki VEGF seviyelerinin ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM	89
Şekil 21. Deney gruplarının serum örneklerindeki estradiol (E2) seviyelerinin ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM	90

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite tedavisinde yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) kullanımı son 30 yılda artmıştır ve gelişmiş ülkelerdeki tüm gebeliklerin %1'inden fazlası artık YÜT ile gerçekleşmektedir [1, 2]. Kontrollü ovaryum stimülasyonunun (KOH) kullanımı bir seferde çoklu ovaryum folliküllerinin gelişimini sağladığı için in vitro fertilizasyonun (IVF) başarısında kilit bir faktördür [3]. KOH genellikle güvenli bir tedavi yöntemi olmasına rağmen, OHSS de dahil olmak üzere ciddi yan etkilerin ortaya çıkma olasılığı vardır [4].

OHSS, folliküler gelişme ve ovulasyonu indüklemek için kullanılan ekzojen gonadotropin tedavisinin neden olduğu yatrogenik bir komplikasyondur [5]. En son "Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği" (ESHRE) raporuna göre, Avrupa ülkelerinde OHSS görülme sıklığı %0,18 ile %1,40 arasında değişmektedir [6]. OHSS'nin klinik ve laboratuvar bulgularına göre, sendromun şiddetini belirlemek için hafif, orta ve şiddetli olmak üzere bir sınıflandırma yapılmıştır [7]. Genç yaş, düşük vücut ağırlığı, yüksek östradiol düzeyleri, hızlı artan östradiol düzeyi, yüksek bazal anti-Müllerian hormon (AMH) konsantrasyonu, stimule olan follikül sayısı ve boyutları, toplanan oosit sayısı, polikistik over sendromu varlığı, luteal destek için insan koryonik gonadotropin (hCG) kullanımı ve gebelik, OHSS gelişimi için risk faktörleridir [7]. OHSS'nin hafif seyreden klinik formundan ağır morbidite ve hatta ölüme kadar değişen geniş bir klinik spektrumu vardır. Hafif seyreden durumlarda hastalarda genellikle karında huzursuzluk, hafif bulantı ve kusma, ishal ve genellikle birkaç gün içinde

düzelen karında distansiyon gibi belirti ve bulgular görülür. Bununla birlikte, hastalığın daha şiddetli formları, hastanede tedavi edilmesini gerektirebilecek hayatı tehdit eden komplikasyonlarla ilişkili olabilir [8]. OHSS ile ilişkili hayatı tehdit eden komplikasyonlar arasında pulmoner emboli, derin ven trombozu, akut böbrek yetmezliği, akut solunum sıkıntısı sendromu yer almaktadır. Şiddetli OHSS'ye yol açan patofizyolojik mekanizma halen net olarak bilinmemektedir. Patofizyolojisi tam olarak açıklanamasa da OHSS'nin klinik görünümünden sorumlu mekanizmanın, çeşitli bölgelerdeki kapillerler geçirgenlik artışından kaynaklandığı bilinmektedir [9, 10]. Bu artmış vasküler geçirgenlik, akut hemodinamik anormallikler ve birtakım klinik semptomlarla bağlantılı olarak sıvının hızlı ve yoğun bir şekilde intravasküler boşluktan üçüncü boşluğa (karın içi, eklem içi ve akciğerlere) geçmesine neden olur [9, 10]. OHSS'nin patofizyolojik sürecine birçok sistemin ve aracının dahil olduğu öne sürülmüştür. Bu faktörler; ovaryan renin–angiotensin sistemi, prostaglandinler, histaminler, sitokinler, VEGF/vasküler geçirgenlik faktörü (VPF), pigment epitel-kaynaklı faktör (PEDF)'dür [9-12].

İmmün sistem ile ovaryumlar arasındaki etkileşim, gonad fizyolojisinde gelecek için umut veren ovaryumun işlevi ve ovaryan süreçler ve OHSS'nin yeni olası araçlarını öne süren bir alan olarak ilgi çekmektedir [13-15]. İnterlökinler, özellikle çeşitli intra-ovaryan düzenleme mekanizmalarının olası modülatörleri olarak birçok araştırmada çalışılmıştır [11, 13, 15]. Sitokinler, folliküler sıvıda ve bunu çevreleyen ovaryum dokusunda tespit edilmiştir. IL-2, IL-6 ve TNF- α artmış

vasküler geçirgenlikte rol oynayan medyatörlerdir [16]. IL-8, lipopolisakaritle uyarılmış insan kanı mononükleer lökositleri tarafından üretilen bir nötrofil kemotaktik faktördür. IL-8, polimorfonükleer nötrofillerin (PMN) kemotaksisini indükler ve vasküler geçirgenliği artırır [17].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) bir kemokindir ve insanda en aktif endojen pro-anjiyogenik faktördür. VEGF-A, VEGFR'lerin ve anjiyogenez ile ilişkili en belirgin reseptör olan primer VEGFR-2'ye bağlanarak etki eden en önemli anjiyogenez aktivatörüdür [18]. Bunlarla birlikte, VEGF-A, korpus luteumun dejenerasyonunu hızlandırma ile ilişkili olabilecek ve progesteron üretiminin azalmasına yol açabilecek sitokinler ile de bağlantılıdır [19]. Ovaryumda gerçekleşen bu süreçlerde işlev gören vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), OHSS gelişiminde de en önemli faktör olarak görülmektedir. Ovaryum kaynaklı VEGF, hCG'ye cevaben aşırı salgılanır ve endotel hücreleri üzerinde kendi reseptörü olan VEGFR-2'ye bağlanarak vasküler geçirgenliğin artmasına ve OHSS'nin klinik belirtilerine yol açar. Ayrıca, histamin ile karşılaştırıldığında VEGF endotel geçirgenliğini 50.000 kat daha artırır [11].

OHSS'li kadınlarda, VEGF, granüloza-lutein hücreleri tarafından aşırı eksprese edilip, üretilir ve daha sonra hCG'nin indüklediği kapiller geçirgenliğin artmasına yanıt olarak folliküler sıvıya salınır [20, 21]. Bununla birlikte, plazma ve asitteki VEGF seviyeleri OHSS'nin klinik tabloları ile uyumludur. Ayrıca hCG uygulamasının, granüloza-lutein hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyonunu arttırdığı, özellikle OHSS riski taşıyan hastalarda da yüksek olduğu gösterilmiştir [22, 23].

OHSS'ye özgü kesin bir tedavi mevcut değildir. OHSS'nin riskinin en aza indirilmesi ve tedavisi için birçok etkili ajan getirilmiş olmasına rağmen, tamamen ortadan kaldırılamamıştır [11]. OHSS'in en iyi tedavisi hiç oluşmamasını sağlamaktır [11]. Uygulanan tedavi yöntemleri, oosit olgunlaşmasını tetiklemek için hCG kullanımından kaçınılması, embriyo transferinin ertelenmesi ve hastanın durumunun sıkıca izlenmesinden ibarettir [7, 11]. Özetle, OHSS tedavisinin temel dayanağı destekleyici tedavilerdir [9].

Melatonin, sahip olduğu reseptör çeşitliliği sayesinde farklı dokularda farklı işlevler gösterebilen çok yönlü bir moleküldür [24]. Melatonin reseptörlerinin insan hipotalamusunda ve hipofizinde bulunması melatoninin bu dokularda üretilen gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), follikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) gibi hipotalamus ve hipofiz hormonlarının düzenlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu reseptörler sadece merkezi sinir sisteminde değil periferik dokularda da bulunmaktadır. Melatonin reseptörlerinin (MT1, MT2) mRNA'sı ve/veya protein ifadesi, meme epitel dokusu, miyometrium [25], ovaryum granüloza ve luteal hücreleri dahil olmak üzere insan üreme dokularında tanımlanmıştır [26]. Melatonin sentezlendiğinde, pineal bez hücrelerinde depolanmaz ve hızlı bir şekilde kan dolaşımına buradan da daha sonra safra, beyin omurilik sıvısı, tükürük, semen, amniyotik sıvı ve ovaryum follikül sıvısı gibi diğer vücut sıvılarına salınır [24].

Melatonin insan follikül sıvısında plazmadan daha yüksek seviyelerde bulunur, çünkü melatonin sadece genel dolaşımdan kaynaklanmaz, ayrıca ovaryumda da sentezlenir [27]. Birçok araştırma, ovaryumun farklı mevsimsel dönemlerde melatonin üretebildiğini, başka araştırmalar ise melatonin ile follikül kalitesi ve ovaryum fonksiyonları arasında önemli bir bağ bulunduğunu göstermiştir [28]. İnfertil kadınlarda melatonin tedavisinin intra-folliküler melatonin konsantrasyonlarını arttırdığı, intra-folliküler oksidatif hasarı azalttığı ve fertilizasyon ile gebelik oranlarını arttırdığı bildirilmiştir. [24].

Melatoninin ovaryumdaki anjiyogenez süreci ile yakından ilişkili olan anjiyogenik faktör VEGF-A'nın salınımına etkisi vardır. Gerek *in vitro* gerekse de *in vivo* araştırmalar melatoninin VEGF salgılanmasını düzenlediğini gösteren destekleyici kanıtlar ileri sürmüştür. Melatoninin sıçan ovaryum epitel ve stroma hücrelerinde VEGF-A'yı ve proliferatif hücre nükleer antijen ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur [19]. Bunlarla birlikte, güçlü bir antioksidan olan melatonin, folliküler atreziyi azaltan ve *in vitro* fertilizasyon başarı oranını ve oosit kalitesini geliştiren güçlü bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicisidir [27].

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak oluşturulmuş OHSS grubundaki yapısal ve vasküler değişiklikleri Kontrol ve KOH grupları ile karşılaştırmalı olarak incelemek ve OHSS grubunda oluşabilecek değişiklikler üzerine antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen melatonin uygulamasının olası etkilerini araştırmaktır.

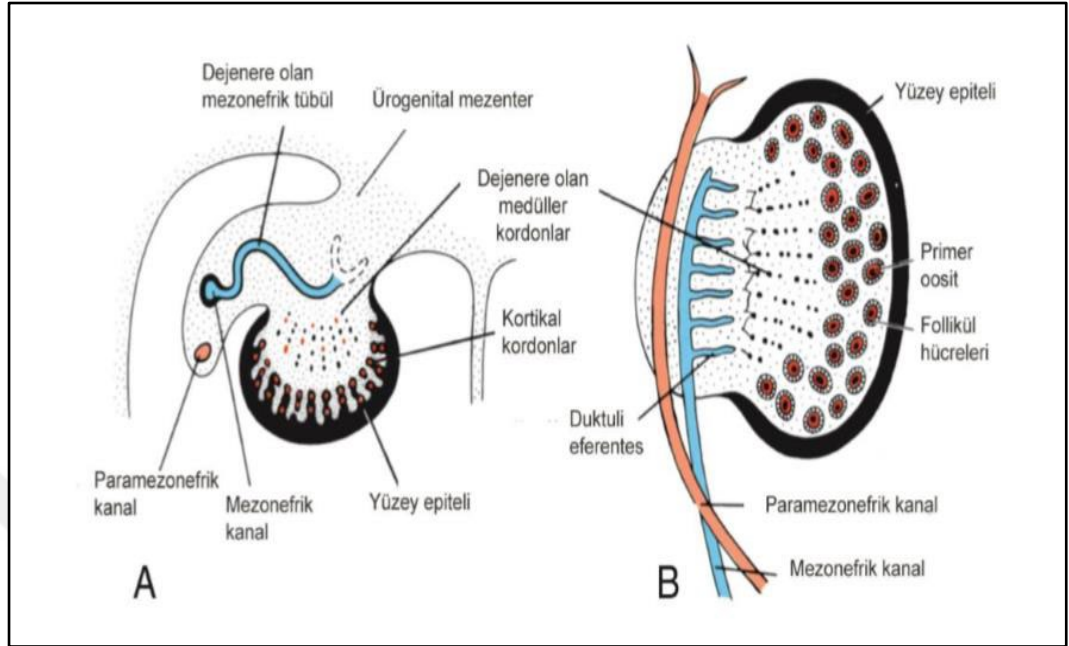
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

2.1.1. Ovaryum embriyolojisi

Bir embriyonun genetik cinsiyetinin, spermatositin bir X veya Y kromozomu taşımasına bağlı olarak, döllenme sırasında belirlendiği söylenebilir. XX cinsiyet kromozom konfigürasyonuna sahip embriyolarda, gonadın medüller kordonları geriler ve sekonder bir kortikal kord jenerasyonu gelişir. XY cinsiyet kromozom kompleksi olan embriyolarda, medüller kordlar testis kordonlarına dönüşür ve sekonder kortikal kordlar gelişemez.

XX cinsiyet kromozomu tamamlayıcısı olan ve Y kromozomu olmayan dişi embriyolarda, primordiyal cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrışır. Primordiyal germ hücre gruplarını içeren bu kümeler ovaryumların medüller kısmını oluşturur. Daha sonra bu yapılar kaybolurlar ve yerini ovaryum medullasını oluşturan vasküler bir stroma alır (Şekil 1).



Şekil 1. Ovaryumların embriyolojik gelişimi. A. Embriyogenezin 7. haftası, B. Embriyogenezin 5. ayında ovaryum ve genital kanalların embriyolojik gelişimi [29].

Dişi gonadın yüzey epiteli, erkeğin aksine, çoğalmaya devam eder. Yedinci haftada, altta yatan mezenkime nüfuz eden ancak yüzeğe yakın kalan ikinci nesil kordonlar olan kortikal kordonlar ortaya çıkar (Şekil 1).

Ovaryumlar ara mezodermden köken alırlar. Embriyonik hayatın 7. haftasına kadar dişi ve erkek embriyodaki gonadlar morfolojik olarak aynıdır. Primordiyal germ hücreleri 4. haftada vitellüs kesesi duvarında belirir ve 5-6. haftalarda ürogenital kıvrıma göç ederler. Embriyonik gelişim sırasında, primordiyal germ hücreleri, vitellüs kesesinden ovaryumların geliştiği mezonefrik sırtta göç eder. Germ hücre gelişimi kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP) -4, -8b ve -2 etkisi altındadır [30].

Gonadal sırttaki göçün sonunda, bunlar oogonium adını alır. Oogonia, granüloza hücreleri haline gelecek olan bir bağ dokusu tabakası içinde olgunlaşmaya devam edecektir. Bu süreç primordiyal ovaryum folliküllerinin temelini oluşturur [31].

Ürogenital kıvrımın mezodermal (söломik) epitelini gonadın epitelini ve stromasını oluşturmak üzere proliferer olur ve bölünen endoderm kökenli germ hücreleri ovaryumu oluşturmak üzere bu proliferer olan epitel hücreleriyle etkileşime geçerler [32].

Yedinci haftadan sonra primordiyal germ hücrelerinde mayoz bölünmeler gerçekleşir ve etraflarını söломik epitel hücreleri ile mezonefrik hücre artıkları sarar [33].

Üçüncü ayda, kortikal kordonlar izole hücre kümelerine ayrılır. Bu kümelerdeki hücreler çoğalmaya devam eder ve her bir oogonyumu folliküler hücreler adı verilen bir epitel hücre tabakasıyla çevrelemeye başlar. Oogonia ve folliküler hücreler birlikte bir primordiyal follikülü oluşturur.[29]

Yüzeyel ovaryum korteksinde söломik epitelin kıvrımları cinsiyet kordonlarını (pregranüloza hücreleri) oluşturur. Her ovaryum, gubernakulum boyunca (inguinal bölgeye aşağıdan tutturulmuş) pelvis içine iner; gubernakulum, fallop tüpünün girişinde uterus duvarının bir parçası haline gelir ve yetişkinlerde ovarian ve round ligament olarak devam eder. Gonadal çıkıntı bölgesinde söломik

epitelin invajinasyonları da iki tip genital kanalın çıkmasına sebep olur; mezonefrik kanallar (Wolffian kanallar) ve paramezonefrik kanallar (Müllerian kanallar). Sonunda Müllerian kanallarından uterusu ve uterin tüpleri oluştururlar. Wolffian kanal artıkları ise yaşamın ileri evrelerinde Müllerian kanal çevresinde görülebilir [34].

2.1.2. Ovaryumun anatomisi

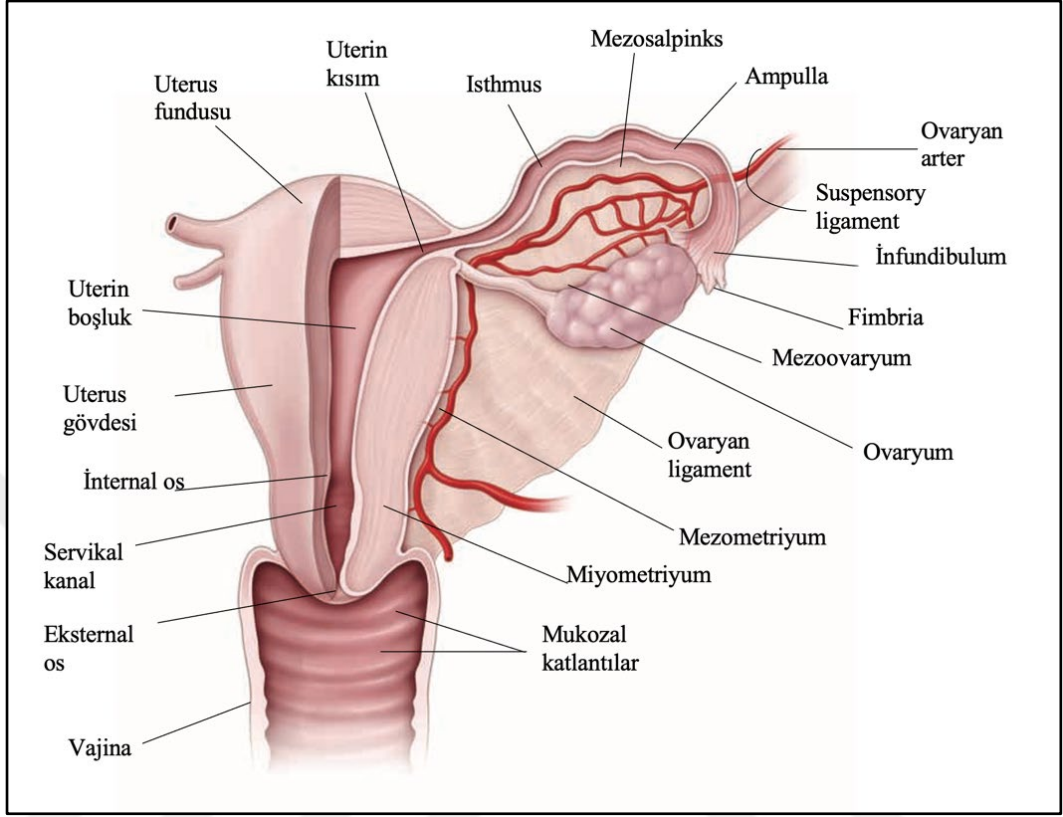
Ovaryumlar pelviste yer alan bir çift organdır. Erişkinde ovaryumlar ovoid şekilli olup yaklaşık olarak 3-5 x 1,5-3x 0,6-1,5 cm ölçülerinde ve 5-8 gr ağırlıktadır. Uterusun her iki yanında lateral pelvik duvara yakın, broad ligamanın arkasında, rektumun önünde yer alırlar. Her iki ovaryum anterior (hiler) yüzünden iki katlı periton kıvrımıyla (mezoovaryum) broad ligamanının arka yüzüne asılıdır. Aynı zamanda medial polden aynı taraf uterus kornusuna uteroovaryan ligaman ile, lateral polden lateral pelvik duvara infundibulopelvik ligaman ile bağlıdır. [35]

Aortun bir dalı olan ovaryan arter infundibulopelvik ligaman üzerinden ovaryumun mezoovaryal sınırında uterin arterin ovaryan dalı ile anastomoz yapar ve buradan çıkan yaklaşık 10 arterial dal ile ovaryum hilusundan medullaya girer [35, 36]. Ovaryumların kanlanması hem ovaryan arter hem de uterin arterler sayesinde olmaktadır. Ovaryan arter renal arterin altındaki abdominal aorttan veya L2 seviyesinden orjin almaktadır. Ovaryan arter ligamentum suspensory ovary

boyunca seyreder ve mezo-ovaryuma girer. A. ovarica broad ligament içinde a. uterina ile anostomoz yapar [37].

Ovaryumun venleri arterleri takip ederek hilusta bir araya gelip pleksus oluşturarak ovaryan venlere drene olurlar. Sağ ovaryan ven inferior kaval vene, sol ovaryan ven renal vene drene olur [35].

Ovaryumun lenfatikleri esas olarak folliküllerin teka tabakalarından köken alır. Olgun follikülün granüloza tabakası lenfatiklerden yoksunken korpus luteumda zengin bir lenfatik ağ mevcuttur [35, 36, 38]. Ovaryum lenflerinin çoğu L2 seviyesinde paraaortik lenf nodlarına drene olurlar. Lenfatikler, ovaryan ven ile birlikte renal arterlerin ve aortun bifurkasyonu yakınındaki paraaortik lenf düğümlerine gider. Ancak yapılan araştırmalarla 2 yol daha keşfedilmiştir. Birincisi, lateral damarlar yoluyla hipogastrik lenf düğümlerine drene olan lenfatikler, ikincisi ise dış iliak ve inguinal lenf nodlarına drene olan round ligamente yakın damarları takip eden lenftir. Bu yollar klinik olarak oldukça önemli olup, over kanseri metastazında önem arzeder (Şekil 2) [39].



Şekil 2. Dişi üreme organlarının şematik görünümü [40] (Türkçeleştirilmiştir).

Ovaryumların 2 sempatik innervasyon kaynağı vardır ve biri ovaryan pleksustan geçer. Ovaryan pleksusun kaynağı uterusun fundusunun bazı kısımlarını da innerve eden renal pleksusdur. Ovaryan pleksuslar ovaryan suspensory ligamentler ile ovaryumlara taşınır. Sempatik innervasyonun ikinci kaynağı ise lig. ovarie ile taşınan superior ovaryan sinirdir. Parasempatik innervasyon ise pelvik splanknik sinirlerden köken alan uterin (pelvik) pleksustur [41].

2.1.3. Ovaryum histolojisi

Ovaryumları mezotelyum yerine “germinal epitel” kaplar. Ovaryum yüzeyi tek katlı kübik ve bazı kısımlarda yassı hücrelerle kaplıdır. Germinal epitel olarak bilinen bu hücre katmanı, mezovaryumu kaplayan mezotelyum ile süreklilik gösterir. Periton boşluğuna bakan kısmında mikrovilluslar gözlenir [32]. Yoğun bir bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea germinal epitel ile altta yatan korteks arasında yer alır. Ovaryum epitel yüzeyinden ortaya çıkan tümörler ovaryum kanserlerinin %70'inden fazlasını oluşturur. Yüzey epitel tümörlerinin kökeni, ovulasyon sırasında meydana gelen germinal epitelin tekrar tekrar bozulması ve onarımı ile ilişkili olabilir.

Ovaryum, korteks ve medulladan oluşur.

Medulla veya medüller bölge

Ovaryumların merkez kısmında bulunur ve gevşek bağ dokusu, nispeten büyük, kıvrılmış kan damarları kütleli, lenfatik damarlar ve sinirler içerir (Şekil 3).

Korteks veya kortikal bölge

Ovaryumların medullayı çevreleyen periferik kısımlarıdır. Korteks bağ dokusuna gömülü ovaryum folliküllerini içerir. Folliküllerin etrafındaki stromada dağınık düz kas lifleri bulunur. Medulla ve korteks arasındaki sınır belirsizdir.

Ovaryum follikülleri, gelişen oosit için mikro ortamı sağlar.[40]

Somatik Hücreler:

Granüloza hücreleri, büyüyen oositi hemen kuşatır. LH dalgalanmasından önce androjenleri östrojene dönüştürerek ön hipofiz tarafından salınan follikül uyarıcı hormona (FSH) yanıt verirler. Granüloza hücreleri tarafından kullanılan androjenler, granüloza hücrelerinin dışında bulunan teka hücreleri tarafından sağlanır.

LH dalgalanmasından sonra granüloza hücreleri “luteinizasyon” adı verilen bir değişime uğrar. Luteinizasyon, granüloza hücrelerini, luteinizan hormona duyarlı hücrelere dönüştürür. Bu süreç granüloza hücrelerinin eskisi gibi östrojen üretmek yerine progesteron üretmesini sağlar. Ovulasyondan sonra, teka-lutein hücreleriyle birlikte granüloza hücreleri, esas olarak progesterondan sorumlu olan korpus luteumu oluşturur [42].

Stroma hücreleri, organa özgü organizasyonel bir iskelet oluşturan bağ dokusu hücreleridir (fibroblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri, vb.). Aslında,

ovaryumun epitel hücreleri en yaygın over kanseri tipinden sorumlu olsalar da stroma hücreleri de önemli bir malignite kaynağıdır. [43]

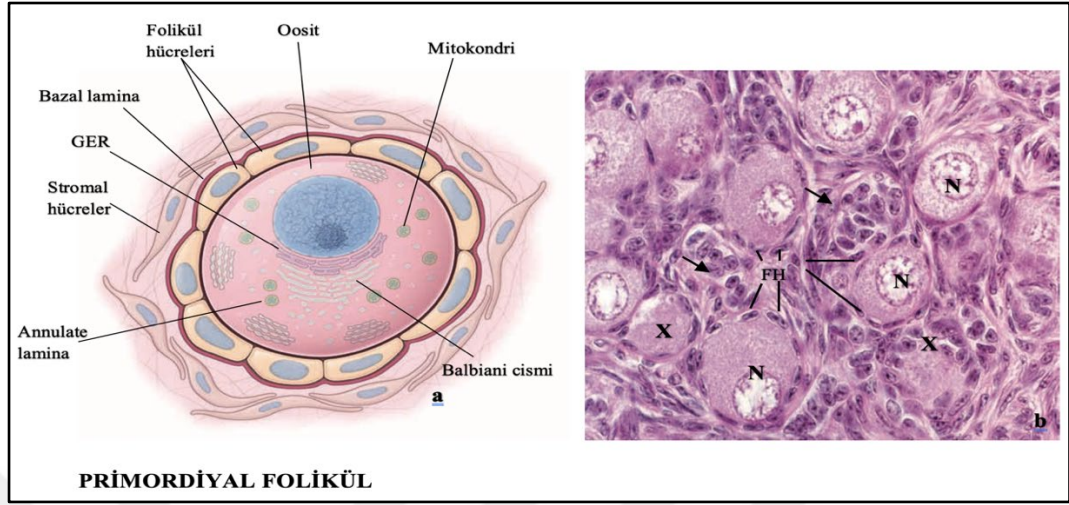
2.2. Folliküler gelişim

Ovaryan follikül gelişimi intrauterin dönemde başlar ve ovaryumun korteksinde gerçekleşir. Gebeliğin beşinci haftasında, bir dişi fetüsün ovaryumu yaklaşık 500 ila 1300 primordiyal germ hücresi içerir. Primordiyal germ hücreleri mitozla maruz kalır ve gebeliğin yirminci haftasında dişi fetüsün yaklaşık 6 ila 7 milyon germ hücresi vardır. Mitoz tamamlandığında, germ hücreleri mayoz bölünmeye girer ve mayoz faz I evresinde duraklar, germ hücre kistleri oluşur. Peripartum, her bir germ hücre kisti, bir oosit ve tek tabakalı granüloza hücreleri içeren primordiyal follikül oluşturmak için geriler. Bu süreçte birçok germ hücresi kaybedilir ve dişi 1-2 milyon primordiyal follikül ile doğar. Ergenliğe ulaştığında, yaklaşık 400.000 ila 500.000 primordiyal follikül kalır. Menarştan sonra ayda yaklaşık 1000 follikül kaybedilir. Otuzbeş yaşından sonra folliküler kayıp oranı artar [44-48].

Ovaryan follikül gelişiminin iki farklı aşaması vardır: gonadotropinden bağımsız büyüme ve gonadotropine bağımlı büyüme. Bu fazlar ayrıca sırasıyla antral öncesi büyüme ve antral büyüme olarak da bilinir. Gonadotropinler FSH ve LH'dır. Hipotalamustan salınan GnRH etkisiyle FSH ve LH ön hipofiz bezinden yapılır ve salınır. FSH, granüloza hücre proliferasyonunu uyararak folliküler büyümeyi ve LH ise ovulasyonu kontrol eder [47, 49, 50].

Primordiyal Follikül

Primordiyal folliküller ilk olarak fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkar. Primordiyal folliküllerin erken büyümesi gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Olgun ovaryumda, tunika albugineanın hemen altındaki korteks stromasında primordiyal folliküller bulunur. Oosit tek bir yassı follikül hücre tabakası tarafından çevrelenir (Şekil 4). Follikül hücrelerinin dış yüzeyi bir bazal laminayla sınırlanmıştır. Bu aşamada oosit ve çevresindeki follikül hücreleri birbirine çok yakın bir şekilde yerleşmiştir. Folliküldeki oositin çapı yaklaşık 30 µm'dir. İnce dağılmış kromatin ile bir veya daha fazla nükleol içeren büyük, ekzantrik bir çekirdeğe sahiptir. Ooplazma olarak adlandırılan oositin sitoplazması bir Balbiani cismi içerir (Şekil 4a). Balbiani cismi, Golgi zarları ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, sentriollerin, çok sayıda mitokondri ve lizozomların lokalize bir birikimi olarak ortaya çıkar. Ek olarak, insan oositleri halka şeklinde lameller içerir ve çok sayıda küçük vezikül sitoplazma boyunca küçük, küresel mitokondri ile birlikte bulunur. Annüler lamelleri bir dizi nükleer zarf profiline benzer.



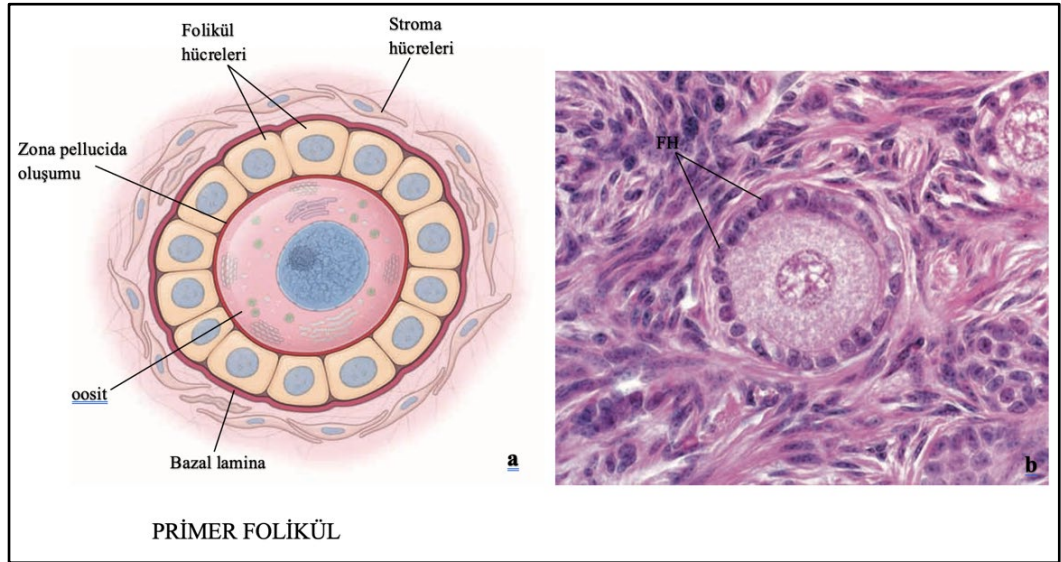
Şekil 4. Primordiyal follikül. a. Primordiyal follikülün şematik çizimi, ilk mayotik bölünmenin profaz fazında tutulan oositi gösterir. Oosit, tek katlı yassı follikül hücre tabakasıyla çevrilidir. Bu hücrelerin dış yüzeyi bir bazal laminayla bağ dokusundan ayrılır. Ooplazma, elektron mikroskobunda görüldüğü gibi, bir Balbiani gövdesi, annüler lameller ve küçük küresel mitokondri gibi karakteristik organelleri içerir. b. Primordiyal folliküllerin bu fotomikrografı, tek katlı yassı follikül hücreleriyle (FH) çevrili oositleri göstermektedir. Genellikle, oositin çekirdeği (N) ekzantrik bir konumdadır. Çekirdeğin kesit düzlemine dahil olmadığı iki oosit gösterilmektedir (X). Benzer şekilde, follikül hücrelerinin kesite bağlı ortaya çıktığı ve oositlerin görülemediği iki follikül (ok) vardır [40] (Türkçeleştirilmiştir).

Primer Follikül

Primordiyal follikül büyüyen bir folliküle dönüşürken, oositte, follikül hücrelerinde ve bitişik stromada değişiklikler meydana gelir. Başlangıçta oosit büyür ve etrafındaki yassı follikül hücreleri çoğalır ve kübik hale gelir. Bu aşamada yani follikül hücreleri kübik hale geldiğinde follikül primer follikül olarak tanımlanır. Oosit büyüdükçe, zona pellusida adı verilen ve oositi dıştan saran ve belirli proteinlerden oluşan bir yapı gelişir. Zona pellusida oosit ve bitişik follikül hücreleri arasında yer alır (Şekil 5). İnsanlardaki zona pellucida, ZP-1 (80 ila 120 kDa), ZP-2 (73 kDa) ve ZP-3 (59 ila 65 kDa) olarak adlandırılan farklı üç, sülfatlanmış asidik zona pellucida (ZP) glikoprotein sınıfından oluşur. Işık

mikroskobunda zona pellucida, asidofilik lekeler ve periyodik asit-Schiff (PAS) reaktifleri ile derinlemesine boyanan homojen ve kırılğan bir tabaka olarak açıkça görülebilir. Zona pellusida ilk olarak, tek katlı kübik veya piramidal follikül hücreleri ile çevrili oosit 50 µm ila 80 µm çapa ulaştığında görülür.

Follikül hücrelerinin hızlı proliferasyonuyla membrana granuloza (stratum granulosum) adında, oositi çevreleyen çok tabakalı bir epitel oluşur. Follikül hücreleri artık granuloza hücreleri olarak tanımlanmaktadır. Bazal lamina, prizmatik hale gelen follikül hücrelerinin en dış tabakası ile bağ dokusu stroması arasında bulunur. Folliküler büyüme sırasında granuloza hücreleri arasında çok sayıda oluklu bağlantı gelişir.



Şekil 5. Erken primer follikül. a. Erken gelişim aşamasında bir primer follikülün şematik çizimi. Oosit ve komşu follikül hücreleri arasında zona pellucida oluşumu. Tek katlı kübik follikül hücreleri büyüyen oositi çevreler. b. Primordiyal follikülün fotomikrografı. Oositi çevreleyen farklı follikül hücreleri (FH) [40] (Türkçeleştirilmiştir).

Granüloza hücreleri çoğaldıkça, follikülü çevreleyen stromal hücreler bir bağ dokusu kılıfı oluşturur. Teka olarak bilinen hücreler, bazal laminanın hemen dışında yer alır (Şekil 6). Teka hücreleri ayrıca iki katmana ayrılır:

- Teka interna, kübik sekretuar hücrelerden oluşan yüksek derecede vaskülarize iç teka tabakasıdır. Teka interna'nın tamamen farklılaşmış hücreleri, steroid üreten hücrelerin karakteristik yapısal özelliklerini sağlar. Teka interna hücreleri çok sayıda luteinize edici hormon (LH) reseptörüne sahiptir. LH stimülasyonuna yanıt olarak, östrojenlerin öncüleri olan androjenleri sentezler ve salgırlar. Salgı hücrelerine ek olarak, teka interna fibroblastlar, kollajen demetleri ve endokrin organlara özgü zengin bir küçük damar ağı içerir [40].

- Teka eksterna, bağ dokusu hücrelerinin dış tabakasıdır. Esas olarak düz kas hücreleri ve kollajen lif demetleri içerir.

İki teka tabakası arasındaki ve teka eksterna ile etrafındaki stroma arasındaki sınırlar belirgin değildir. Bununla birlikte, granüloza tabakası ile teka interna arasındaki bazal lamina, bu tabakalar arasında belirgin bir sınır oluşturur. Bazal lamina teka interna'nın zengin kılcal yatağını folliküler büyüme döneminde avasküler olan granüloza tabakasından ayırır [40].

Oosit olgunlaştıkça organellerin dağılımı değişir. Primordiyal oositin tek Balbiani cisiminden türetilen çoklu, dağınık Golgi elementleri, sitoplazmada dağınık hale gelir. Serbest ribozomlar, mitokondri, küçük veziküller ve

multiveziküler cisimlerin sayısı ve granüllü endoplazmik retikulum (GER) miktarı artar. Ara sıra lipid damlacıkları ve lipokrom pigment kitleleri de görülebilir. Memeliler dahil birçok türün oositleri, kortikal granüller olarak bilinen özel salgı vezikülleri içerir (Şekil 6a). Bu granüller oolemmmanın (oositin plazma zarı) hemen altında bulunurlar. Granüller oosit sperm tarafından aktive edildiğinde ekzositoz yoluyla salınan proteazları içerir. Zona pellusida geliştikçe, oositin çok sayıda düzensiz mikrovillus perivitellin boşluğa doğru uzanır (Şekil 6). Aynı zamanda, granüloza hücrelerinden ince çıkıntılar gelişerek oositin mikrovillusuyla birleşir ve dahası oosit plazma membranına invajine olur. Bu çıkıntılar plazma zarıyla temas edebilir, ancak hücreler arasında sitoplazmik bir devamlılık oluşturmaz [40]

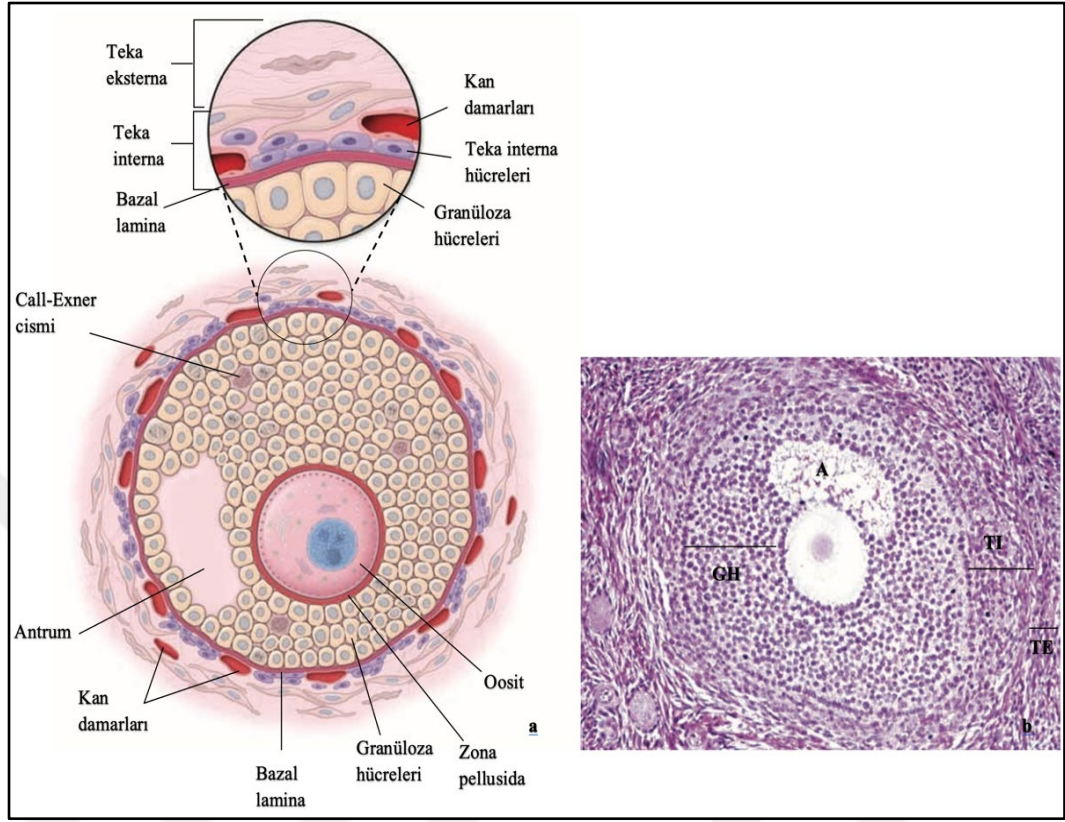
Sekonder (Antral) follikül:

Granüloza hücrelerinin proliferasyonu sonucu boyutları artan primer follikül kortikal stromanın derinlerine ilerler. Oosit ve folliküler büyüme için FSH, büyüme faktörleri (örn. Epidermal büyüme faktörü [EGF], insülin benzeri büyüme faktörü I [IGF-I]) ve kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) gibi faktörler gereklidir [40].

Sekonder folliküllerin daha fazla olgunlaşması ve ovulasyon için baskın bir follikülün seçimi gonadotropin bağımlıdır. FSH, sekonder follikülün granüloza hücre tabakasındaki FSH reseptörlerine bağlanır. FSH stimülasyonuna yanıt olarak, folliküller büyümeye ve sıvı dolu bir alan geliştirmeye devam eder. Bu boşluk antrum olarak adlandırılır ve büyüyen oosit ve granüloza hücrelerinden

salınan maddeleri içerir. LH, teka internadaki LH reseptörlerine bağlanır ve androjenlerin üretilmesini uyarır. Bu androjenler folliküler büyümeyi uyarmasının yanı sıra folliküllerde apoptozu da indükler. Ovaryum follikülleri olgunlaştıkça, daha büyük folliküller androjenleri östrojene dönüştürmek için aromataz enzimini kullanabilirler [44, 46, 47, 49, 50].

Stratum granulosum, 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında, granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar belirir (Şekil 5). Hyaluronan bakımından zengin follikül sıvısı granüloza hücreleri arasında birikmeye devam ederken, boşluklar birleşmeye başlar ve sonunda antrum adı verilen hilal şeklinde tek bir boşluk oluşturur [40]. Bu son haliyle follikül artık sekonder follikül veya antral follikül olarak tanımlanmaktadır. Yaklaşık 125 µm çapa ulaşan ekzantrik olarak konumlandırılmış oosit daha fazla büyümeyi. Büyümenin inhibisyonu, granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salgılanan oosit olgunlaşma inhibitörü (OMI) adı verilen, 1-2 kDa'lık bir peptidin varlığıyla sağlanır. Sekonder follikülün boyutu ile OMI konsantrasyonu arasında doğrudan bir korelasyon gözlenir. Konsantrasyon, küçük folliküllerde en yüksek ve olgun folliküllerde en düşüktür. Follikül sıvısının il ortaya çıktığı erken sekonder follikül evresinde 0,2 mm olan follikül çapı büyümenin devam etmesiyle 10 mm veya daha fazla çapa ulaşır [40].



Şekil 6. Sekonder follikül. a. Granüloza hücreleri arasındaki küçük sıvı dolu boşlukların birleşmesiyle ortaya çıkan sıvı dolu antrumu gösteren sekonder follikülün şematik çizimi. Aktif olarak büyüyen bu follikül birçok bölünen granüloza hücrelerine sahiptir. Call-Exner organları bu aşamada görülür. Daire içindeki büyük büyütmede, granüloza hücreleri, bazal lamina ile teka interna ve teka eksterna arasındaki ilişki gösterilmektedir. Teka interna hücreleri, oldukça vaskularize, steroid üreten hücelere farklılaşır. Teka interna, teka eksterna adı verilen bir dış stromal hücre tabakası ile çevrilidir. Bazal lamina, granüloza hücrelerini teka internadan ayırır. b. Sekonder follikülün fotomikrografi. Folliküler sıvıyla dolu antrum (A), stratum granulosum (SG) içinde görülebilir. Sekonder follikülün bazal laminasının dışında çok katlı teka interna hücreleri (TI) ve eksterna hücreleri (TE) görülebilir [40] (Türkçeleştirilmiştir).

Sekonder follikülün boyutu arttıkça, birkaç kat granüloza hücresiyle çevrili antrum da genişler (Şekil 6). Stratum granulosum, oosit ile ilişkili bölge haricinde nispeten homojen bir kalınlığa sahiptir. Burada granüloza hücreleri, antruma çıkıntı yapan, kalınlaşmış bir kitle, kümülüs ooforus oluşturur. Oositi hemen

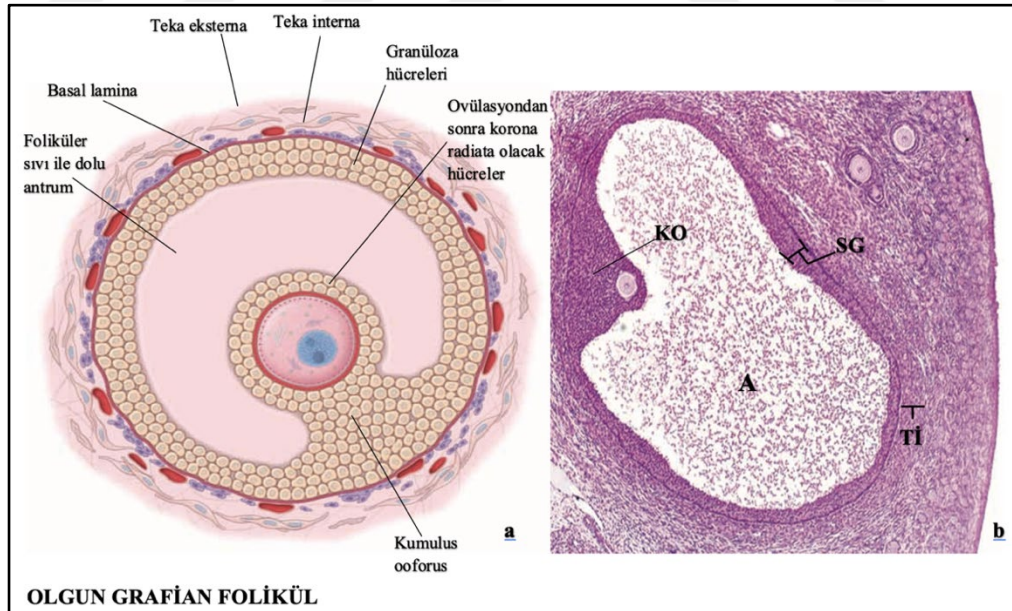
çevreleyen ve ovulasyonda onunla birlikte atılan kümülüs ooforusun hücrelerine korona radiata adı verilir. Folliküler olgunlaşma sırasında, granüloza hücrelerinin yüzey mikrovillus sayısı artar ve serbest antral yüzeyde artan sayıda LH reseptörü ile ilişkilidir. Granüloza hücreleri arasında yerleşmiş, PAS pozitif boyanan, Call-Exner cisimleri olarak adlandırılan (Şekil 6a) cisimler görülebilir. Granüloza hücreleri tarafından salgılanan bu cisimler hyaluronan ve proteoglikanlar içerir [40]

Pre-ovulatuvar (Graafian) follikül:

Olgunlaşmış bu follikül büyük boyutu nedeniyle (çapı 10 mm veya daha fazla) ovaryum korteksi boyunca uzanır ve ovaryum yüzeyinde bir çıkıntıya neden olur. Follikül maksimum boyutuna yaklaştıkça granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Stratum granulosum'un kalınlığı antrumun boyutu arttıkça incelmektedir. Granüloza hücreleri arasındaki boşluklar genişlemeye devam ettikçe, ovulasyona hazırlık olarak granüloza hücrelerinin arasından oosit ve kümülüs hücreleri serbestleşir. Oositi çevreleyen kümülüs hücreleri artık korona radiata denilen bir hücre katmanını oluşturur. Bu hücreler ve gevşek bir şekilde bağlanmış kümülüs hücreleri, ovulasyonda atılan oositle birlikte kalır [40].

Follikül olgunlaşması döneminde, tekal tabakalar daha belirgin hale gelir. Lipid damlacıkları, teka interna hücrelerinin sitoplazmasında görülür ve bu hücreler, steroid üreten hücrelerle birlikte ultrastrüktürel özellikler gösterir [40].

İnsanlarda LH, teka interna hücrelerini androjen salgılaması için uyarır. Aromataz enzimi eksikliğinden dolayı, teka interna hücreleri östrojen üretemezler. Bunun aksine, granüloza hücreleri aromataz enzimi ile donatılmıştır; bu nedenle, bazı androjenler, daha ileri işlemler için düz yüzeyle (granülsüz) endoplazmik retikuluma (sER) taşınır. FSH'ye yanıt olarak granüloza hücreleri, androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalize eder, bu da granüloza hücrelerini çoğalmaya teşvik eder ve böylece gelişmekte olan follikülün boyutu artar. Hem follikülerden hem de sistemik kaynaklardan üretilen östrojen seviyelerinin artması ile, gonadotropunların GnRH'a artan duyarlılığı artar. Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofizde FSH veya LH salınımında bir artış indüklenir [40].



Şekil 7. Gelişimin geç aşamasındaki sekonder follikül. a. Kumülüs ooforosa gömülü bir oosit içeren büyük bir antruma sahip olgun (Graafian) follikülün şematik çizimi. Oositi çevreleyen kumülüs ooforus hücreleri ovulasyondan sonra oositle kalır ve korona radiata olarak adlandırılır. b. Olgun sekonder follikülün fotomikrografı. Oosit içeren büyük bir sıvı dolu antruma (A) ve kumülüs ooforus (KO) dikkati çekmektedir. Antrum lümenini çevreleyen hücreler membrana granuloza'yı (stratum granulozum, SG) oluşturur. Ovaryum yüzeyinin sağında iki primer follikülün izlenmektedir (sağ üst) [40] (Türkçeleştirilmiştir).

Ovaryumun iki temel işlevi vardır. İlk olarak, ovaryum dişi üreme sistemini yöneten çeşitli hormonlar üretir. Diğer bir işlevi ise ovaryum, döllenme için olgun bir oositin seçilmesini, gelişmesini ve salınmasını kontrol eder. Ovaryum follikülogenezi olarak bilinen bu süreç intauterin hayatta başlar. Ergenlikten sonra, primordiyal folliküller değişik süreçlerden geçip ovulasyon öncesi olgunlaşmış folliküllere dönüşebilir [51].

2.3. Ovulasyon

Ovulasyon, döllenme potansiyeline sahip dominant follikülün ovaryumdan fallop tüpüne rüptürü ve salınması ile tanımlanan fizyolojik bir süreçtir. Esas olarak ovulasyon süreci gonodotropik hormon seviyeleri ile düzenlenir ve menstrual döngüdeki üçüncü aşamadır. Folliküler salım folliküler fazı takip eder ve endometrial dökülme veya implantasyona ilerleyen Luteal fazdan önce gelir. Hipotalamik-hipofiz-ovaryum aksın fonksiyonu iyi düzenlenmişse, menstrüasyondan yaklaşık 14 gün önce folliküler salım meydana gelir.

Artan östrojen seviyeleri, hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) aksına negatif bir geri besleme sinyali göndererek, dolaşımdaki FSH düzeylerini azaltır. Büyük bir follikül dominant follikül olarak seçilir ve azalan FSH seviyelerine duyarlıdır. Büyük folliküller granüloza ve teka hücrelerinin hızlı çoğalmasıyla birlikte olgunlaşmaya devam eder. Antrum da hızla büyür. Gelişmekte olan ancak bu döngü sırasında baskın follikül olarak seçilmeyen daha küçük folliküller dejenere olur, çünkü küçük boyutları FSH'ye duyarlılıklarını azaltır. Dominant

pre-ovuluar follikülün granüloza hücreleri, yüksek konsantrasyonlarda LH reseptörleri içerir ve LH dalgalanmasına yanıt verir. Pre-ovuluar follikül tarafından üretilen dolaşımdaki östrojen seviyesinin daha da artması LH dalgalanmasına neden olur ve ovulasyon ile sonuçlanır. Ovulasyon sırasında follikül olgun oositini döllenme için serbest bırakır [46, 47, 50].

Pubertede pubarş (tüylenme) evresi başlangıcında, gonadotropik hormonlar, primordiyal folliküllerin Mayoz 1 evresinin tamamlanmasını sağlayarak sekonder bir follikül oluşmasını sağlarlar. Sekonder follikül Mayoz 2 ile başlar ve döllenme olana kadar bu evre tamamlanamaz. Her ovulasyon döneminde sağlıklı, döllenebilecek, baskın bir follikül salınımı için ortalama 1.000 follikül kaybeder ve bu süreç yaşa bağlı olarak da hızlanır. Her ovulasyon periyodunda, follikül sayısı bu şekilde azalarak sonunda ovulasyon fonksiyonunun durmasına veya menopozun başlamasına neden olur. Ayrıca her ay sağ ve sol ovaryumların follikül salınımlarını değiştirdiği ise yaygın bir düşüncedir [52-54].

Ovulasyon, GnRH, Gonadotropin hormonları (FSH, LH), Östrojen ve Progesteron gibi hormonların seviyelerinin dalgalanması ile düzenlenir. Bu hormonlar arasındaki sıkı ilişki ve kontrollü değişiklikler, bir oositin adneksal uterus yapılarına salınması için zorunludur [53].

Luteal Faz:

Luteal faz menstrual döngünün 14-28. Günleri arasında sürer. Korpus luteum oluşumu ile başlar ve hamilelik veya luteoliz (korpus luteumun yok edilmesi) ile sonlanır. Ovulasyondan sonra, granüloza ve teka hücreleri sırasıyla granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri haline geldiğinde oositi atılmış olan boş follikül korpus luteum adını alır. Korpus luteum, implantasyonu ve erken gebeliği desteklemek için progesteron ve östrojen salgılar. İmplantasyon gerçekleşmezse, korpus luteum, korpus albicans olarak bilinen bir bağ dokusu yapısına dönüşür [50].

Düşen hormon seviyeleri FSH'yi bir sonraki döngü için follikül almaya başlaması için uyarır. Döllenme meydana gelirse, erken plasenta tarafından üretilen hCG korpus luteumu korur ve plasenta gebeliği desteklemek için yeterli progesteron yapana kadar progesteron seviyelerini korur [55].

2.4. Anovulasyon

Ovulasyon bozuklukları, infertilitenin yaklaşık %30'undan sorumludur ve genellikle düzensiz menstruasyon dönemleri (oligomenore) veya adet görememesi (amenore) ile kendini gösterir. Tedavilerin çoğu basit ve etkilidir. Bununla birlikte, anovulasyonun tüm nedenleri ovulasyon indüksiyonu ile tedaviye uygun değildir. Anovulasyon çoğu zaman tıbbi veya cerrahi indüksiyonla tedavi

edilebilir, ancak ovulasyon indüksiyonunun mümkün olup olmadığını belirleyecek olan anovulasyonun sebebidir [56].

2.4.1. Anovulasyon sınıflandırılması

Anovulasyon Bozuklukları, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 3 gruba ayrılmıştır.

Grup I Bozuklukları: Anovulasyon vakalarının %10'undan sorumlu olan Hipogonadotropik hipogonadizme yol açan hipotalamik sorunlar neden olur. Bunlara örnek olarak Kallmann Sendromu, apopleksiden kaynaklanan Panhipopituitarizm, otoimmün yıkım, adenom etkileşimi veya enfeksiyonlar verilebilir. Doğum sonrası kanama (Sheehan Sendromu) veya kafa travması da geri dönüşü olmayan veya geçici olan hipotalamik yetmezliğe neden olabilir [57].

Grup II Bozukluklar: Anovulatuvar vakalarının %85'inden sorumlu olan HPO aksın disfonksiyonu. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kadın kısırlığının en yaygın nedeni, ovulasyonu tetiklemek için kullanılan çeşitli hormonal faktörlerin tetiklediği ovulasyon işlev bozukluğudur. HPO aksının (hipotalamus, hipofiz, ovaryum) herhangi bir noktasında problemler ortaya çıkabilir ve ovulasyon başarısızlığına neden olabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kronik ovulatuvar disfonksiyonun en yaygın nedeni, ovulasyonu birçok noktada engelleyen Polikistik Over Sendromu (PKOS)'dur [54].

Polikistik Over Sendromu, anovulatuvar infertilitenin etiolojisinde yer alan bir endokrinopati olarak kabul edilir (vaka sayısı>%90). PKOS, frajil ve hiperplastik endometriyal dokunun neden olduğu anovulatuvar kanamaya sekonder düzensiz menstruasyon döngüleri ve hiperandrojenizm ile karakterizedir ve çeşitli metabolik düzensizlikler (hiperinsülinemi) ile ilişkilidir [58].

Hiperandrojenizm, androjen hormon seviyeleri ile LH / FSH seviyeleri arasındaki dengenin bozulmasının sonucudur. Bunun nasıl meydana geldiğine dair kesin mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır, ancak araştırmalar, östrojenin androjenlere yağ dokusu tarafından periferik dönüşümü sonucunda serum androjen seviyelerini yükselttiği ve östrojenin azalması ile sonuçlanan bir mekanizma ile olduğu düşüncesini desteklemektedir [54].

İnsülin direncine (IR) sekonder hiperinsülineminin PKOS'ta rol oynadığı düşünülmektedir. Ergenlik döneminde, insülin büyüme faktörü-1'den (IGF-1) kaynaklanan ve bir dereceye kadar insülin direncinin görülmesi yaygın bir düşüncedir. IR glikoz metabolizması ile sınırlıysa, bu süreç büyük ölçüde normal kabul edilir. PKOS'lu kadınlarda IR, karaciğer dahil birçok sistemi etkiler ve bu da cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) sentezinin azalmasına neden olur. Düşük SHBG seviyeleri, hormon dengesini daha da bozarak serbest androjenlerin yükselmesine katkıda bulunur [54].

Olgunlaşmamış hipotalamik-hipofiz-ovaryum aksı

Olgunlaşmamış hipotalamik-hipofiz-ovaryum aksın bir sonucu olarak adölesan kadınlarda düzensiz menstruel kanama ile ortaya çıkan anovulasyon, yaygın ve beklenen bir bulgu olabilir. Menarş başlangıcından sonraki ilk yıl içinde anovulatuvar menstruasyon paterni görülebilir ve 18 yaşına kadar devam edebilir. HPO aksının olgunlaşmaya ulaştığına inanılmaktadır [58, 59].

Grup III Bozukluklar: Genetik, yatrojenik veya edinilmiş nedenlerin bir sonucu olarak oositlerin erken tükenmesini düşündüren ovaryum yetmezliği olarak tanımlanır. Turner sendromu, prematüre ovaryan yetersizliğinin en yaygın genetik formu iken otoimmün tiroidit ile indüklenen hipotiroidizm, grup III anovulasyon disfonksiyonuna neden olan otoimmün aracılı en önemli ovaryum yetmezliği durumudur [58, 60, 61].

2.5. Ovulasyon indüksiyonu

Ovulasyon indüksiyonu, ovaryum disfonksiyonu olan kadınlarda normal ovulasyonu uyarmak için ilaç kullanımını tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir ifadedir. Ovulasyon indüksiyonu için kullanılan ilaçlar ayrıca diğer infertilite nedenleri (erkek faktörü, yaşa bağlı ve açıklanamayan) olan hastalarda folliküler gelişimi uyabilir, ovulasyonu artırarak yardımcı üreme teknolojilerinde veya in vitro fertilizasyonda oosit toplama işleminde ovaryumları aşırı uyarmak için kullanılabilirler [62].

1- Klomifen sitrat

En yaygın ovulasyon indüksiyon ilacı, zamanlanmış cinsel ilişki veya İntra uterin inseminasyon (IUI) ile birlikte kullanılan klomifen sitrattır (CC). CC hem östrojen agonisti hem de antagonist özelliklere sahip trifeniletilen türevi nonsteroid bir maddedir. 1967'de klinik kullanım için onaylanmış ve ağırlıklı olarak bir östrojen antagonisti olarak işlev görmektedir ve esas olarak hipotalamustaki östrojen reseptörlerine bağlanır. CC'nin östrojen reseptörlerine uzun süreli bağlanması, artan östrojen seviyesinin negatif geri beslemesini kesintiye uğratar ve folliküler büyümeyi ve olgunlaşmayı uyaran FSH'nin sürekli üretimine neden olur. Normal tiroid ve prolaktin seviyelerine sahip ve endojen östrojen üretebilen anovulatuvar kadınlarda kullanımı endikedir. Ayrıca, açıklanamayan infertilitesi olan kadınların ampirik tedavisi için IUI ile kombine olarak kullanılır [63].

CC, spontan veya progesterin ile indüklenen menstruasyonun başlamasından 3 ila 5 gün sonra oral olarak uygulanır. Geleneksel uygulamanın aksine, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, progesterin yoksunluğu yaşamadan önce CC'ye başlayan PKOS'lu anovulatuvar kadınların, menstruasyonu indüklemek için progesterin alan kadınlardan önemli ölçüde daha yüksek gebe kalma ve canlı doğum oranlarına sahip olduğunu ileri sürdü [64]. CC tedavisi tipik olarak 5 gün boyunca günde bir tane 50 mg'lık tablet ile başlar. Ovulasyon genellikle son CC dozundan 5 ila 10 gün sonra ortaya çıkar. CC kullanan hastalarda ovulasyonu doğrulamak ve ovulasyonu sağlayan en düşük dozla devam etmek önemlidir. Hastalar ovule

olur ancak bu döngü sırasında hamile kalmazlarsa dozu artırmanın bir yararı yoktur. Hastalar anovulatuvar kalırsa, doz artırılmalıdır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin önerilen maksimum dozu 5 gün boyunca 100 mg / gün'dür; bununla birlikte bazı doktorlar, ovulasyon sağlanana kadar dozu 50 mg'lık artışlarla 250 mg'a kadar artırmaya devam etmektedirler. Günde 250 mg'lık 5 günlük bir rejimle ovulasyonu başaramayan bazı CC'ye dirençli kadınlar, aynı dozun 8 günlük kürüne yanıt verebilir [65].

Anovulatuvar kadınlarda CC kullanımı, yumurtlayan ve ilacı 12 sıklusa kadar sürdürenlerde yaklaşık %75 ovulasyon oranları ve %50 ila %70 genel gebelik oranları ile sonuçlanır [66, 67]. CC'ye yanıt olarak ovulasyon sağlanan anovulatuvar kadınlarda siklus doğurganlığı yaklaşık %15'tir. Gebeliklerin çoğu ilk 6 ovulasyon döngüsü içinde gerçekleşir. Açıklanamayan infertiliteye sahip çiftler için CC ile ampirik olarak birinci basamak tedavidir. Birbirinden bağımsız olarak uygulanan tedaviler olarak CC veya IUI, geçmiş kontrollere kıyasla her ay temel gebe kalma şansını (doğurganlık) iyileştirmez, ancak CC ile IUI kombinasyonu aylık doğurganlık oranını ikiye katlayabilir [68].

CC kullanımı ile çoğul gebelik insidansı yaklaşık %8'dir ve bunların çoğu ikizdir. Üçüz veya daha yüksek dereceli çoklu doğumlar nadirdir ancak yine de gerçekleşebilir [63]. En yaygın yan etki, CC alan kadınların yaklaşık %10'unda ortaya çıkan vazomotor semptomlardır. Daha az görülen yan etkiler arasında ruh hali değişiklikleri, göğüslerde hassasiyet, baş ağrıları ve mide bulantısı bulunur. Görme bozuklukları %2'den daha az görülür ancak bazen kalıcı olabilir ve bunlara

sahip hastalarda CC kullanımını durdurulmalıdır. CC alan kadınların gebe kaldığı çocuklarda doğumsal anomalilerde veya doğumsal kusurlarında artış yoktur. Bazı retrospektif çalışmalar ovaryum kanseri riskinin arttığını bildirmesine rağmen, genel olarak CC almış infertil kadınlarda ovaryum veya meme kanseri insidansında bir artış görülmemektedir [69, 70].

2- Letrozol:

Letrozol, androjenlerin östrojenlere dönüşümünü engelleyen bir aromataz inhibitörüdür. Letrozol, hormon reseptörü pozitif veya bilinmeyen meme kanseri olan postmenopozal kadınların tedavisinde endikedir. Letrozolün ovulasyon indüksiyonundaki etki mekanizmasının, hipotalamusun ve hipofizin östrojenin negatif geri beslemesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Daha düşük bir Estradiol seviyesi ile, hipotalamus ve hipofiz üzerinde negatif geri bildirim olur ve GnRH seviyeleri ve buna bağlı olarak FSH artar, bu da folliküler gelişimin daha fazla uyarılmasına yol açar. Letrozol, CC'ye yanıt vermeyen kadınlarda veya vazomotor semptomlar, görsel değişiklikler veya baş ağrıları gibi CC kullanımına bağlı yan etkileri olan kadınlarda ovulasyonu uyarmak için kullanılabilir. Bu yan etkiler, ovulasyon indüksiyonu için letrozol kullanan hastalarda nadirdir. Endometriyumun proliferasyonu östrojen tarafından uyarılır. CC kullanan bazı hastalarda CC'nin bir östrojen antagonisti olmasından dolayı endometriyum kalınlığının azalması (7 mm'den az) gözlenmiş ve implantasyonu azaltmışken. Letrozol, endometriyum üzerinde aynı antiöstrojen etkiye sahip değildir. Letrozol, zamanlı cinsel ilişki veya IUI kombinasyonu olarak kullanılabilir [69].

3- Gonadotropinler:

Ovulasyon indüksiyonu ve ovaryan folliküler gelişim tedavisi için kullanılan diğer bir ajan gonadotropinler (LH VE FSH) dir. Metformin ve CC tarafından ovulasyon indüksiyonuna dirençli anovulatuvar PKOS'ta, hipogonadotropik hipogonadizm veya hipofiz disfonksiyonu olan vakalardaki ovulasyon indüksiyonu ve açıklanamayan infertilite tedavisinde IUI ile birlikte süperovulasyon veya KOH için tercih edilir [71, 72]. Ovulasyon indüksiyonu için gonadotropinlerin kullanıldığı bu vakalarda, transvajinal ultrasonografi kullanılarak follikülogenezin yakından izlenmesi ve serum estradiol seviyelerinin değerlendirilmesi gerekir. Bu tür bir izleme, gonadotropin dozlarının, hCG enjeksiyonunun zamanı ile IUI'nin ve en önemlisi OHSS ve çoğul gebelik gibi komplikasyonların oluşumunu önlemektir. Tedavide hastanın yaşı, ovaryan rezervi ve infertilite tanısı, ilk gonadotropin dozu, maksimum follikül sayısının ve ovaryum stimülasyonunun hızının (veya siklus uzunluğunun) belirlenmesinde dikkate alınmalıdır. Hastalarda, spontan veya indüklenmiş menstruel siklusun başlamasından sonra siklusun 2. veya 3. gününde tedaviye başlanır. Gonadotropin enjeksiyonlarına başlamadan önce transvajinal ultrason ile endometriyal polipler, submukozal fibroidler veya konjenital kusurlar gibi uterus anormalliklerini tanımlamak gereklidir [73].

Gonadotropinlerin dozu, ovaryum yanıtını değerlendirmek için serum estradiol seviyesinin ilk ölçümünden itibaren 6. veya 7. güne kadar devam edilir. Folliküler yanıtı belirlemek için bu sırada transvajinal ultrason yapılır [74].

Folliküllerin 10 mm'ye ulaştıktan sonra günde 1-2 mm büyüyeceği tahmin edilebilir ve folliküler gelişim en çok 18 ila 19 mm'ye ulaştığında yeterli kabul edilir. Ölçülen en büyük follikül 18 ila 19 mm veya daha fazla maksimum çapa ulaştığında, 10.000 IU hCG (Profasi) intramüsküler olarak uygulanır. Alternatif olarak rekombinant hCG (Ovidrel) subkutan olarak 250 µg verilebilir [75]. HCG enjeksiyonundan 33 ila 39 saat sonra gerçekleştirilen IUI ile optimum gebelik oranları elde edilir [76].

2.6. Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)

Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS), yardımcı üreme teknikleri uygulamasının yatrogenik bir komplikasyonudur. Sendrom, overlerin kistik genişlemesi ve artmış damar geçirgenliği ve ovaryan neo-anjiyogenezi nedeniyle intravasküler ortamdan üçüncü boşluğa sıvı kaçması ile karakterizedir. OHSS oluşumu, hCG uygulanmasına bağlıdır ve hCG uygulaması olmadan oldukça nadirdir. Hastanın genel sağlık durumu üzerindeki etkisi hafif bir klinik tablodan ölümcül olgulara kadar değişiklik gösterir. HCG ve OHSS arasındaki ilişkiye, anjiyojenik molekül VEGF'nin üretimi yoluyla aracılık edildiği düşünülmektedir. Orta ile şiddetli OHSS, siklusların yaklaşık %1-5 görülür. Ancak, gerçek insidansı hesaplamak oldukça zordur [77-81].

2.6.1. OHSS için risk faktörleri

OHSS'nin gelişiminde iyi bilinen ve açıkça kanıtlanmış birçok risk faktörü vardır. KOH uygulanan herhangi bir kadın, oosit donörleri da dahil olmak üzere OHSS gelişme riski altındadır, ancak bazı faktörlerin varlığı riski daha çok artırabilir. OHSS için tedavi öncesi risk faktörleri arasında daha önce Polikistik over sendromu (PKOS) [77, 82, 83], OHSS öyküsü [84], yüksek anti-Müllerian hormon seviyesi, genç yaş [82, 85, 86], alerjik geçmiş, yüksek antral follikül sayısı ve düşük vücut kitle indeksi (VKİ) yer almaktadır [86].

KOH sırasında ve sonrasında yüksek serum estradiol konsantrasyonları, 30'dan fazla oositin alınması [87], taze embriyo transferini takiben hamilelik [82] ve ovaryumdaki folliküllerin sayı ve büyüklüğü OHSS riski artışı ile ilişkilidir. Bu risk faktörlerinin tanımlandığı çalışmalar tasarım, örnek büyüklüğü ve tanı ölçütlerinde önemli ölçüde farklılık gösterir ve birçoğu IVF için KOH protokollerinin şu anda kullanılanlardan önemli ölçüde farklı olduğu bir zamanda gerçekleştirilmiştir. OHSS insidansını azaltmaya yönelik spesifik önlemler arasında IVF sırasında GnRH agonistlerinin yerine GnRH antagonistlerinin kullanılması, nihai oosit olgunlaşmasını tetiklemek için GnRH agonistlerinin kullanılması, embriyo bankacılığı kullanımı ve KOH sonunda kabergolin kullanımı yer alır [78, 80, 88, 89].

Risk faktörlerinden, çok yüksek seviyede veya hızla yükselen estradiol seviyeleri OHSS'nin derecelendirilmesinde diğer faktörlere nazaran daha az

güvenilirdir. Örneğin büyük çapa sahip folliküllerin sayılması, aslında OHSS’de serum estradiol düzeylerinden daha iyi bir belirteçtir [80].

2.6.2. OHSS sınıflandırılması

OHSS iki şekilde tanımlanmıştır: OHSS'nin erken formu (hCG enjeksiyonunu tetikleyen ovulasyondan sonraki günler içinde), hCG tarafından ortaya çıkmasına rağmen, gonadotropin stimülasyonuna abartılı bir ovaryum tepkisi ile ilişkili iken, geç formda (hCG'den 10 gün sonra) [90] esas olarak plasental hCG salgılanması ile ilişkilidir. Erken formun oluştuğu ve bunu gebelik takip ettiği olgular ciddi ve uzun sürelidir [91].

Geleneksel olarak OHSS tanımında, ovaryum boyutlarında artma, asit, hemokonsantrasyon, hiperkoagulasyon ve elektrolit dengesizlikleri gibi birçok semptom içerir. Semptomlar genellikle OHSS nin şiddeti (hafif, orta ve şiddetli) ve başlangıç zamanına (erken veya geç) göre şekillenir. OHSS klinik ve laboratuvar bulgulara dayanarak tipik olarak hafif, orta ve şiddetli olabilir (Tablo 1) [91].

Şiddetli OHSS, plevral effüzyon, akut böbrek yetmezliği ve venöz tromboembolizm gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilir. OHSS, kontrollü ovaryan stimülasyonun en ciddi komplikasyonu olup, bu durumu önlemek için alınacak önlemleri belirlemek için patofizyolojisini, risk gruplarını tanımlamak gerekmektedir. Klasik fizyolojik OHSS değişiklikleri arteriyolar vazodilatasyon

ve kılcal damarlardaki geçirgenlik artışı ile sonuçlanan ve intravasküler alandan ekstrasvasküler boşluklara sıvı kaçıışı ile sonuçlanan bir durumdur [88, 89].

Sıvı kaçıışı hipovolemik ve hiponatremik bir durumla sonuçlanır. Bu durumun oluşmasında VEGF'nin ortaya çıkması ile vasküler endotelial stimülasyon, anjiogenezis, korpus luteum oluşumu ve follükülerin gelişmesi gibi etkileri olur [82-84].

Tablo 1. OHSS'nin klinik olarak sınıflandırılması [92] (Türkçeleştirilmiştir).

Araştırmacılar	Hafif	Orta	Ciddi	
Rabau ve ark. (1967)	Grade 1: 24 saatlik Östrojen >150µg ve pregnanediol>10 mg Grade 2: +genişlemiş overler ve kistler	Grade 3: grade 2+ karında şişkinlik ve Ultrason ile tespit edilmiş over kistleri Grade 4: grade 3+kusma ve muhtemelen ishal	Grade 5: grade 4+ asit ve hidrotoraks	Grade 6: Grade 5+ kan volümü, viskozitesi ve pıhtılaşma anama zamanı değişikliği
Schenker ve Weinstein (1978)	Grade 1: 24 saatlik Östrojen >150µg ve pregnanediol>10 mg Grade 2: +genişlemiş overler ve belki küçük kistler	Grade 3: grade 2+ karında şişkinlik Grade 4: grade 3 + bulantı, kusma ve/veya ishal	Grade 5: grade 4+ büyük over kistleri ve asit ve/veya hidrotoraks	Grade 6: Hemokonsantrasyon + artmış kan viskozitesi ve pıhtılaşma anormallikleri
Golan ve ark. (1989)	Grade 1: Karında gerginlik ve huzursuzluk Grade 2: grade 1+bulantı, kusmave/veya ishal, genişlemiş overler 5-12cm	Grade 3: grade 2+ ultrasonla tespit edilen asit	Grade 4: grade 3+ klinik olarak asit varlığı ve/veya hidrotoraks ve solunum sıkıntısı ve hidrotoraks	Grade 5: Grade 4+ Hemokonsantrasyon + artmış kan viskozitesi ve pıhtılaşma anormallikleri ve azalmış renal perfüzyon
Navot ve ark. (1992)			Ciddi OHSS: değişken büyüklükte overler, masif asit ve/veya hidrotoraks; Htc > 45%; WBC > 15.000; oligüri, kreatinin: >1,5; kreatinin klirensi >50 ml/min; karaciğer disfonksiyonu ve anazarka ödem	Kritik OHSS: değişken büyüklükte overler; şiddetli asit ve/veya Hidrotoraks; Htc > 55%; WBC > 25.000; oligüri, kreatinin:>1.6; kreatinin klirensi <50 ml/min; böbrek yetmezliği, tromboemboli ve ARDS
Rizk ve Aboulghar (1999)		Huzursuzluk, ağrı, bulantı, karın şişliği, ultrasonla tespit edilen asit ve genişlemiş overler, normal kan ve biyolojik parametreler	Grade A: Dispne, bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, klinik olarak asit varlığı, karın şişliği veya hidrotoraks, ultrasonla tespit edilen asit ve genişlemiş overler, normal biyokimyasal parametreler	Grade B: Grade A +şiddetli asit, oldukça büyümüş overler, ciddi dispne ve oligüri, artmış hematokrit, yükselmiş serum kreatinini ve karaciğer disfonksiyonu Grade C: Respiratuar distres sendromu, renal yetmezlik veya venöz tromboz

Ovaryan stimülasyon tekniklerinin, OHSS patofizyolojisinin ve OHSS oluşuktan sonra ki izlemlerin daha da iyi anlaşılması ile ovulasyon indüksiyonu ve sonuçta bu sendromun oluşma ihtimali azalacaktır. İndüksiyon ile gebe kalamayan hastalarda bu mekanizma kendi kendini sınırlayacak ve bir sonraki menstruel siklуста düzelecektir. Ancak gebeliğin devam ettiği hastalarda, artan

hCG seviyeleri ovaryumu uyarmaya devam edecek ve semptomlar ilk trimestirin sonuna kadar sürebilecektir. Hastalığın şiddeti ile kandaki hCG seviyeleri doğru orantılıdır ve bu hCG seviyelerine cevaben VEGF nin aşırı uyarılması ile OHSS'deki vasküler geçirgenlik artar. OHSS'nin patogenezinde ayrıca IL-6, IL-1 β , IGF-1, Transforming growth faktör ve Renin-anjiyotensin sistemi gibi sistematik ve lokal vasoaktif maddeler rol alır. [12, 82, 85-87, 93]

OHSS sadece LH reseptör stimülasyonuna maruz kalan kadınlarda görülür. Nadir istisnalar dışında, OHSS sadece LH'den daha uzun bir yarı ömre sahip olan ve dolayısıyla korpus luteum içindeki granüloza hücrelerinde geniş luteinizasyona neden olan hCG'ye maruz kaldıktan sonra ortaya çıkar [12]. Bu da VEGF gibi artmış vasküler geçirgenliğe ve hemokonsantrasyona neden olan en önemli vazoaktif maddelerin üretimine yol açar [94, 95] . İlginç bir şekilde, KOH'ye şiddetle cevap veren tüm kadınlarda OHSS gelişmez. IVF uygulanan OHSS gelişme riski yüksek kadınların prospektif bir çalışmasında, OHSS gelişen kadınlarda OHSS gelişmeyen kadınlardan daha az çözünür VEGF reseptörü 1 üretildiği tespit edilmiştir [96]. VEGF aktivitesinin çözünür düzenleyicilerinin üretimindeki farklılıklara ek olarak, OHSS'ye duyarlılık gonadotropinlere duyarlılıktaki farklılıklardan da kaynaklanabilir. OHSS ayrıca, hCG'nin bağlandığı FSH reseptöründe mutasyonları olan kadınlar gibi gonadotropinlerin yokluğunda da rapor edilmiştir [95]. Bu nedenle, OHSS için risk faktörlerini tanımlamak mümkün olsa da bir kadının bireysel OHSS riskinin, KOH'ye

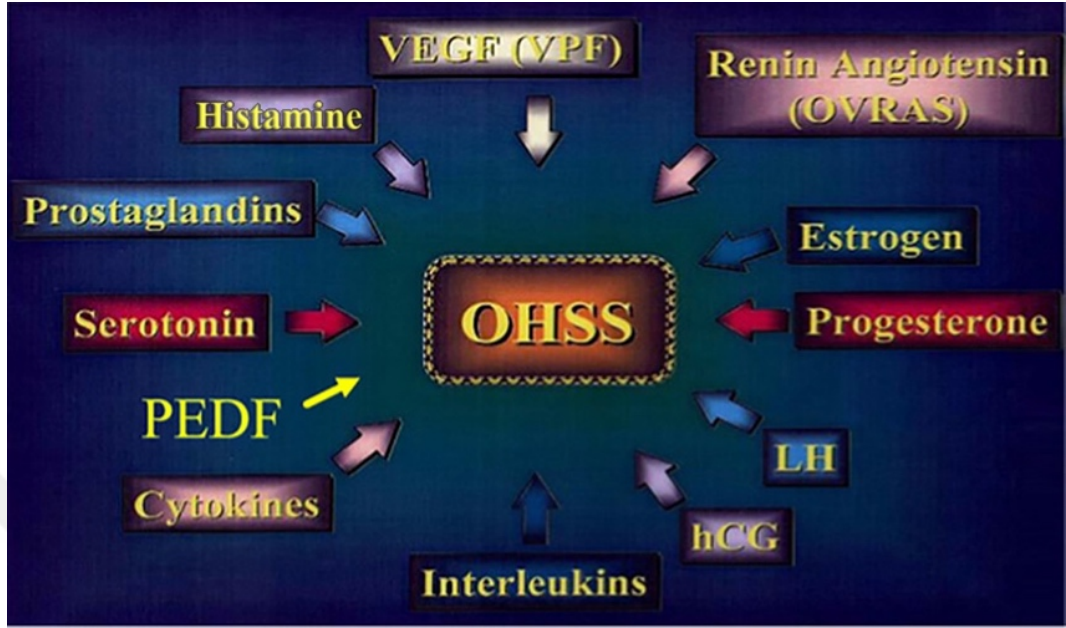
cevabının ne kadar güçlü olduğu dışındaki faktörler tarafından belirlenebileceği açıktır [95].

2.6.3. OHSS Patofizyolojisi

Patofizyolojik mekanizmalar kesin olarak aydınlatılmamış olsa da OHSS'nin klinik etkilerinden sorumlu olan temel mekanizma, kan damarlarının kapiller geçirgenliğindeki artış gibi görünmektedir [10, 97-99]. Bu artan vasküler geçirgenlik intravasküler ortamdan "üçüncü boşluğa" hızlı ve yoğun bir sıvı geçişine neden olarak, akut hemodinamik anormallikler ve geniş bir klinik çeşitlilik meydana getirmektedir [10, 99, 100].

OHSS'nin patofizyolojik sürecinde yer alan birkaç sistem ve aracı olduğu öne sürülmüştür [10, 98, 99, 101]:

- a. Ovaryum renin-anjiyotensin sistemi (OVRAS).
- b. Prostaglandinler.
- c. Histaminler.
- d. Sitokinler.
- e. VEGF / vasküler geçirgenlik faktörü (VPF).
- f. Pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF) (Şekil 8).



Şekil 8. OHSS patogeneğinde rol oynayan mediatörler [11].

2.6.3.1. Ovaryan Renin–Anjiotensin Sistemi (OVRAS) ve OHSS

Renin ve onun öncüsü olan yüksek molekül ağırlıklı prorenin, dolaşımdaki plazmada bulunur ve prorenin aktif renin'den 10 kat daha yüksek seviyelerdedir [102-105]. Böbrekteki afferent arteriyollerin duvarındaki jukstaklomerüler hücrelerden köken almakla birlikte, prorenin ayrıca ovaryum, plasenta ve diğer dokular tarafından da üretilir. Bir asit proteaz olan renin, anjiyotensinojenden anjiyotensin I (AI) oluşumunda rol oynar. AI adlı bu dekaeptit, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından anjiyotensin II'ye (AII) dönüşür. Siklus ortası LH artışına paralel olarak, prorenin'de önemli bir artış vardır. Luteal faz ortasında ise progesterona paralel ikinci bir artış olur ve ayrıca bu aşamada aktif reninde de bir artış meydana gelir [106-108].

Plazma prorenin, hMG / hCG ovulasyon indüksiyonunda ve KOH'da hCG uygulamasından sonra da artar ve bu tür hastalarda follüküler sıvı (FS) prorenin seviyeleri, hMG / hCG stimülasyonundan sonra plazma prorenin konsantrasyonlarından yaklaşık 10 kat daha yüksektir [108, 109]. Siklus ortası prorenin artışı, Transvajinal USG (TVUS) ile tespit edilen preovulatar follüküllerin sayısı ile ilgilidir [110] ve erken gebelikteki prorenin artışının derecesi, endojen hCG sekresyonundaki artışa paralel olarak korpus luteum sayısı ile ilişkilidir., Prematür ovaryan yetmezliği olan hastalara uygulanan oosit donasyonu ile elde edilen gebeliklerde prorenin artışının olmaması sistemik proreninin ovaryan kaynaklı olduğunu doğrulanmaktadır [108].

Plazma renin konsantrasyonları ile OHSS derecesi arasında doğrudan bir korelasyon olduğu ve AII salgılanması yoluyla OVRAS'ın OHSS patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [98]. KOH'dan sonra OHSS gelişen kadınlarda, tedavide kullanılan plazma volüm genişleticilerin infüzyonuna rağmen OHSS'nin devam etmesi, artmış plazma renin aktivitesi ve yüksek plazma aldosteron konsantrasyonlarının bir sonucudur [111].

AII öncelikle inhibitör ajan olmasına rağmen, vasküler geçirgenliği artırma ve anjiyogenezi indüklemeye yeteneği, spontan döngülerde ve OHSS'de postovulatar peritoneal sıvının birikmesinde önemli bir patofizyolojik rolü vardır [108]. AII, kapiller geçirgenliği artırmanın yanı sıra, kapiller damarlardaki venülleri daraltarak kapiller filtrasyon basıncını da artırır. AII'nin daha büyük arteriyollerdeki kasılma etkisi ile, endotel hücrelerinin ayrılmasına neden olarak

vasküler geçirgenlikte daha fazla artışa neden olabilir. Açıklanan bu mekanizmalar ile, kan hacminde belirgin bir azalma ile ekstravasküler sıvıda ve lenfatik sıvının akışında bir artış meydana gelmektedir [108].

Bir intraovaryan peptit olan AII [108, 112], anjiyogenezisi uyararak [109, 113], vasküler geçirgenliği arttırarak [114] ve prostaglandinlerin salınımını uyararak [115], OHSS'nin patofizyolojik mekanizmalarında rol oynayan önemli faktörlerden biridir [108].

Şiddetli OHSS'li hastaların periton sıvısında çoğunluğu prorenin olan çok yüksek bir renin konsantrasyonu ve yüksek AII immünoreaktivite seviyeleri gösterilmiştir. OHSS hastalarındaki asit sıvısında sürekli olarak yüksek AII seviyeleri bulunmasına rağmen, asit oluşumu için tek başına yeterli değildir. Bununla birlikte, AII, VEGF [116] veya sitokinler [117] gibi diğer faktörler sinerjistik olarak, asit oluşumunda ortak hareket ederler.

2.6.3.2. Sitokinler ve OHSS

Genel olarak ovaryum fonksiyonu ve daha spesifik olarak da ovulasyon süreci, çeşitli sitokinler tarafından düzenlenir. Sitokinler, aktive edilmiş immüno-düzenleyicilerdir ve mezenkimal hücreler tarafından sentezlenen polipeptitlerdir. İnterlökinler, çeşitli intraovaryan düzenleyici mekanizmaların olası modülatörleri olarak daha özel olarak incelenmiştir [15, 118]. Ovaryum stromasında makrofajlar

bulunmasına rağmen, immün sisteminin diğer bileşenlerini, menstrüel siklusun farklı aşamaları boyunca görmek mümkündür [15, 118, 119].

Geç folliküler fazda, mast hücreleri, ovaryum stromasına büyük ölçüde sızarak, siklus ortasındaki gonadotropin artışına yanıt olarak degranülasyona uğrar [120]. Bu degranülasyonu, polimorfonükleer (PMN) hücrelerin, "T" lenfositlerin ve makrofajların göçü izler. IVF için oosit toplama sırasında aspire edilen folliküler sıvı hücre popülasyonunun %5-15'inde doku makrofajları ve monositleri tanımlanmıştır [121]. Bu belirgin akut enflamatuvar reaksiyon, muhtemelen, ovulasyon sırasında meydana gelen artan folliküler neovaskülarizasyona sekonder olarak folliküler kemotaktik faktörlerin salgılanması ve / veya salınması ile ilişkilidir. Ayrıca oositin kendisi de sitokinler üretebilir [122].

İnterlökin-1 (IL-1), daha önce lenfosit aktive edici bir faktör olarak da bilinen aktif makrofajdan türetilmiş bir sitokindir. Klasik üretim bölgesi olan epitel doku, vasküler doku, lenfoid doku, epidermal doku ve granüloza hücreleri gibi çeşitli dokular, makrofajların yanı sıra IL-1 üretir. IL-1, yapısal olarak ilişkili IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki formda bulunur, IL-1 β biyolojik olarak daha güçlüdür. Her iki IL-1 de domuz ve fare granüloza hücrelerinin in vitro luteinizasyonunu azaltır ancak çoğalmalarını uyarır [15, 123, 124]. Ayrıca IL-1 β , in vitro tekal progesteron üretimini uyarmak için hCG ile sinerjik olarak hareket eder ve sığır luteal hücreleri tarafından prostaglandin üretiminin güçlü bir uyarıcısıdır [15].

İnflamasyon sırasında, IL-1 reseptörlere bağlanmak için yarışır ve PMN hücre birikimini destekler. Deneysel olarak uygulandığında, IL-1, belirgin vasküler sızıntı dahil olmak üzere birçok lokal ve sistemik etkiye neden olur [125]. IL-1'in ovaryumdaki reseptör antagonistinin gösterilmesine ek olarak, IL-1 β ekspresyonu gonadotropinler tarafından yukarı doğru düzenlenir, bu da ovulasyonda fizyolojik bir rol ve hMG- / hCG ile ilişkili olası bir patofizyolojik aracı mekanizma olduğunu düşündürür [117].

Başka bir sitokin olan **IL-6**, başlangıçta hepatosit ve hibrit büyüme faktörü ile saflaştırılmış bir interferon türü olarak tanımlandı [15]. IL-6'nın mRNA'sı, kendi kendini sınırlayan iki anjiyogenetik süreçte in vivo üretilir. Bunlar follikülogenez ile ilişkili neovaskülarizasyon ve embriyo implantasyonundan sonra desiduada kapiller ağın oluşumudur [126]. OHSS'nin gelişiminde IL-2, IL-6 ve tümör nekroz faktörü- α 'nın (TNF- α) olası prediktif rolü belirlendi [127]. Daha sonra OHSS gelişen IVF hastalarının FS'inde yüksek veya düşük yanıt veren OHSS olmayan kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek IL-6 seviyeleri bulunmuştur. Bu nedenle, oosit toplama gününde IL-6'nın FS'daki konsantrasyonunun IVF / YÜT hastalarında OHSS gelişimini öngörebileceği görülmektedir. Bu nedenle, taze embriyo transferi (ET) olmayan ve embriyo kriyoprezervasyonu yapılan tüm IVF döngülerinde, FS'daki yüksek IL-6 seviyelerinin OHSS oluşması ihtimalini artırdığı düşünülmektedir. Alternatif olarak, transfer edilen embriyoların sayısının diğer tüm IVF döngülerinde bir ile

sınırlandırılması, çoklu gebelikleri en aza indirmenin yanı sıra OHSS riskini de en aza indirebilir [15].

HCG'nin periferik kan mononükleer hücrelerinin IL-2 üretimi üzerindeki normal olumsuz etkisinin OHSS'den muzdarip hastalarda kaybolduğunu ve bunun sonucunda IL-2 ekspresyonunun ve sitokin sinyalleşmesinin (SOCS) baskılanmasının bozulduğunu öne sürmüşlerdir [14],

Şiddetli OHSS'li kadınlarda sitokinlerin ve nitritlerin peritoneal sıvı konsantrasyonları ölçülmüştür. OHSS hastaları, kontrollere kıyasla peritoneal sıvı seviyelerinde önemli ölçüde artmış IL-6 (3523'e karşı 30 pg / mL), TNF- α (14'e karşı 4.2 pg / mL) ve IL-8'e (1695'e karşı 900 pg / mL) sahipti. Serumda, yalnızca IL-6 seviyeleri önemli ölçüde yüksekti (375'e karşı 11 pg / mL) [117]. Aksine, OHSS hastalarının asit sıvısında nitrit seviyeleri önemli ölçüde daha düşüktü (0.5'e karşı 34 nmol / mL). OHSS hastalarında IL-1 seviyeleri daha yüksekti ve IL-1 reseptör antagonist seviyeleri daha düşüktü, bu da IL-1'in potansiyel olarak artmış biyolojik potansiyelini düşündürmektedir [117]. TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin her birinin, birleşik etkilerinin ilave veya hatta sinerjik olabileceğini tahmin ederek vasküler geçirgenlikte değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir [15, 128-130].

TNF- α , esas olarak uyarılmış makrofajlar tarafından üretilen bir 17-kDa polipeptitidir [117]. İnflamatuar, immün ve konakçı savunma mekanizmalarının endojen bir aracısı olarak hareket eden son derece güçlü bir sitokindir. TNF- α ,

diğer tüm sitokinlerden daha fazla, çeşitli akut hastalıkları karakterize eden patofizyolojik süreçlerle ilişkilendirilmiştir ve vasküler geçirgenliğin oluşmasında önemli bir araçtır [131].

TNF- α 'nın lokalize, kısıtlı etkileri faydalı olabilirken, TNF- α 'nın sistemik ve genel salınımı, kapiler sızıntı sendromunda olduğu gibi yıkıcı ve hızla öldürücü olabilir [131]. Ovaryumda TNF- α , hücre büyümesini uyarır, follikülogeneze katılır ve hatta epitelyal ovaryum kanseri oluşumunda rol alır [132]. TNF- α ovaryumda, oosit, granüloza hücreleri ve ovaryum mononükleer hücreleri tarafından sentez edilmekte ve granüloza hücrelerinde de yüksek afiniteli reseptörleri vardır [131]. TNF- α ve IL-1'in ovaryumda bulunması, sentezi ve alım mekanizmaları dahil, aynı zamanda fizyolojik ve / veya patofizyolojik stimülasyon mekanizmaları da aydınlatılamamıştır [131].

Interleukin 8, lipopolisakkarit ile uyarılan insan kanı mononükleer lökositler tarafından üretilen bir nötrofil kemotaktik faktördür [17, 117]. In vitro olarak IL-8, kemotaksiyi uyarır, lizozomal enzim salınımını artırır, Mac-1'i yukarı doğru düzenler ve reseptör ekspresyonunu tamamlar. In vivo olarak IL-8, PMN kemotaksisini indükler ve vasküler geçirgenliği artırır [17, 133]. Ovulasyon çevresinde ve sonrasında lökositlerin dağılımında büyük ve önemli değişiklikler meydana geldiğinden ve aşırı geçirgenlikten sorumlu bazı elementlerin IL-8 tarafından indüklenebilmesi nedeniyle, bu sitokinin ovaryum fizyolojisinde ve OHSS mekanizmasında potansiyel bir rolü olduğu ileri sürülmüştür [17, 117].

2.6.3.3. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ve OHSS

IVF için KOH uygulanan kadınlarda oluşan FS ve periton sıvısına neden olan artan kapiller geçirgenlik, kısmen VEGF'den kaynaklanmaktadır ve OHSS oluşumunda ovaryumun kaynak olduğu düşünülmektedir [134-136]. Bir sitokin olan VEGF, güçlü anjiyojenik, endotelial hücelere özgü mitojenik ve vasküler geçirgenliği artırıcı aktivitelere sahip bir heparin bağlayıcı glikoproteindir [135-137]. VEGF, yara iyileşmesi, embriyogenez, büyüme ve neoplazmaların metastazı ile ilişkili bir süreç olan enflamasyonda ve ayrıca normal ve patolojik anjiyogenezde önemli roller oynar [22, 136]. VEGF, proliferasyonu ve anjiyogenezi indüklemek için doğrudan endotel hüceleri üzerinde etki eder, in vitro olarak insan luteinize granüloza hücelerinde bulunur. Yüksek VEGF konsantrasyonları vasküler geçirgenliği artırır ve plazmanın ekstrasvazasyonuna yol açar, bunu da hemokonsantrasyon izler [135, 136]. Şiddetli OHSS'li hastalardan alınan asit sıvısında yüksek konsantrasyonlarda VEGF bulunmuştur [22, 136]. VEGF'nin OHSS'de asit oluşumunda önemli bir kapiller geçirgenlik faktörü olabileceğinin gösterilmesine ek olarak, OHSS'deki kapiller geçirgenlik aktivitesinin %70'i rekombinant insan VEGF antiserumu ile nötralize edilmiştir [22, 136].

Hastaneye yatırılan şiddetli OHSS'li yedi hastanın plazmasında ve asit sıvısında yüksek seviyelerde VEGF tespit edilmiş ve klinik olarak iyileşme sürecinde ise plazma değerlerinde önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. VEGF seviyeleri ile yüksek hematokrit ve beyaz kan hüceleri sayımı gibi kapiller sızıntı

ve hemokonsantrasyonun belirli biyolojik özellikleri arasında önemli korelasyon olmasıda OHSS'de artan ovaryum vasküler geçirgenliğinin patofizyolojik mekanizmasında önerilen VEGF teorisi ile uyumludur. VEGF'nin peritoneal sıvı seviyelerinin plazmadaki seviyesinden daha yüksek olması, ovaryumlardan ve/veya mezotelyal yüzeylerden lokal bir sekresyonu veya bu faktörün ovaryum ve / veya mezotelyal damarlar yoluyla aktif bir şekilde taşınmasını düşündürmektedir [22].

2.6.3.4. Pigment epiteli kaynaklı faktör ve OHSS

Son birkaç yılda, OHSS patofizyolojisinde rol alan yeni bir faktör olarak ortaya çıkmıştır [101, 138, 139]. PEDF, nörotrofik ve immün modüle edici özelliklere sahip doğal bir anjiyogenez inhibitörü olan, serin proteaz inhibitörlerinin inhibitör olmayan üyelerine ait 50 kDa glikoproteindir [140]. PEDF, güçlü proanjiyojenik faktörlerin uyarıcı aktivitesini inhibe eder ve endotel hücre aktivitesi üzerindeki VEGF etkisini inhibe edebilir. PEDF'nin insan ovaryumunda varolduğunu, granüloza hücreleri tarafından hormona bağımlı bir şekilde üretildiğini ve salgılandığı bulunmuştur. PEDF, in vitro insan umbilikal ven endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve tüp oluşumunu inhibe etme kabiliyeti ile gösterildiği gibi anti-anjiyojenik bir etkiye sahiptir. HCG, hem in vivo hem de in vitro olarak PEDF ekspresyonunu azaltabilir ve PEDF ekspresyonu, VEGF ekspresyonunun tam tersidir [141]. Bu nedenle, PEDF ve VEGF arasındaki dengenin fizyolojik ovaryum fonksiyonunu düzenlediği ve bu iki antagonistik düzenleyici arasındaki "ince ayarın" en azından kısmen hCG veya

LH tarafından modüle edilebileceği görülmektedir [138]. Ruth Shalgi grubu, çeşitli deneylerde PEDF'nin OHSS semptomlarını azaltmasını hem anjiyojenik hem de inflamatuvar yollarla ilişkilendiren kanıtlar sağlamıştır [101, 138]. Bu araştırmacılar (Miller et al., 2016), bir OHSS modeli olarak lizofosfatidik asit (LPA) ile uyarılan insan primer granüloza hücrelerinde (P <0.01) IL-6 ve IL-8 ekspresyonunun arttığını göstermiştir [101]. Rekombinant PEDF'nin birlikte uygulanması, LPA kaynaklı IL-6 ve IL-8 mRNA ve proteinin ekspresyonunu sırasıyla dört ila beş kat azalttığı gösterilmiştir [101]. Benzer şekilde, IL-8 ile uyarılan insan granüloza hücreleri, VEGF mRNA'nın ekspresyonunu artırdı ve hCG ile kostimülasyon, VEGF mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde daha yüksek bir artışa neden oldu (P <0.001), bu artış PEDF uygulamasıyla önemli ölçüde azaltıldı (Miller ve ark.,2016). In vivo, OHSS ile oluşturulan farelere PEDF enjeksiyonu, IL-6'nın ovaryum ekspresyonunu azalttı (P <0.01) ve OHSS'nin şiddetini iyileştirdi [101]. Bu nedenle PEDF, OHSS patofizyolojisinde ikili bir rol oynuyor gibi görünmektedir ve OHSS'yi oluşturan hem enflamatuvar hem de anjiyojenik mekanizmaları antagonize edebileceği düşünülmektedir [101, 138, 139].

2.6.4. OHSS'nin önlenmesi

Hiçbir yöntem OHSS'yi tamamen engellemez, ancak yüksek riskli hastaların tanınması bu riski azaltmanın ilk adımıdır [142]. PKOS, yüksek AMH (> 3.4 ng / mL), yüksek E2 (> 3.500 pg / mL), multifoliküler gelişim (≥ 25

follikül) veya alınan yüksek sayıda oosit (≥ 24 oosit), artmış risk ile ilişkilidir [142].

2.6.4.1. KOH ve GnRH antagonistleri

OHSS için yüksek riskli hastalarda uygulanan stimülasyon protokolleri, KOH için mevcut başlangıç dozlarının daha düşük dozlarda başlanması ve GnRH antagonistlerinin kullanımını ile gonadotropin stimülasyonunun toplam dozunu ve süresini azaltmak ve LH artışının önlenmesine yardımcı olur [143].

GnRH antagonistleri, oosit alımını takiben uygulandığında, gebelik ve canlı doğum oranları üzerinde herhangi bir yan etki olmaksızın şiddetli erken OHSS'nin gerilemesini hızlandırdığı görülmektedir [144].

2.6.4.2. Ovulasyon tetiklenmesi

OHSS insidansını azaltmak için hCG dozunun azaltılması tartışmalıdır [142]. GnRH agonistleri, bir endojen LH artışını indüklemek için hCG yerine kullanılabilir. Endojen LH'nin çok kısa yarılanma ömrü, OHSS'nin sıklığını ve / veya şiddetini azaltabilir. GnRH agonist tetikleyicileri daha düşük gebelik oranları ile ilişkili olduğundan, yeni bir embriyo transferi planlanmayan hastalar için tercih edilebilir bir seçenek olabilir [142].

Yeni bir döngü ile devam etmek isteyenler için, bir GnRH agonisti tetikleyicisi ile birlikte uygulanan düşük doz hCG, bir GnRH agonistinin tek başına kullanıldığında gözlenen daha düşük gebelik oranlarını artırabilir [142].

2.6.4.3. Coasting yaklaşımı

E2 seviyeleri > 4,500 pg / mL olduğunda ve / veya 15 ila 30 olgun follikül mevcut olduğunda coasting düşünülebilir. Coasting esnasında gonadotropin stimülasyonu durdurulur ve E2 seviyeleri günlük olarak kontrol edilir [145]. E2'nin ilk yükselişi tipik olarak coastingın ilk 48 saatinde gözlenir, ancak seviyeler daha sonra düzleşmeli veya azalmalıdır [146]. Serum E2 seviyeleri < 3,500 pg / mL'ye düştüğünde hasta tetiklenebilir. GnRH agonistleri ilk LH dalgalanmasının bastırılması için kullanılıyorsa, coasting boyunca bir antagoniste geçiş, daha iyi sonuçlarla ilişkilendirilmiştir [145].

2.6.4.4. Siklus iptali

Döngü iptali, olgun follikül > 30 varsa, coast süresi > 4 gün ise veya coasting sırasında E2 seviyeleri > 6.500 pg / mL'ye yükselirse önerilebilir.

2.6.4.5. Yardımcı ilaçlar

Metforminin yardımcı kullanımı PKOS hastalarında azalmış OHSS oranları ile ilişkilidir [147]. Aspirin ve kalsiyum kullanımı, ayrı yardımcı

maddeler olarak OHSS riskini azaltıyor gibi görünmektedir [142]. Kanıtlar, hCG tetiklemesini takiben letrozol kullanımının orta ila şiddetli erken başlangıçlı OHSS'yi önlemede etkili olduğunu göstermektedir [148]. VEGF üretimini inhibe eden bir dopamin agonisti olan kabergolin, hCG uygulama gününden itibaren 8 gün boyunca günde 0,5 mg verildiğinde OHSS oranlarını düşürmüştür [142, 149]. Kalp kapak hastalığı olanlarda uzun süreli kabergolin kullanımından kaçınılmalıdır [145, 146]. OHSS oranlarının düşmesinde albümin uygulamasının yararı net değildir [142].

2.6.4.6. Embriyo kriyoprezervasyon (Cryopreservation)

Transfer olmadan tüm embriyoların kriyoprezervasyonu geç başlangıçlı OHSS'yi oranlarını düşürüyor gibi görünse de, erken başlangıçlı OHSS meydana gelebilir [146]. İyileştirilmiş dondurma teknikleriyle, donma / çözülme transferlerini takip eden canlı doğum oranları taze transfer ile benzerdir [150].

2.6.4.7. In vitro oosit olgunlaşması

In vitro oosit olgunlaşması (IVM), ovaryumların gonadotropinlerle uyarılması ihtiyacını tamamen ortadan kaldırır. IVM döngüleri sırasında, olgunlaşmamış folliküller hCG uygulamasının ardından aspire edilir ve alınan oositler olgunlaşana kadar in vitro büyütülür. Olgun oositler tohumlama veya ICSI ile döllenir.. IVM deneysel bir prosedür olarak kabul edilir ve sadece özelleşmiş merkezlerde yapılmalıdır [151]. Geleneksel YÜT'e alternatif olarak

önerilmeden önce bu tekniğin daha fazla değerlendirilmesi için hala randomize çalışmalara ihtiyaç vardır [152].

2.7. Melatonin

Melatonin oldukça etkili bir antioksidandır ve hücreleri, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı gibi reaktif türlerin neden olduğu oksidatif strese karşı korur (Şekil 9) [153]. Melatonin, tüm omurgalıların epifiz bezinde ve diğer birçok organda serotonin yoluyla triptofandan sentezlenen bir indolamindir [154]. Başlangıçta melatonin, yalnızca ışığa duyarlı memelilerin üreme davranışı ile ilişkiliydi [155, 156]; ancak, antioksidan ve antiapoptotik özelliği artık geniş çapta rapor edilmiştir.

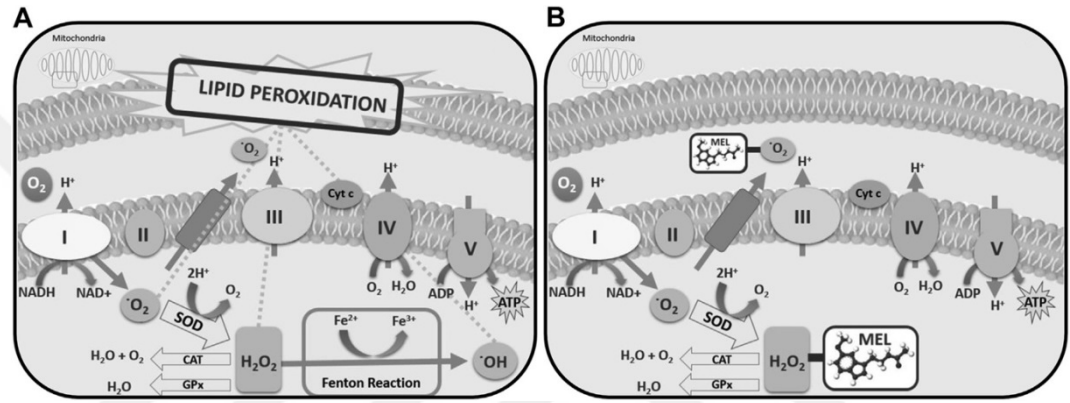
Melatoninin güçlü antioksidan etkileri, toksik oksijen türevlerini temizleme ve reaktif türlerin oluşumunu azaltma kabiliyetinden kaynaklanmaktadır [154, 157, 158]. Melatonin, amfifilik doğası nedeniyle oksidatif hasara karşı korumada tipik olarak daha etkilidir ve her organa ve tüm hücrelere girmesine izin verir, böylece hem lipid hem de sulu hücre ortamında oksidatif hasarı azaltır [159, 160]. Melatoninin süpürme işlevlerine, dolaylı antioksidan özellikleri, antioksidan enzim aktivitelerinin bir uyarıcısı olarak etki eder [157, 161].

Melatoninin dolaylı antioksidan rolü, zararı kısmen indirgenmiş oksijen türevlerini zararsız moleküllere metabolize etmeyi veya diğer endojen olarak üretilen antioksidanların sentezini indüklemeyi içerir [27].

2.7.1. Oksidatif hasar ve melatoninin overler üzerindeki koruyucu etkisi

Özellikle ovulatuvar süreç sırasında follikül içinde üretilen OH, O ve H₂O₂ gibi reaktif oksijen türlerinin oosit için zararlı olduğu bilinmektedir [162]. Çeşitli organellerin ve hücre iskeletinin canlılığını ve bütünlüğünü korumak için çok önemli olan proteinlerdeki ve diğer kısımlardaki modifikasyonlar ile ilişkilidir ve bu nedenle hücresel aktiviteyi, organizasyonu ve organel dağılımını etkileyebilirler [163]. Artmış süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) aktivitesi gibi oksidatif strese karşı koruyucu mekanizmalar, folliküldeki ROS ve antioksidanlar arasındaki dengeyi kontrol eder ve oosit ve granüloza hücrelerinin işlevi için kritik öneme sahiptir [162]. Birkaç çalışmada, insan granüloza hücrelerini ve oositi oksidatif stresten korumada melatoninin etkinliğini araştırmıştır [159, 164]. Hem epifiz bezinden hem de ekstrapineal bölgelerden türetilen fizyolojik melatonin seviyeleri, nükleer ve mitokondriyal DNA'yı serbest radikallerin hasarından korur (Şekil 10) [165]. Ekzojen olarak verildiğinde melatonin, fare hücrelerini doza bağlı bir şekilde DNA hasarına karşı koruduğu gözlenmiştir [166]. Melatoninin, sıçanlarda iyonlaştırıcı radyasyon veya toksik ilaç maruziyetinden kaynaklanan genomik hasarı azalttığı bilinmektedir [167]. Melatonin insan kan hücrelerinde elektron transferi yoluyla DNA'yı yüksek bir verimlilikle onarabilir [168]. Oksidatif stres koşulları altında, melatoninde hızlı

bir düşüş, metabolitlerinin seviyelerinde artışla birlikte meydana gelir, örneğin, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) ve N1-asetil-5-metoksikinuramin (AMK) [51, 52]. AMK'nin fizyolojik seviyelerinin de oksidatif protein yıkımına karşı oldukça koruyucu olduğu bilinmektedir [169].



Şekil 9. Melatoninin yokluğunda lipid peroksidasyonuna yol açan olaylar (A) ve melatoninin ovaryum dokusunda lipid peroksidasyonuna (B) karşı koruyucu etkileri. Melatonin, reaktif türlerin neden olduğu mitokondriyal membranda lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Kanıtlar, yerel olarak üretilen melatonin ve metabolitlerinin hücre ortamında hem reaktif oksijen türlerini hem de reaktif nitrojen türlerini temizlediğini göstermektedir. O₂, süperoksit iyonu; SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; GPx, glutatyon peroksidaz; H₂O₂, hidrojen peroksit; Cyt c, sitokrom c; OH•, hidroksil radikali. [170]

2.7.2. Melatonin ovaryan folliküller üzerine etkisi

Oosit ve somatik hücreler tarafından folliküler mikro ortamda reaktif oksijen türleri üretimi, follikülojeniz sırasında moleküler ve biyokimyasal yolları düzenler [27, 171]. Reaktif oksijen türleri, antral folliküllerdeki granüloza hücreleri de dahil olmak üzere steroid üreten hücreler tarafından oluşturulur çünkü bu hücreler yüksek enerji seviyeleri gerektirir [172]. Azalan antioksidan enzim seviyelerinin (örn., SOD, glutatyon ve katalaz) eşlik ettiği büyük miktarlarda ROS, atretik folliküllerde oksidatif stres aracılı apoptozise katkıda

bulunabilir [173]. Apoptoz, FSH, LH ve parakrin faktörler gibi endokrin faktörlerle düzenlenen fizyolojik bir süreçtir [174]; Kontrollü olarak hücrelerin kendi kendini yok etmeye [175] yol açan ölümcül uyarı (fizyolojik veya patolojik) başlatırlar ve internükleozomal DNA fragmentasyonu, hücre küçülmesi, plazma membran kalınlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterize edilir [176].

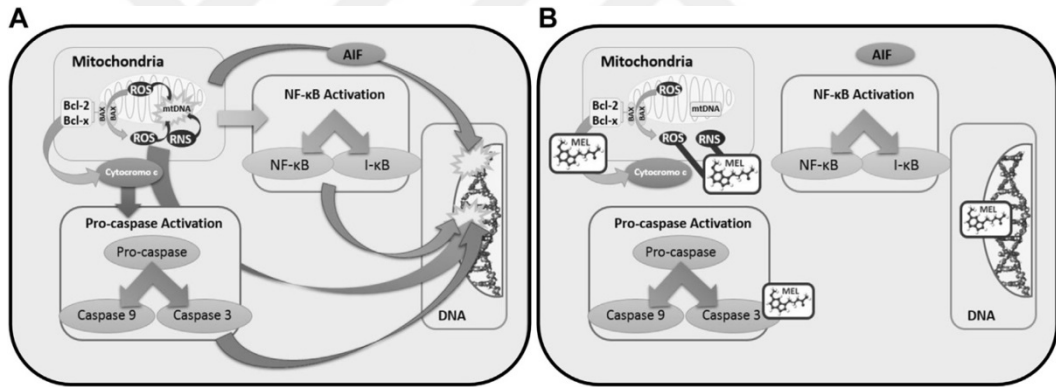
Sitokrom c ve diğer pro-apoptotik proteinlerin salınmasının bir sonucu olarak apoptozu düzenlemede mitokondriyanın rolü kanıtlanmıştır [177]. B hücreli lenfoma-2 ailesinin (Bcl-2) üyeleri, sitokrom c bölünmesinin ve salımının düzenlenmesi ile antral folliküllerin atrezisi için önemlidir. Büyüyen folliküllerin granüloza hücrelerinde hedeflenen aşırı Bcl-2 ekspresyonu, transgenik farelerin ovaryumlarında apoptozu azaltır [178]. Sitozole salındığında, sitokrom c apoptotik kaskadı tetikleyen prokaspazları, örneğin kaspaz 3 ve kaspaz 9'u aktive eder [27]. Benzer şekilde, serbest radikaller, DNA hasarı nedeniyle başlatılan atretik folliküllerde apoptotik kaskadın aktivasyonunu tetikler [179].

İnsan ovaryum folliküler sıvısındaki (FS) melatonin konsantrasyonları, eşzamanlı olarak toplanan plazma örneklerindeki önemli ölçüde daha yüksektir [162, 180, 181]. FS'deki yüksek melatonin konsantrasyonları muhtemelen hem kandan folliküllere aktif melatonin taşınması hem de ovaryum sentezi ile korunur [164]. Granüloza hücrelerinde ve oositlerde melatoninin bir öncüsü olan serotoninin varlığı, yerel melatonin sentezi ile uyumludur [182]. FS'de melatonin, serbest radikalleri ortadan kaldırarak, antioksidan enzimleri

uyararak ve granüloza hücreleri tarafından seks steroid hormonu üretimini teşvik ederek etki eder [159].

Melatonin, follikül gelişiminin farklı aşamalarında çeşitli işlevlere sahip gibi görünmektedir [182]. Preantral follikül gelişimi üzerine melatoninin rolü hakkındaki bilgiler sınırlı olmakla birlikte, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, FSH ile birlikte melatoninin keçi preantral folliküllerinin folliküler büyümesini desteklediği bildirilmiştir [183]. Birkaç çalışmada melatoninin antral folliküllerdeki etkilerini, örneğin seks steroid üretiminin düzenlenmesi, LH mRNA ekspresyonu, Bcl2 ve Casp3 üretimi ve ILGF-beta aktivitesini tanımlanmıştır [27, 162, 184]. Büyüyen insan follikülündeki FS melatonin konsantrasyonundaki artışın atreziden kaçınmada önemli bir faktör olduğuna inanılmaktadır [27], çünkü bu sıvıda bulunan melatonin kritik hücrelerin apopitozunu azaltır, preovulatar folliküllerin tam olarak gelişmesine izin verir ve ovulasyon için olgun oositler sağlar [185]. Bununla birlikte, folliküler gelişimin, melatoninin etkisinin ötesinde birçok hormon ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere çok sayıda faktör tarafından düzenlendiği iyi bilinmektedir. Melatonin, sıçan dokularında [186]hem CuZnSOD hem de MnSOD için mRNA seviyelerini, insan endotel hücrelerinde GSH sentezini [161] artırır ve Bcl-2 ekspresyonunu indükleyerek ve kaspaz 3 aktivitesini azaltarak apopitozun intrinsik mitokondriyal yolağının indüksiyonunu önler; bu eylemler hücreleri oksidatif strese karşı korur ve faregillerde hücre çoğalmasını düzenler [187]. Eksojen melatonin uygulaması, intrafolliküler oksidatif hasarı ve esansiyel moleküllerin oksidatif mutilasyonunu

önemli ölçüde azaltır, bu da insanda fertilizasyon ve gebelik oranlarını artırır [159, 162]. Melatonin, folliküler seçimi etkileyebilecek insan granüloza hücrelerinde LH reseptörlerinin mRNA ekspresyonunu artırarak LH'ye folliküler yanıtı modüle eder [188]. Dahası, melatonin ile indüklenen progesteron üretimi, progesteron sentezi için spesifik bir gen olan CYP11A inhibisyonu yoluyla gerçekleşir ve progesteron sentezi için spesifik bir gen olup, negatif geri besleme yoluyla sekresyonunu artırır [70], folliküler dominans aşamasında folliküler olgunlaşma ve ovulasyon süreci [189] için gereklidir.



Şekil 10. Overlerde ROS ve RNS tarafından indüklenen DNA hasarına yol açan apoptoz kaskadının çizimi (A). Melatonin, Bcl-2 ekspresyonunu indükleyerek, sitokrom c salımlını modüle ederek ve kaspaz 3 aktivitesini azaltarak (B) intrinsik mitokondriyal apoptoz yolağının indüksiyonunu önler. Melatonin ayrıca elektron transferi yoluyla DNA'yı onarabilir. ROS, reaktif oksijen türleri; RNS, reaktif nitrojen türleri; AIF, apoptoz indükleyici faktör; NF-kB, nükleer faktör kB; I-kB, inhibitörler kinaz beta. [170]

2.7.3. Melatoninin korpus luteum üzerine etkisi

Reaktif türler, hem luteogenez hem de luteolizde rol oynadıkları için tüm luteal fazlarda önemli bir rol oynarlar. Korpus luteumda, steroidojenik ve inflamatuvar hücreler, örneğin makrofajlar ve nötrofiller potansiyel ROS kaynaklarıdır çünkü bu bileşikler normal metabolizmanın yan ürünleridir [27].

Steroidojenik enzimlerin aracılık ettiği reaktif oksijen türleri ve hücre içi kolesterolün mitokondriye taşınmasında rol oynayan taşıyıcı proteinler, korpus luteumda progesteron sentezini modüle eder [190]. Ayrıca NO, sığır luteal endotel hücrelerinde PGF2a sentezini güçlendirir, SOD ekspresyonunu modüle eder ve katalaz aktivitesini azaltır [191]. Serum progesteron konsantrasyonu, SOD aktiviteleri ve ROS konsantrasyonları arasında önemli bir ilişki bildirilmiştir [192]. Bakır-çinko SOD, sığır luteal hücrelerinin sitozolünde üretilen O₂'yi temizleyerek luteal fonksiyonun korunmasına katkıda bulunur [193]. Sıçan luteal hücrelerinde, hücre içi SOD aktivitesindeki bir azalmaya genellikle korpus luteum tarafından progesteron üretimindeki bir azalma eşlik eder [190]. Ovulatuvar süreç, lokal inflamatuvar yanıtı benzerdir ve yüksek seviyelerde reaktif türlerle sonuçlanır [194], bunların arasında ROS, ovulasyon sırasında luteinizasyona uğrayan granüloza hücrelerine potansiyel olarak zarar verebilir [195]. Follikülogenezde olduğu gibi, melatonin farklı luteal aşamalarda çeşitli işlevlere sahiptir. Büyük folliküllerdeki yüksek melatonin konsantrasyonu, progesteron üretimi ile sonuçlanan uygun luteinizasyon ile ilişkilendirilmiştir. Melatonin, steroidogenez yolağında önemli bir ikinci haberci olan cAMP'yi inhibe ederek steroidogenez baskılar [27]. İnsanda, preovulatuvar folliküldeki melatonin seviyelerinin artması, luteinize granüloza hücrelerini oksidatif stresten korur, böylece oksidatif stres luteal fonksiyonu inhibe ettiğinden, sonraki korpus luteumun erken luteolizini önler [195]. Ayrıca melatonin, PGF2a'nın sentezleyici enzimi olan ve progesteron üretimi ve luteal işlevi sürdürmek için gerekli olan siklooksijenaz-2 gen ekspresyonunu inhibe eder [27]. Yüksek ROS seviyeleri,

luteal hücrelerin plazma membranını bozan, korpus luteum regresyonuna neden olan lipid peroksidasyonunu tetikler [196, 197]. Azalmış antioksidan enzim seviyelerinin eşlik ettiği ROS artışı, luteoliz için ön koşul olan oksidatif stres aracılı apoptoza katkıda bulunur [198].

Melatonin ve türevlerinin doğrudan etkisinin yanı sıra, bu indol ayrıca dolaylı olarak korpus luteumu da korur [27, 199], ancak korpus luteumdaki melatonin etkileri açıkça tanımlanmamıştır. Dolaylı olarak melatonin tarafından uyarılan Bcl-2, GSH, katalaz ve diğer faktörlerin ROS birikimini azalttığı ve böylece oksidatif stresörlerin neden olduğu apoptozdan birkaç hücre hattını koruduğu dikkate alındığında [185]; Bu sitoprotektif etkinin, ROS'un reaktif olmayan türlere dönüştürülmesi yoluyla korpus luteumda da meydana gelebileceği sonucuna varmak mantıklıdır. Bu nedenle melatonin, oksidatif ve nitrozatif strese karşı birinci savunma hattı olarak kategorize edilebilir [185].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu randomize kontrollü deneysel çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 18.03.2019- E.35745 gün ve sayılı onayı alınmış ve çalışma etik kurallara uygun olarak Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülmüştür. Çalışmanın deney aşaması 30 Haziran 2020 tarihinde Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Giderler için gerekli destek Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (01/2019-54 proje kodu ile) tarafından sağlandı. Deney sonunda çıkartılan dokuların histopatolojisi, İmmünohistokimyasal çalışmaları Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ELİSA deneyleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ABD tarafından çalışıldı.

3.1. Deney hayvanları

Yapılan çalışmada kullanılan hayvanların temini 'Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı San. Ve Tic. Ltd. Şti' adlı firmadan temin edilip, barındırılması, bakımı ve tedavi protokolü Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesinde (GÜEDAM) tarafından yapılmıştır. Bu tez araştırmasında, deneysel OHSS modelinde melatoninin etkilerini incelemek için 22 günlük, 28 adet *Wistar Albino* cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar polisülfon kafeslerde 12 saat gece/gündüz periyodunda, 21-24°C ve %45-55 nem özelliği olan hayvan barınma yerlerinde, standart sıçan yemi

ve musluk suyu ile *ad libitum* olarak beslendi. Hayvanların günlük kafesleri temizlenerek bakımı yapıldı. Sıçanlarda OHSS modelinin oluşturulması ve deneklerin izlenmesi yapıldı.

3.2. Denejde kullanılan kimyasallar ve cihazlar

Tablo 2. Denejde kullanılan cihaz ve kimyasalların listesi.

Denejde Kullanılan Kimyasallar	
VEGF-A Polyclonal Antibody 100µl	Bioss-USA, Katalog no:bs-1665R
VEGF-C Polyclonal Antibody 100µl	Bioss-USA, Katalog no:bs-1586R
Rat Esradiol, E2 ELISA Kit 96T	CUSABIO, Katalog no: CSB-E05110r
Rat VEGF PicoKine™ ELISA Kit	ScienCell Research Laboratories, Katalog No: EK0540)
Rat IL-6 PicoKine™ ELISA Kit,	ScienCell Research Laboratories, Katalog No: EK0412
Formaldehit %10 (Tamp. PH:6.9-7.1)	Tekkim, Katalog TK.060161.05001
UltraVision Polyvalent (Rabbit-Mouse)	LabVision. Katalog no:TP-060-HL
UltraAb Diluent 125ml.	LabVision, Katalog no: TA-125-UD
Melatonin endogenous hormone 5 gr	BioVision Katalog no:248-5G
Chorionic Gonadotropin (cg), human 1 mg	BioVision Katalog no:4778-1000
Pregnant Mare Serum Gonadotropin Peptide	AbbeXa, Katalog no: abx260389
PBS -Fosfat tamponlu su, Ph 7.4	Besolab, Katalog no: BS-161
Hydrogen Peroxide Block	Thermo scientific, Katalog no: TA-125-HP
UltraV Block	Thermo scientific, Katalog no: TA-060-UB
Streptavidin Peroksidaz	Thermo scientific, Katalog no: TS-060-HR
Diaminobenzedin (DAB)	Thermo scientific, Katalog TS-125-HDS
Entellan® new rapid mounting medium	
Ksilen (İzomerleri Karışımı) Extra pure 2.5lt	Tekkim, Katalog TK.090270.02500
Teksoll 96 % Extra pure 2.5lt	Tekkim, Katalog TK. 930131.02500
Haematoxylin Harris Non Pap [11]	Bio-Optica, BO 05-06004/L
Eosin Alcoholic [11]	Bio-Optica, BO 05-10003/L
Denejde Kullanılan Cihazlar	
<ol style="list-style-type: none"> 1. LEICA TP 1020 Doku Takip Cihazı 2. LEICA EG 1120 Parafin Gömme (Blokrama) Cihazı 3. LEICA RM 2245 Mikrotom Aleti 4. Electro-Mag M420BP İnkübatör Cihazı 5. LEICA DM 4000B Germany Kamera entegreli Işık Mikroskobu 6. LEICA LAS V4 4.9 Software 	

3.3. Deney Grupları

Çalışmaya dahil edilen sıçanlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı.

Grup 1: Kontrol (n=7) Grubu; Postnatal 22-26 günler arası: %0,1 Etil Alkol intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.

Grup 2: KOH Grubu (n=7); Postnatal 24. Gün: 10 IU gebe kısrak serum gonadotropini + postnatal 26. Gün: 10 IU hCG subkutan (s.c) uygulandı.

Grup 3: OHSS Grubu (n=7); Postnatal 22. Günden itibaren 4 gün boyunca 10 IU PMSG s.c. ve postnatal 26. gün: 30 IU hCG s.c. verildi.

Grup 4: Melatonin uygulanmış OHSS Grubu (n=7); Postnatal 22. Günden itibaren 4 gün boyunca 10 IU PMSG s.c. ile postnatal 22.günden başlayarak 6 gün boyunca 50 mg/kg/Melatonin i.p. ve postnatal 26. Gün 30 IU hCG s.c. olarak verildi [28].

Deney grubu ratlarda OHSS belirtilerinin ortaya çıkması için postnatal 22.günden itibaren 4 gün boyunca PMSG 10 I.U. s.c. olarak uygulandı. Postnatal 26 günlük olan KOH grubu deneklere 10 I.U. hCG (s.c.), OHSS grubu ve melatonin uygulanmış OHSS grubundakilere (Grup 3) 30 I.U. hCG ile ovulasyon induksiyonu yapıldı [200].

Tüm 22 günlük hayvanların çalışmaya başlamadan önceki ağırlıkları ölçülüp kaydedildi. Tedavi grubu ratlardan Grup 4'e 50 mg/kg Melatonin 1 ml %0,1'lik etil alkolde çözülerek i.p. olarak, her PMSG ve hCG'den 2 saat sonra 22.-27. günler arasında uygulanacaktır. Kontrol grubuna yalnızca melatoninin çözücüsü olan %0,1'lik etil alkol verildi.

Tablo 3. Deney protokolü [200].

	1. gün (22)	2. gün (23)	3. gün (24)	4. gün (25)	5. gün (26)	6. gün (27)	7.gün
Grup 1	%01 Etil Alkol	%01 Etil Alkol	%01 Etil Alkol	%01 Etil Alkol	%01 Etil Alkol	%01 Etil Alkol	Deneyin Bitişi
Grup 2	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	hCG 10 IU		
Grup 3	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	PMSG 10 IU	hCG 30 IU		
Grup 4	PMSG 10 IU ve Melatonin 50 mg/kg	PMSG 10 IU ve Melatonin 50 mg/kg	PMSG 10 IU ve Melatonin 50 mg/kg	PMSG 10 IU ve Melatonin 50 mg/kg	hCG 30 IU ve Melatonin 50 mg/kg	Melatonin 50 mg/kg	

3.3.1. Deney prosedürünün sonlandırılması

Deneyin ilk ve son günü hayvanların canlı ağırlıkları tartıldı ve deney süresi sonunda hayvanlar ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (500 mg/kg) anestezisi altında intrakardiyak punksiyonla kan alınarak sakrifiye edildi.

3.4. Örneklerin toplanması

Sakrifikasyon işlemi Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesinde (GÜEDAM) yapıldı. Ketalazin (50 mg/kg) ve Ksilazinden (10 mg/kg) oluşan karışımla genel anestezi uygulandı. Periton sıvısı alınmasından sonra deneğin kalbinden tüm kanı boşaltılacak şekilde ve atım olmayana kadar sakrifiye işlemi tamamlandı.

Periton sıvısının toplanması

Genel anestezi altında yapılan laparotomi işlemi sonrası peritoneal kavite 2 ml %0,9 NaCl solusyonu (21 derece) ile doldurularak 30 saniye çalkalanıp doku ve damar hasarı oluşturmadan periton yıkama sıvısı dikkatlice geri alındı ve IL-6 ile VEGF'nin ELISA yöntemi ile analizi için deney gününe kadar uygun koşullarda (-20°C) saklandı.

Kan serum örneklerinin elde edilmesi

Serum E2 seviyesi ölçümü için alınacak kanlar EDTA'lı serum tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm da 10 dk santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Elde edilen serumlar yapılacak olan biyokimyasal analizler için -80°C'de deney gününe kadar muhafaza edildi.

3.5. Histolojik Değerlendirme

3.5.1. Ovaryum dokularının alınması

Sakrifiye edilen hayvanları bilateral ovaryum ve uterus dokuları çıkarılarak ağırlıkları ölçüldü. Bütün gruplardaki hayvanların ovaryumları histolojik incelemeler için yeterli miktarda %10'luk nötral formaldehit içeren kaplara alındı.

3.5.2. Doku takibi ve parafin bloklara gömme

Ovaryum dokuları alındıktan sonra %10'luk nötral formaldehit içeren kaplarda 48 saat bekletildikten sonra çıkarılarak 24 saat akarsu altında yıkanarak formaldehitten uzaklaştırıldı. Daha sonra dokulardaki suyun uzaklaştırılması için etil alkol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırma işlemi için ksilole tabi tutuldu ve ardından parafin bloklara gömüldü. Parafinizasyon doku takibi protokolü Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Parafin doku takibi protokolü.

Kimyasal maddeler	Süre
Distile su	1 saat
%70'lik alkol	1 saat
%80'lik alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
%96'lık alkol	1 saat
Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin	1 saat

3.5.3. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi

Lama alınan kesitler, üzerlerindeki parafinin erimesi için etüvde 40 °C'de bir gece boyunca bekletildi. Etüvden alınan kesitler 30 dakika ksilode bekletildi. Rehidratasyon işlemi için sırasıyla 10'ar dakika %100, %96, %80, %70 ve %50'lik etil alkol serilerinde bekletildi. Havada alkol uçana kadar kurutulduktan

sonra 10 dakika akarsuda yıkandı. 5 dakika Harris Hematoksilen'de bekletildi. Sonra 10 dakika akarsuda yıkandı. Daha sonra kesitler %70 alkol + 2-3 damla glasiyel asetik asit karışımına batırılarak 2-3 dip yapıldı. Sonra tekrar akarsu altında 10 dakika yıkanan kesitler 3 dakika Eosin boyasında bekletildi. Bu işlemden sonra 10 dakika daha su altında yıkanan kesitler dehidratasyon için sırasıyla %50'lik, %70'lik, %80'lik, %96'lık ve son olarak da %100'lük alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi ve daha sonra 45 dakika ksilolde bekleyen kesitler entellan ile kapatıldı.

Alınan ovaryum doku örnekleri rutin histolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü ve elde edilen parafin bloklardan 5 µm kalınlığında doku bitene kadar 1/10'lik kesit çifti alınarak, Hematoksilen-Eosin (H&E) boyaması ve İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri uygulandı. Deney sonunda boyanan kesitler Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda incelendi. Elde edilen görüntüler Leica LAS V4.9 programlarıyla değerlendirildi. Histo-Morfometrik olarak ovaryum çapı, antral follikül ve Graafian follikül, atretik follikül sayıları ve korpus luteum sayıları aşağıdaki tanıma göre değerlendirildi [40];

Antral Follikül (Sekonder follikül): Stratum granulosum tabakasında 6 ila 12 hücre tabakası kalınlığına olan ve granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar olan folliküller.

Graafian (Olgun) Follikül: Büyük tek bir boşluk ile oositi çevreleyen kumulus ooforusun izlendiği folliküller.

Atretik Follikül: Oositini kaybetmiş, merkezinde granüloza hücreleri, aralarında piknotik cisimler ve ince parlak bir membran ile teka internadan ayrılmış follikül yapısı.

Korpus Luteum: Merkezinde bir folliküler kavite ile çevresinde granüloza lutein hücre tabakaları ve onun bitişiğinde teka lutein olan yapı.

Kistik Follikül: Büyük bir antral boşluğa sahip, oositi olmayan ve granüloza tabakası incelmış ve hatta dejenere olmuş folliküller.

Ovaryum Çapı: 1/10 örneklem aralığı ile alınan seri kesitlerde ovaryum çapı ölçümü için merkezinden geçecek şekilde alınan 6 farklı şekilde çap ölçümü yapıldı ve bu ölçümlerin ortalaması alındı.

3.5.4. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak polilizinle lamlara yerleştirildi. Deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemleri H&E boyama yönteminde olduğu gibi yapılarak 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Daha sonra, dokulara sitrat tamponu (pH 6.0) ile mikrodalga fırında retriiver işlemi uygulandı. Dokuların etrafı PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olan

immünohistokimya barına dizilip, dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS ile lamalar yıkandı. Yıkanan lamlara 5 dakika UltraV Block uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, 1/200 oranında hazırlanan VEGF-A ve VEGF-C primer antikorlarına etkin bırakılarak 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada dokulara uygulanan primer antikorlar +4 °C derecede 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün primer antikordan sonra lamalar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 10 dakika biotinli sekonder antikor uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular enzimin biotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakılıp, işlem sonunda dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Son olarak ortama diaminobenzedin içeren (DAB) substratı içeren kromojen DAB eklenerek boyaması gerçekleştirildi. Kesitler 3 dakika PBS ve 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen ile 5 dakika boyandı. Sonrasında 3 kez 3'er dakika distile su ile yıkanan kesitler sırası ile %80'lik alkolde 2 dakika %90'lık alkolde 2 dakika bekletildi. Son olarak 1 saat ksilen de bekleyen kesitler entellan ile kapatıldı. Kesitler bilgisayar destekli DM 4000 Leica Germany görüntülü analiz sisteminde incelenerek değerlendirildi.

3.6. ELISA Analizleri

Peritoneal sıvıdan VEGF (ve IL-6 ölçümleri serum örneklerinden ise Estradiol E₂ düzeyleri kantitatif olarak gerçekleştirildi. Ölçümler hazırlık, analiz ve hesaplama olmak üzere üç aşamada planlandı. Bu prosedür ELISA kitin üreticisi tarafından sağlanan bilgiler dikkate alınarak gerçekleştirildi ve bütün çözeltiler ile kit içerisinde mevcut olan reaktifler kullanıldı. Solüsyonlar çalışmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Yıkama tamponu ve analiz tamponu prosedürde belirtilen miktarda distile su ile dilue edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Biotin-konjugat ve Streptavidin-HRP, analiz tamponu kullanılarak plastik tüp içerisinde sırası ile 1:100 ve 1:240 oranında seyreltildi ve seyreltme işleminden sonra 30 dakika içerisinde kullanıldı. Klasik ELISA test protokolü uygulanarak, alınan örnekler her bir kuyucuğa 50 µL olacak şekilde konuldu ve tüm örnekler 2 tekrarlı olarak çalışıldı. İnkübasyon süreleri sonunda primer ve sekonder-HRP konjuge antikörlerle muamele edilen örnekler kit protokolü esas alınarak işleme alındı ve 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri mikropłaka okuyucu yardımıyla ölçümlendirildi. Sonuçlar kit içerisindeki standartlar ile çizilen kalibrasyon grafiği kullanılarak değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Analizler

Tüm deneklerin ovaryum kesitlerindeki ovaryum çapı ölçümü, antral follikül, atretzikreik follikül ve korpus luteum sayımları yapıldı. Sayısal ölçümler medyan, minimum ve maksimum olarak özetlendi. Sayısal ölçümlerin ışığında gruplar

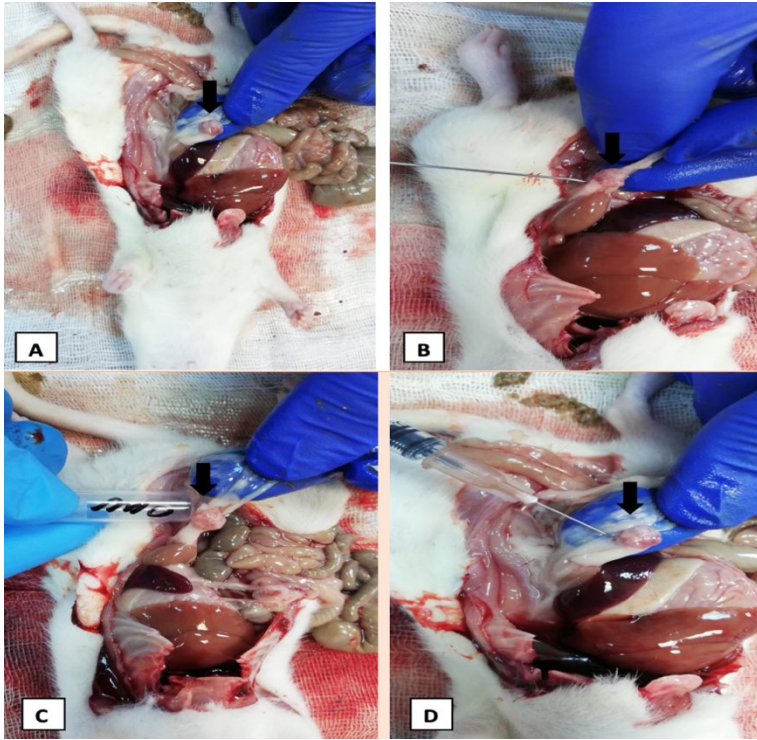
arası farklılık Kruskal Wallis ile iki grup arasındaki farklılık ise Mann Whitney U ile hesaplandı. İstatistiksel analizlerde Graphpad Prism 8.0 paket programı kullanılmıştır ve $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ değerler anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Ovaryum Çıkarılması

Deney prosedürü sonunda sakrifiye edilen hayvanların uterus ve ovaryumları çıkarılarak işlem fotoğraflandı (Resim 1). Kontrol grubunun ovaryumlarının diğer gruplara oranla daha küçük ve pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu görüldü. Özellikle hiperstimüle edilen OHSS grubunun ovaryumları diğer gruplara göre daha büyük, hiperemik ve kistik yapıda gözlemlendi. OHSS modeli ile birlikte melatonin verilen grubun ovaryumları OHSS grubuna göre daha az hiperemik ve küçük olmasına rağmen kistik yapılar gözlenmekteydi (Resim 1).

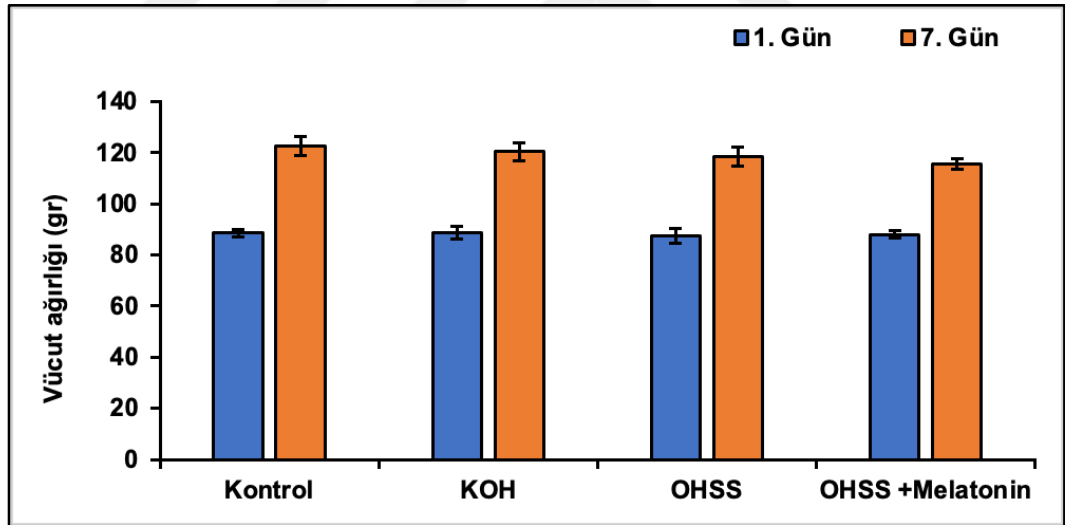


Resim 1. Deney hayvanlarının ovaryum (ok) ve uteruslarının çıkarılması görüntüleri. Kontrol grubu (a), KOH grubu (b), OHSS grubu (c), Melatonin uygulanmış OHSS grubu (d).

4.2. Vücut Ağırlıkları Ölçümü

Deneyin başlangıç ve son gününde sıçanların ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi. Elde edilen veriler ANOVA testi ile istatistiki olarak, Tukey testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

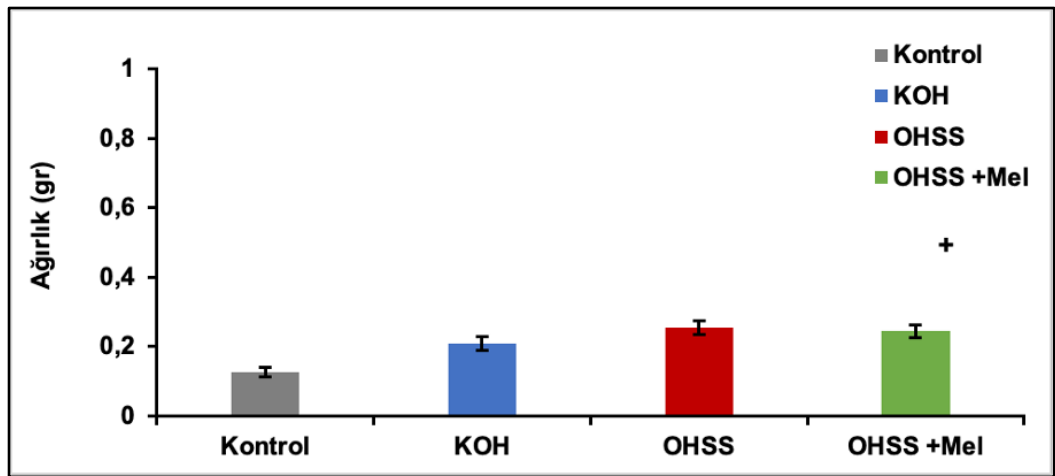
Bütün gruplarda ilk ve son günü arasındaki ağırlık farkları değerlendirildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmada vücut ağırlığı artışlarının istatistiki olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.18$) (Şekil 11).



Şekil 11. Deney gruplarının deneyin 1. ve 7. günü ölçülen vücut ağırlıklarının istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

4.3. Ovaryum Ağırlıklarının Ölçümü

Deney sonunda çıkarılan ovaryumlar tartıldı ve çıkan sonuçlar istatistiki olarak değerlendirildi. Ovaryum ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırmasında en düşük ortalama ağırlık 0.125 ± 0.01 gr ile kontrol grubuna ait iken en yüksek ortalama ağırlık 0.255 ± 0.01 gr ile OHSS grubuna aitti. KOH grubu ve melatonin uygulanmış OHSS grubunun ortalama ovaryum ağırlıkları ise sırasıyla 0.208 ± 0.02 gr ve 0.244 ± 0.01 gr olarak hesaplandı. KOH, OHSS ve melatonin uygulanmış OHSS gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ortalama ovaryum ağırlıklarının daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.0002$, $p=0.0007$). KOH, OHSS ve melatonin uygulanmış OHSS grupları karşılaştırıldığında ise ortalama ovaryum ağırlıkları bakımından gruplar arasında istatistiki olarak bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil12).



Şekil 12. Deney gruplarının ovaryum ağırlıkları ölçümünün istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

4.4. Histomorfometrik Değerlendirme Sonuçları

4.4.1. Histolojik bulgular

4.4.1.1. Kontrol grubu

Hematoksilen&ezin boyalı ovaryum preparasyonları ışık mikroskobu ile incelendiğinde, kontrol grubuna ait ovaryumların gelişmekte olan follikül sayıları, korteks ve medulla yapıları ile teka tabakalarının normal morfolojik görünümde olduğu gözlemlendi. Tunika albuginea tabakası altında kortekste değişik evrelerde bulunan gelişmekte olan follikül yapıları ile granüloza hücre tabakaları izlendi (Resim 2A). Folliküllerin büyümesi ile birlikte oositi çevreleyen granüloza hücre tabakasının artmış kalınlığı ve ileri aşamalarda granüloza hücrelerinin arasındaki boşlukların birleşmesi ile antrum oluşumu izlenmektedir. Folliküllerin etrafını çevreleyen ve daha eozinofilik boyanan teka interna ve eksterna tabakaları tüm preparatlarda normal bir şekilde gözlenmekteydi. (Resim 2)

4.4.1.2. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon grubu

Hormonal indüksiyon yapılmış bu grubun ovaryum kesitlerinde kontrol grubuna kıyasla korpus luteum, kistik follikül ile sekonder ve Graaf folliküllerdeki artış dikkat çekiciydi. Graaf folliküllerinde büyük tek parça halinde antral boşluk ve oositi çevreleyen kumulus ooforus gözlenmekteydi. Medulladaki vaskülarizasyon artışı, sekonder ve Graaf follikül sayısının artması indüksiyon

sonunda beklenen bir durum olarak değerlendirildi. Bunlara ek olarak boyut olarak Graaf follikülünden daha büyük olan kistik folliküllerde granüloza hücre tabakasının azaldığı ve dejenere olduğu, içinde bulunan boşluğun daha fazla ışık kırıcı yapıda olduğu gözlemlendi (Resim 3).

4.4.1.3. OHSS grubu

OHSS grubunun çoğu kesitlerinde ovaryumu çevreleyen ince katmanlı, yer yer içinde hemorajik sahalar görülen yapılar gözlemlendi. Bazı preparatlarda kistik folliküllerin dev boyutlara ulaştığı ve sonrasında dejenere olup rüptüre olmasıyla ovaryum dokusunun parçalara ayrıldığı izlendi. Aslında, etrafında olan kistik follikül yapıları ile beraber çok büyük boyutlara ulaşan bu grup ovaryum çapları bu gibi dejenerasyon ve kopmalar sonucunda oluşan ayrılmalar nedeniyle daha düşük ölçüldü. Gerek kistik folliküllerin büyümesi gerekse bu folliküllerin bütünlüğünün kaybolması sonucu tunika albuginea tabakasının ovaryumdan ayrıldığı ve yer yer parçalandığı gözlemlendi. Dikkati çeken diğer bir yapı ise KOH grubunda da sayıları artmaya başlayan korpus luteum yapıları idi. OHSS grubunda çoğu korpus luteumun içinde hemorajik alanlar izlenmekteydi. En dıştan ovaryumu çevreleyen artan dev kistik folliküller, onun altında hem sayı hem de boyut olarak artmış korpus luteum yapıları nedeniyle medullanın oldukça küçüldüğü ve bu alanda vaskülarizasyonun arttığı gözlemlendi. Medullada ve çoğu zaman korteksin içlerine doğru ilerleyen yaygın hemorajik alanların geniş yer kapladığı görüldü. Kontrol ve KOH grubu ile kıyaslandığında bu hemorajik alanların sayısı oldukça fazlaydı. Bu grupta ayrıca sekonder ve Graaf follikül

sayılarının artışına ek olarak, içinde zona pellusida parçaları ve apoptotik hücreler olan daha parlak görünümdeki antrum ile granüloza hücre tabakasında piknotik cisimlerin gözlemlendiği atretik follikül sayılarının arttığı tespit edildi (Resim 4).

4.4.1.4. Melatonin uygulanmış OHSS grubu

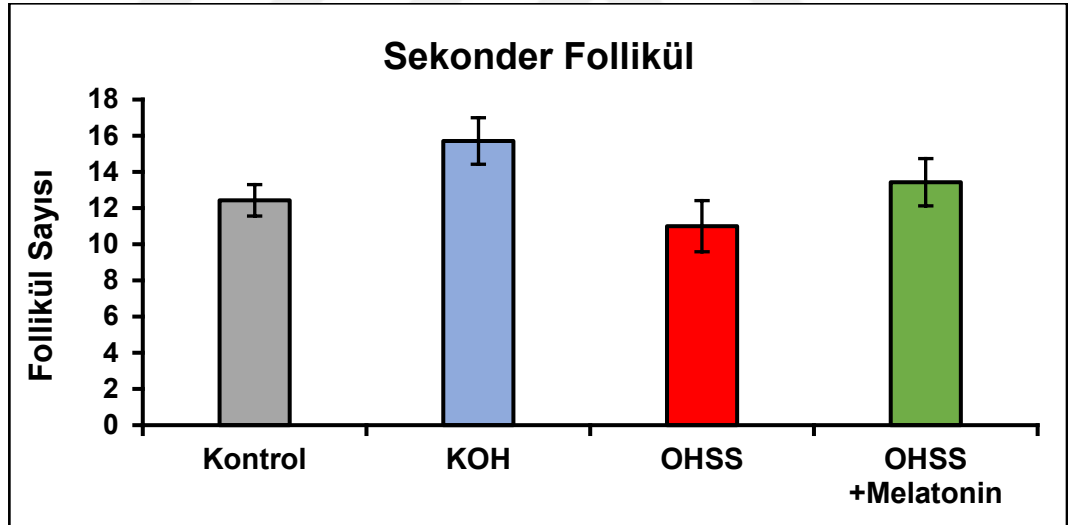
OHSS grubu ile karşılaştırıldığında korpus luteum sayıları ve kistik follikül sayıları bakımından anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Bu grupta OHSS grubuna göre ovaryum bütünlüğünün daha iyi korunduğu, OHSS grubunda bulunan aşırı vaskularizasyon ve hemoraji alanlarının çok daha az olduğu gözlemlendi. Kistik folliküllerin yer yer devam ettiği görüldü. Diğer taraftan Graafian follikül sayılarının daha çok arttığı, atretik follikül sayılarında azaldığı tespit edildi (Resim 5).

4.4.2. Ovaryum follikül sayımı

Hematoksilen&eoizin ile boyanan preparatlarda antral, Graafian, atretik folliküller, korpus luteum sayıları ile ovaryum çapı ölçümü aşağıdaki tanıma göre yapıldı [40] ve sonuçlar Kruskal Wallis ve Mann Whitney U ile analiz edildi.

4.4.2.1. Sekonder follikül sayımı

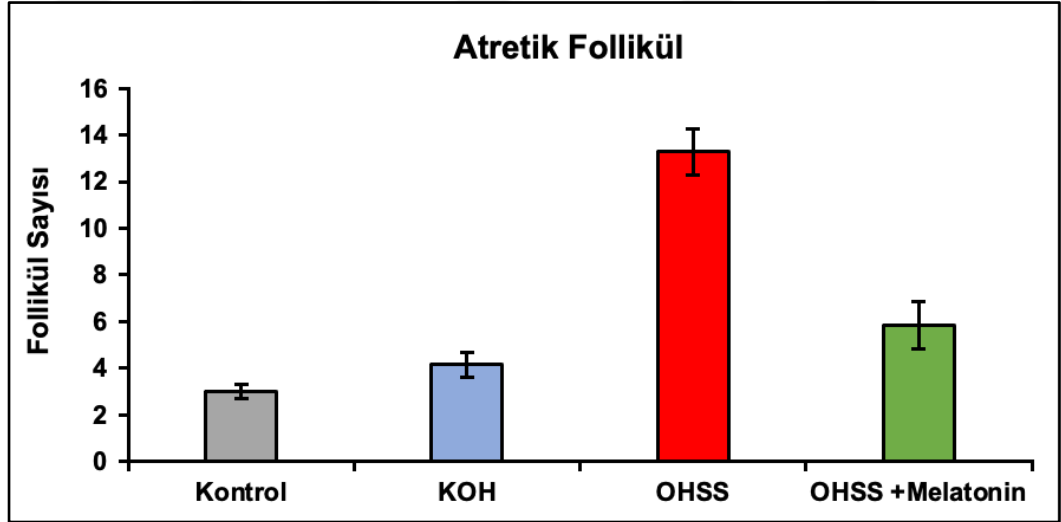
Sekonder follikül sayılarının değerlendirilmesinde, diğer gruplara göre en fazla sayıda follikülün $15,71 \pm 1,28$ ile KOH grubunda olduğu ve en az sayıdaki sekonder follikülün ise $11 \pm 1,41$ ile OHSS grubunda olduğu tespit edildi. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.9999$). Kontrol ve melatonin uygulanmış OHSS grubunda ise sekonder follikül sayıları sırasıyla $12,43 \pm 0,86$ ve $13,43 \pm 1,30$ idi. Grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında fark olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.



Şekil 13. Deney gruplarının sekonder follikül sayılarının ortalama değerlerinin istatistiksel grafiği. Ort.değer ± SEM

4.4.2.2. Atretik follikül sayımı

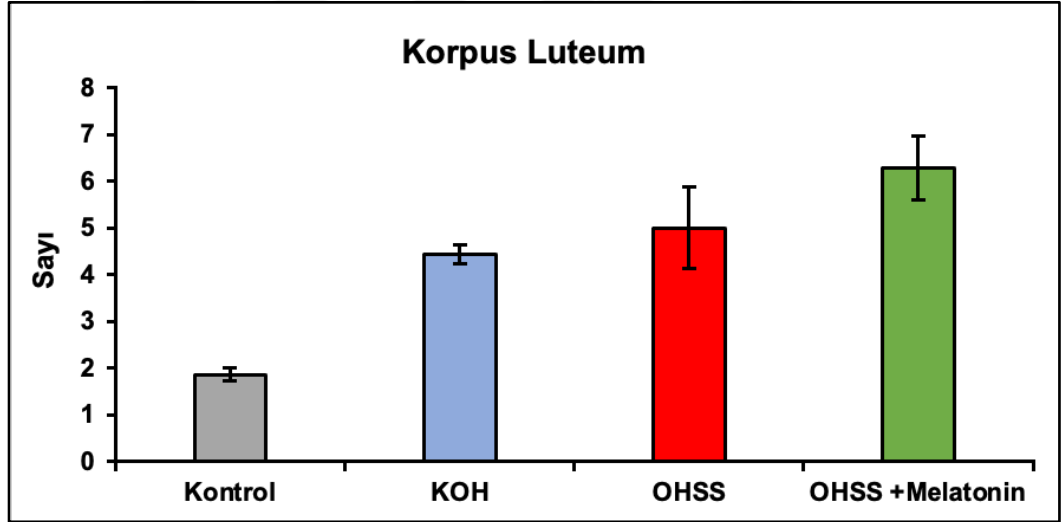
Atretik follikül sayılarının istatistiki değerlendirmesinde en fazla follikülün $13,29 \pm 0,99$ ile OHSS grubunda olduğu en düşük sayının ise $3 \pm 0,30$ ile Kontrol grubunda olduğu görüldü. Kontrol ve OHSS gruplarının atretik follikül sayıları bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.0001$). İkinci en düşük değer ise $4,14 \pm 0,55$ ile KOH grubunda idi. Melatonin uygulanmış OHSS grubu değerleri ise $5,85 \pm 1,01$ idi. OHSS grubunun diğer gruplarla arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.0001$).



Şekil 14. Deney gruplarının atretik follikül sayılarının ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

4.4.2.3. Korpus luteum sayımı

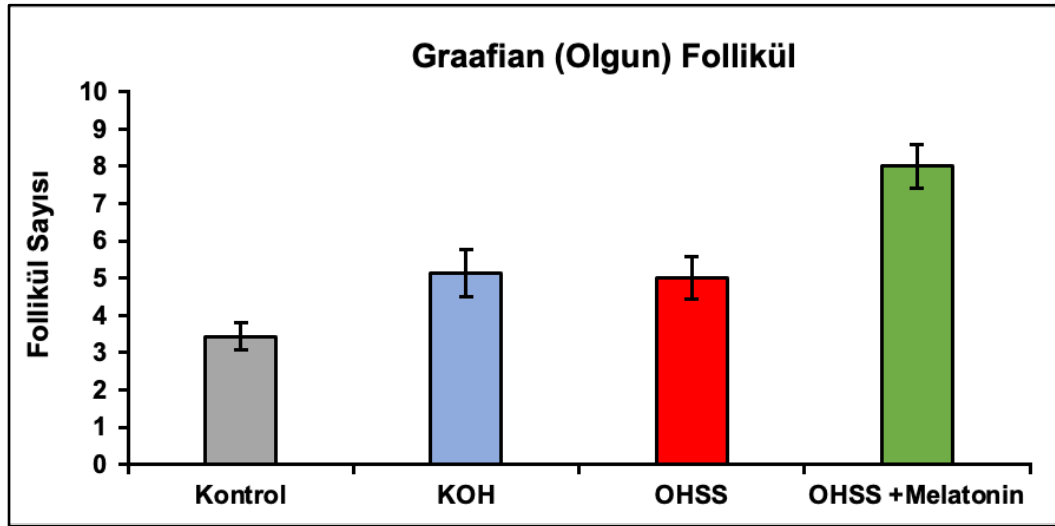
Korpus luteum sayılarının istatistiki analizinde kontrol grubunun korpus luteum sayılarının ortalama değeri $1,85 \pm 0,14$ ile diğer gruplara göre en az olduğu, en fazla ise melatonin uygulanmış OHSS grubunda olduğu görüldü. Bu iki grubun korpus luteum sayılarının karşılaştırılmasında her iki grup arasında istatikselsel olarak anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p < 0.0001$).



Şekil 15. Deney gruplarının korpus luteum sayılarının ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

4.4.2.4. Graafian (olgun) follikül sayımı

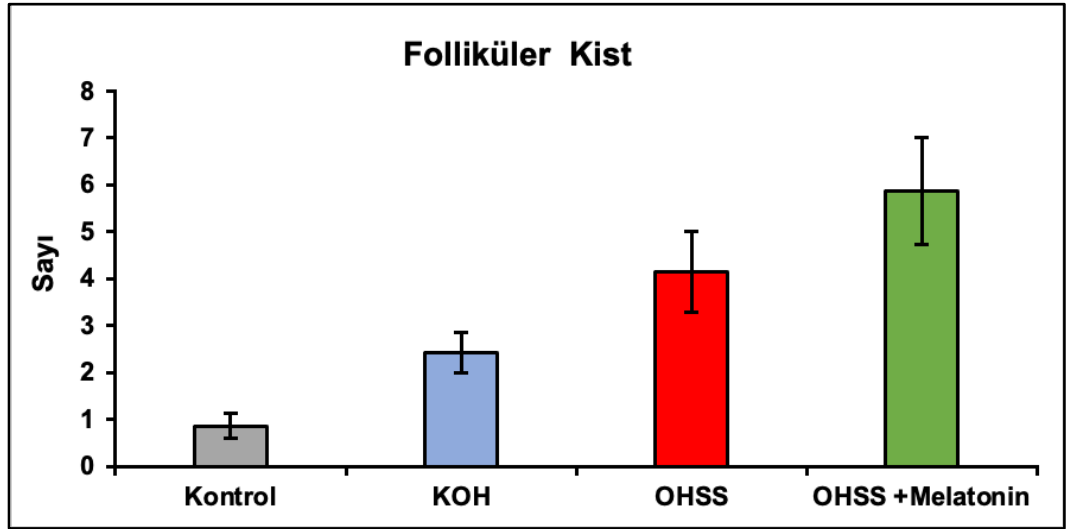
Graafian (olgun) follikül sayılarının istatistiki analizinde kontrol grubu sayılarının ortalama değeri $3,42 \pm 0,36$ ile en düşük iken, en fazla ise $8 \pm 0,57$ ile melatonin uygulanmış OHSS grubunda olduğu, her iki grubun kendi aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.0001$). KOH grubunun olgun follikül sayısının $5,14 \pm 0,63$ ve OHSS grubunun olgun follikül sayısının ise $5 \pm 0,57$ olduğu görüldü. Melatonin uygulanmış OHSS grubunun olgun follikül sayısının KOH ve OHSS gruplarına göre farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p = 0.007$ ve $p = 0.0044$).



Şekil 16. Deney gruplarının Graafian (olgun) follikül sayılarının ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

4.4.2.5. Kistik follikül sayımı

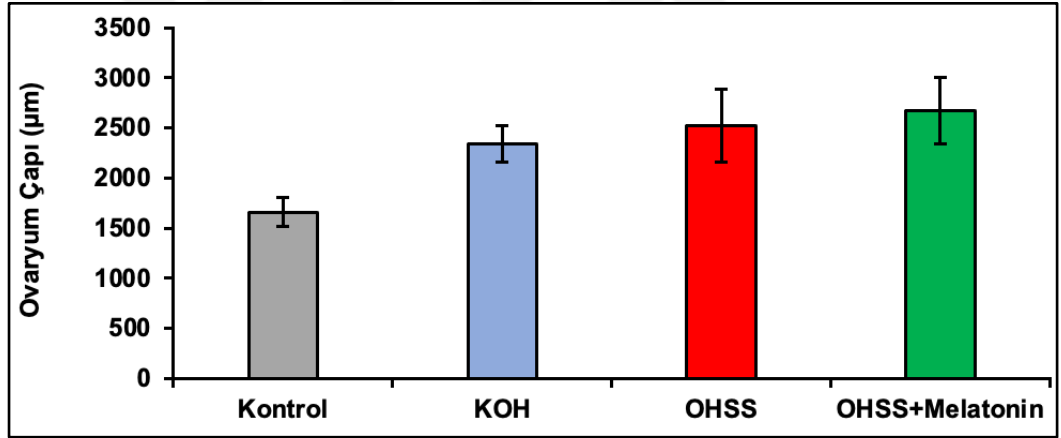
Folliküler kist sayılarının istatistiki analizinde kontrol grubu sayılarının ortalama değeri $0,85 \pm 0,26$ ile en düşüktü ve en fazla folliküler kist sayısına sahip melatonin uygulanmış OHSS grubunun ise folliküler kist sayısının $5,85 \pm 1,14$ olduğu görüldü. Her iki grup arasındaki farkın istatikselsel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0.0006$). KOH grubunda folliküler kist sayısının $2,42 \pm 0,42$ iken OHSS grubunda ise bu sayının $4,14 \pm 0,85$ olduğu görüldü. Melatonin uygulanmış OHSS grubu ile KOH grubu arasında ve OHSS grubu ile Kontrol grubu arasında folliküler kist sayısı bakımından istatistikselsel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.0229$ ve $p=0.0316$).



Şekil 17. Deney gruplarının folliküler kist sayılarının ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

4.4.3. Ovaryum çapı değerlendirilmesi

Ovaryum çap ölçümlerinin istatistiksel analizine göre en küçük ortalama çap $1659 \pm 143,7 \mu\text{m}$ ile kontrol grubunda iken en büyük değer $2673 \pm 327,6 \mu\text{m}$ ile OHSS grubuna aitti. OHSS ile diğer grupların ovaryum çapı ölçümleri kıyaslanmasında anlamlı bir fark gözlenmedi fakat morfolojik olarak OHSS ve melatonin uygulanmış OHSS grubunda artmış kistik foliküllerin dejenere olup bütünlüğünü yitirmesine rağmen ovaryum çaplarındaki artış dikkat çekiciydi.



Şekil 18. Deney gruplarının ovaryum çaplarının ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

4.4.4. İmmunohistokimyasal bulgular

Deney gruplarından alınan ovaryum kesitlerin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde VEGF-A ve VEGF-C antikorları kullanıldı. Buna göre Kontrol ve KOH grubu kesitlerinde tunika albuginea altındaki geç primer

follikül, sekonder follikül ve korona radiatayı oluşturan hücrelerde VEGF-A immünreaktivitesi izlendi (Resim 6C). OHSS grubunda ise yaygın vaskülarizasyon nedeniyle medullada (Resim 6B, E) ve olgun folliküllerin granüloza hücre tabakaları ile teka tabakalarında yaygın immünreaktivite mevcuttu (Resim 6E). Melatonin uygulanmış OHSS grubunda ise OHSS grubuna kıyasla VEGF-A immünreaktivitesinin azaldığı negatif kontrol grubuna göre artmış alanların olduğu gözlemlendi (Resim 6A).

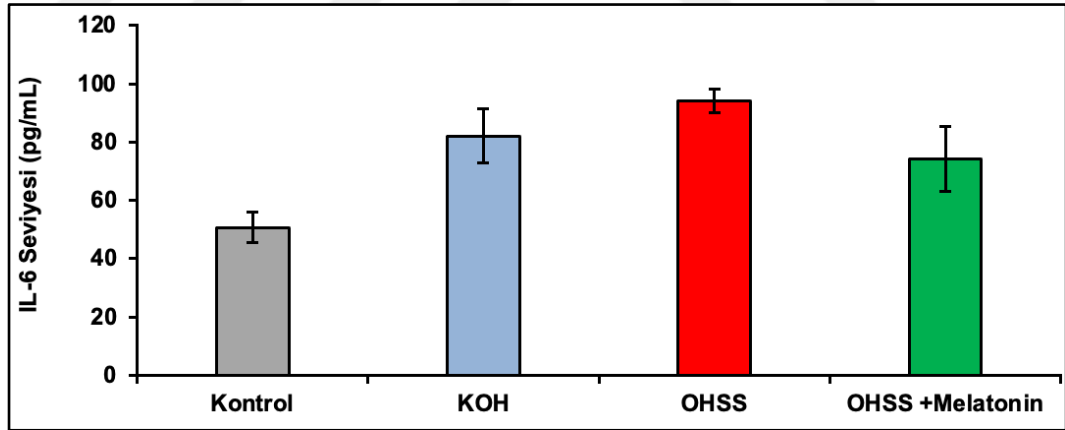
VEGF-C immunohistokimyasal çalışmasında ise kontrol grubunda granüloza ve teka tabakası hücrelerinde immünreaktivite gözlemlendi (Resim 7A). KOH grubunda sekonder folliküllerin granüloza hücrelerinin ve medullanın tutulumu izlendi (Resim 7C). OHSS grubunda ise sekonder follikül granüloza hücreleri ve teka tabakalarının diğer gruplara göre yaygın immünreaktivitesi mevcuttu. Melatonin uygulanmış OHSS grubunda folliküllerin granüloza hücrelerinin diğer gruplara özellikle de OHSS grubuna kıyasla daha az immünreaktivitesi olduğu görüldü.

4.4.5. ELISA testi bulguları

Peritoneal aspirat sıvısının ELISA testi ile değerlendirilmesi sonucunda IL-6 ve VEGF seviyeleri incelendi.

4.4.5.1. IL-6 analizi değerlendirilmesi

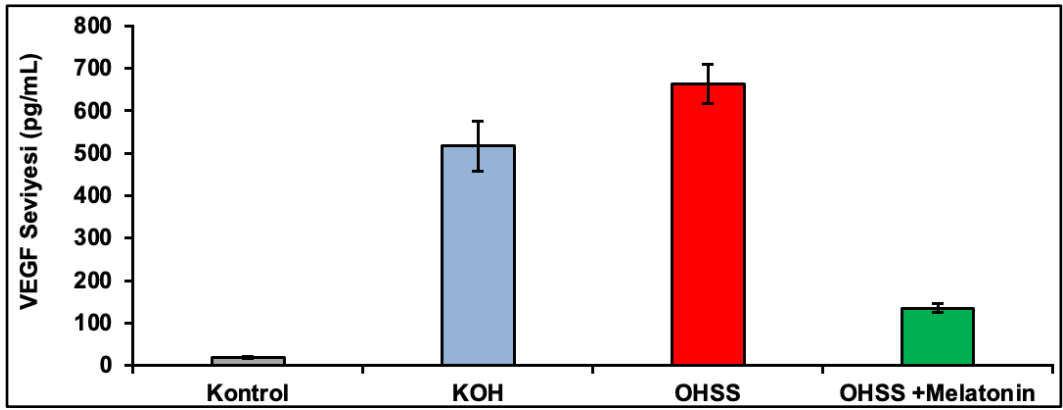
Kontrol grubu IL-6 seviyelerinin $50,72 \pm 5,24$ pg/ml olarak en düşük iken en yüksek değer ise $94,15 \pm 3,94$ pg/ml ile OHSS grubuna aitti. IL-6 seviyeleri KOH grubunda $82,09 \pm 9,32$ pg/ml, melatonin uygulanmış OHSS grubunda ise $74,27 \pm 11,17$ pg/ml olarak belirlendi fakat bu artışlar OHSS grubuna göre daha azdı. OHSS grubunun kontrol grubuna göre IL-6 seviyesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p=0.0041$). Diğer grupların birbiriyle karşılaştırılmasında IL-6 seviyeleri bakımından fark olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi.



Şekil 19. Deney gruplarının peritoneal aspirat sıvısındaki IL-6 seviyelerinin ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer \pm SEM

4.4.5.2. VEGF analizi değerlendirilmesi

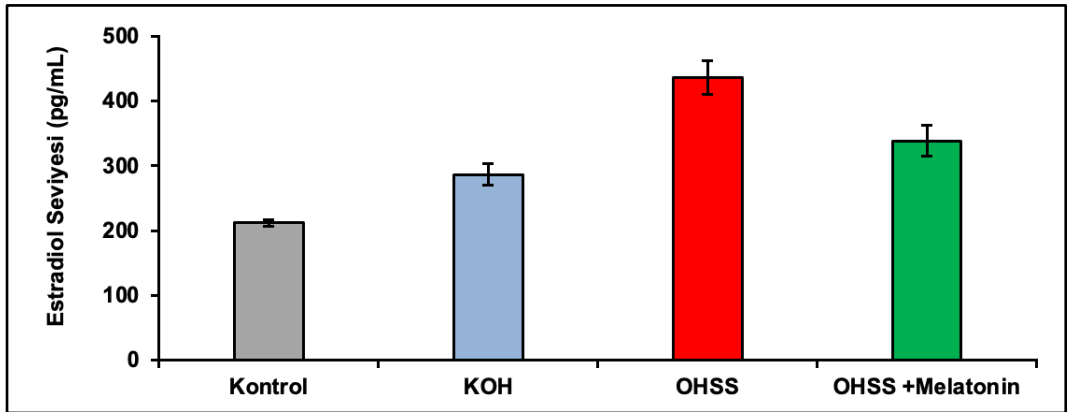
Kontrol grubunun peritoneal aspirat sıvısı VEGF seviyeleri $18,9 \pm 1,6$ pg/ml ile en düşük seviyede iken en yüksek değer $663,2 \pm 46,49$ pg/ml ile OHSS grubuna aitti. Kontrol ve OHSS gruplarının ortalama VEGF seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.0001$). KOH grubunun ortalama VEGF seviyeleri $516,9 \pm 57,98$ pg/ml ve melatonin uygulanmış OHSS grubunun $135,1 \pm 10,8$ pg/ml olarak ölçüldü. Gruplar arası karşılaştırmada ise Kontrol ve KOH grupları arasında anlamlı fark olduğu ($p = 0.0027$), OHSS ve melatonin uygulanmış OHSS grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p = 0.255$) fakat diğer grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.



Şekil 20. Deney gruplarının peritoneal aspirat sıvısındaki VEGF seviyelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel grafiği. Ort.değer \pm SEM

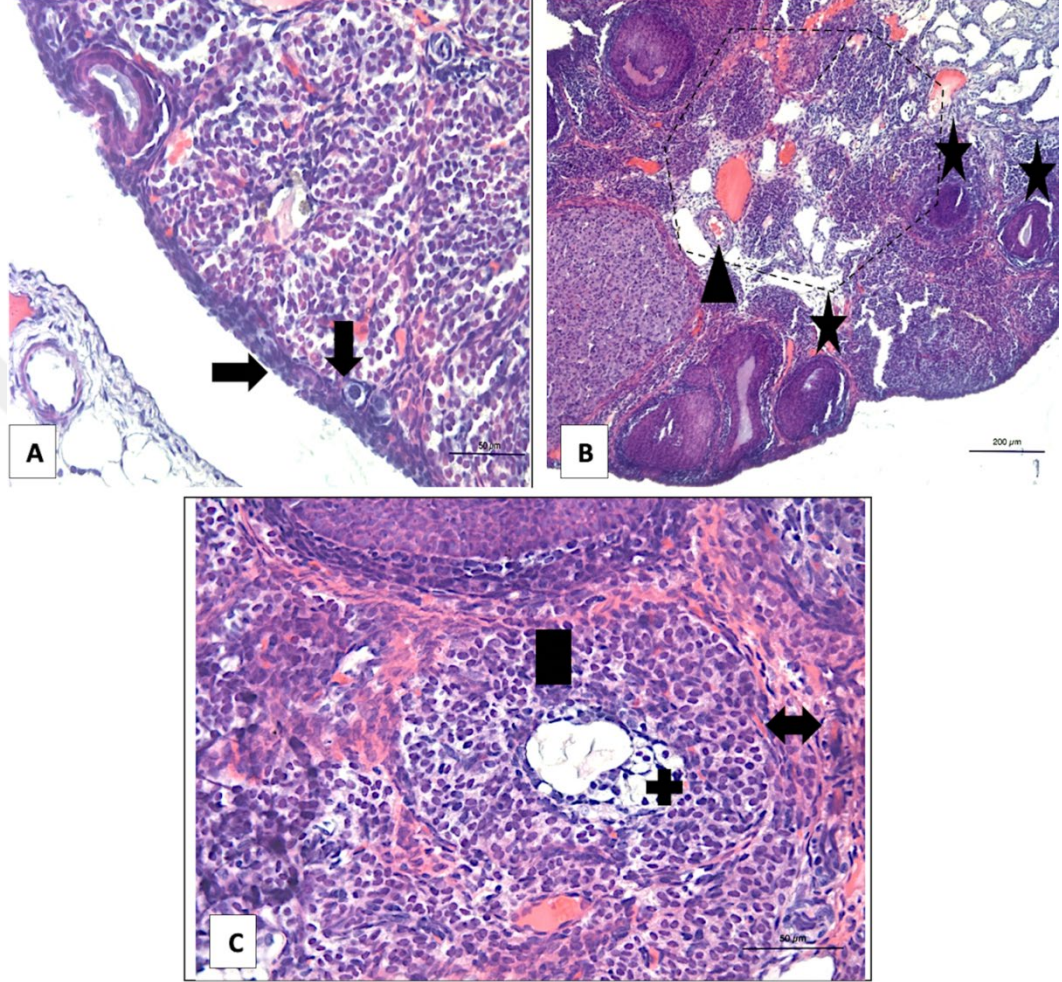
4.4.5.3. Estradiol (E2) analizi değerlendirilmesi

Kan serum örneklerinden elde edilen E2 sonuçlarının analiz sonucunda; en düşük seviye $212,1 \pm 5,33$ pg/ml ile kontrol grubuna ait iken, en yüksek değer $436,3 \pm 25,94$ pg/ml ile OHSS grubuna aitti. KOH grubunun E2 seviyeleri $286,8 \pm 16,93$ pg/ml ve melatonin uygulanmış OHSS grubunun E2 seviyeleri $338,5 \pm 23,89$ pg/ml olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre Kontrol ile KOH grupları arasında ve KOH ile melatonin uygulanmış OHSS grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (sırasıyla $p=0.0599$ ve $p=0.2734$). OHSS grubunun Kontrol grubu ile kıyaslandığında E2 seviyelerinin 2 kat artmış olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.0001$). OHSS grubunun melatonin uygulanmış OHSS ve KOH grupları ile karşılaştırılmasında anlamlı fark olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.0093$ ve $p<0.0001$).

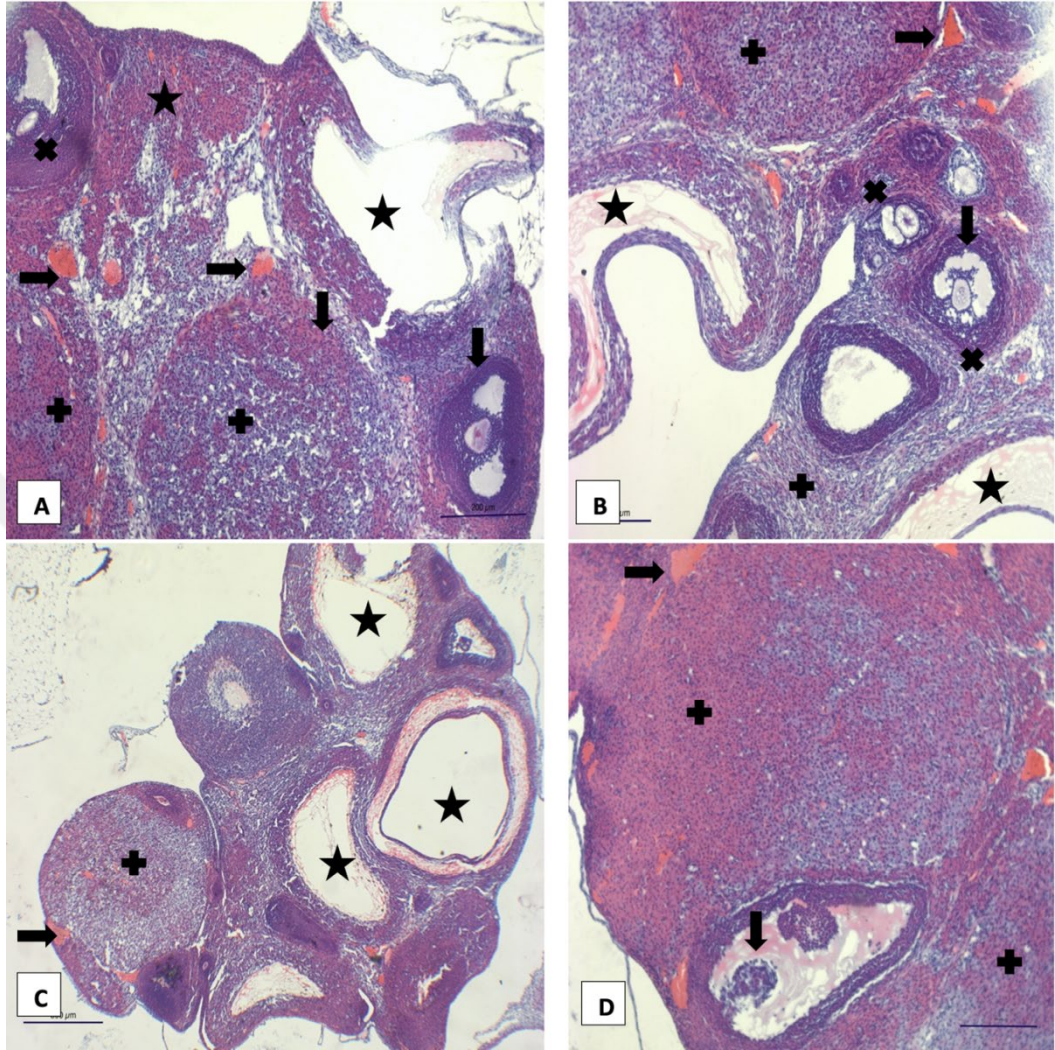


Şekil 21. Deney gruplarının serum örneklerindeki Estradiol (E2) seviyelerinin ortalama değerlerinin istatistiki grafiği. Ort.değer±SEM

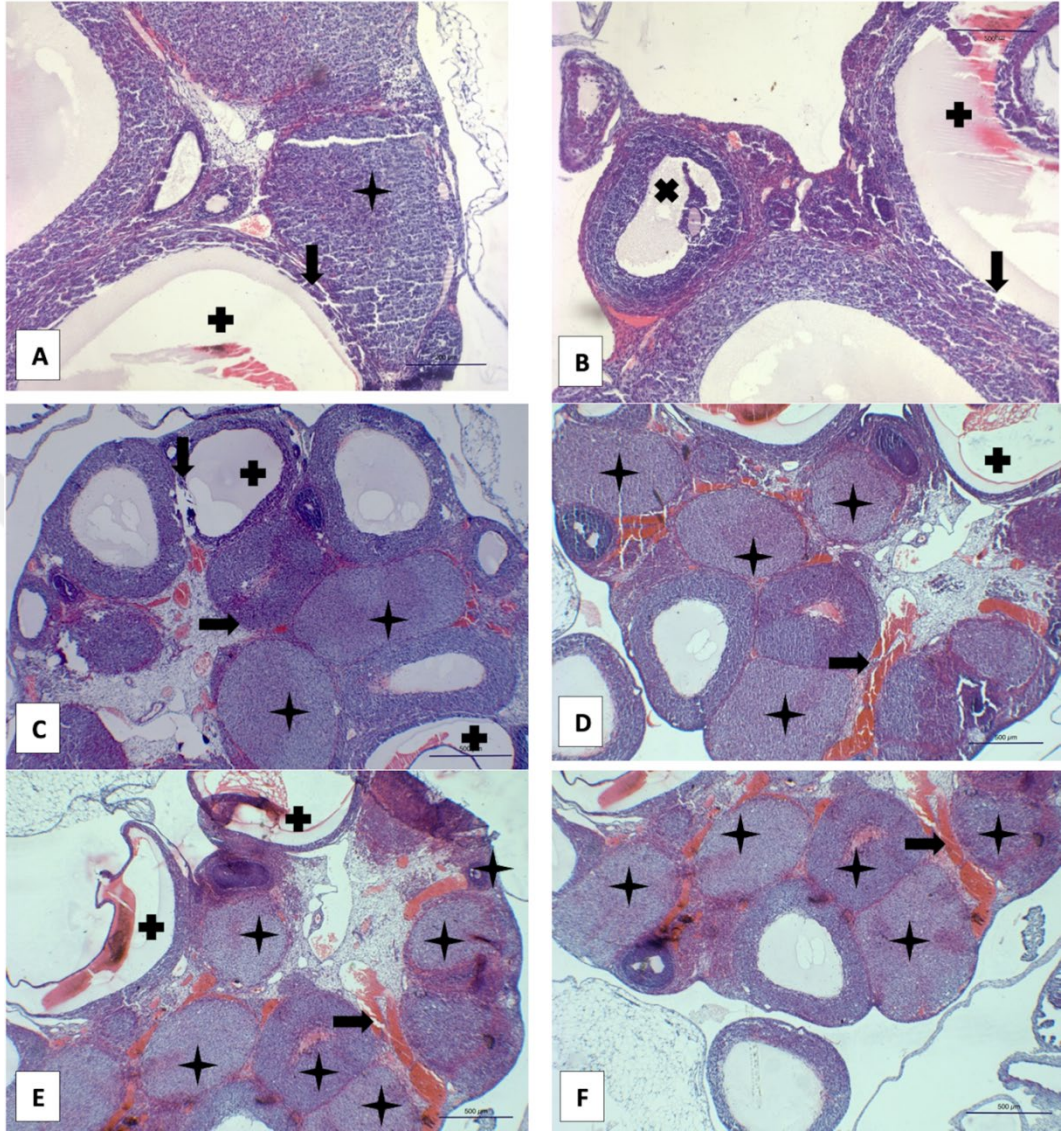
RESİMLER



Resim 2. Kontrol grubuna ait hematoksilen&eozin ile boyanmış kesitler. A: Tunika albuginea (➡) altında gelişmekte olan primordial follikül ve çevresinde tek katlı yassı epitel (⇓)(40x). B: Küçük büyütmedeki kesitte medulla, kan damarları (▲)ve follikülogenezin değişik aşamasındaki folliküller (★)(4x). C: Antrumun oluşmaya başladığı sekonder follikül (⊕), çok sıralı granüloza hücre tabakası (■) ve onu çevreleyen teka interna ve teka eksterna (↔) tabakaları (40x).

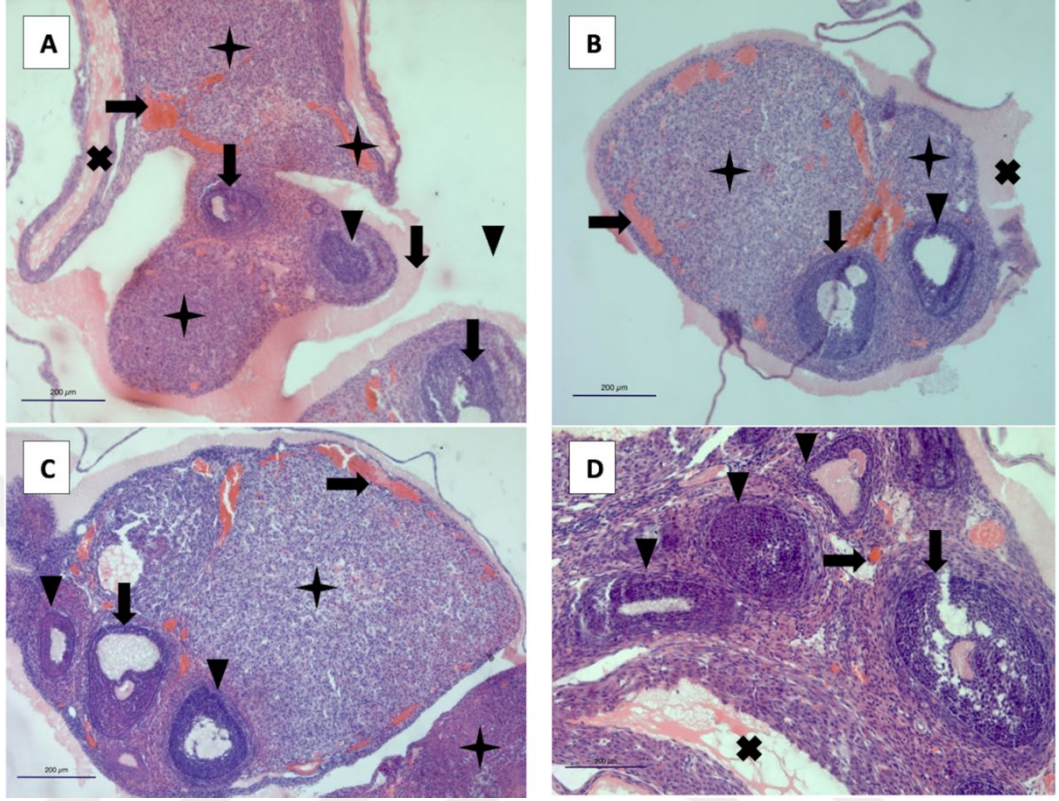


Resim 3. KOH grubuna ait hematoksilin-eozin boyama görüntüleri. A. Artmış korpus luteum sayıları (★), özellikle kortekste bazen medullaya yayılmış küçük hemorajik alanlar (→). B. Olgun (Graafian) follikül (★) ve onun yanında sekonder (antral) follikül (★) izlenmekte (20x). C. Kistik yapılar (★) ve bazen dejenere olup bütünlüğünün bozulduğu görülmekte (4x). D. Olgun bir follikül ve daha eozinofilik boyanmış bir korpus luteum görünümü (20x).

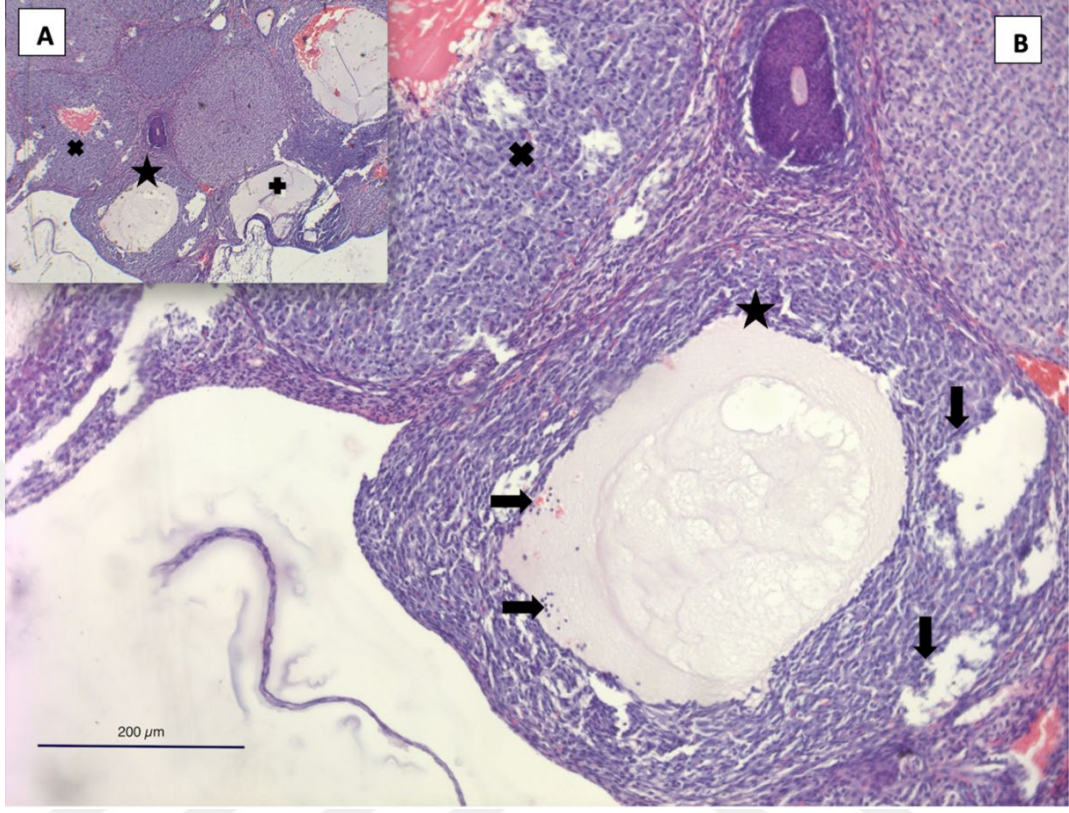


Resim 4. OHSS grubu ovaryum kesitlerinin hematoksilin-eozin boyanmış görüntüsü.

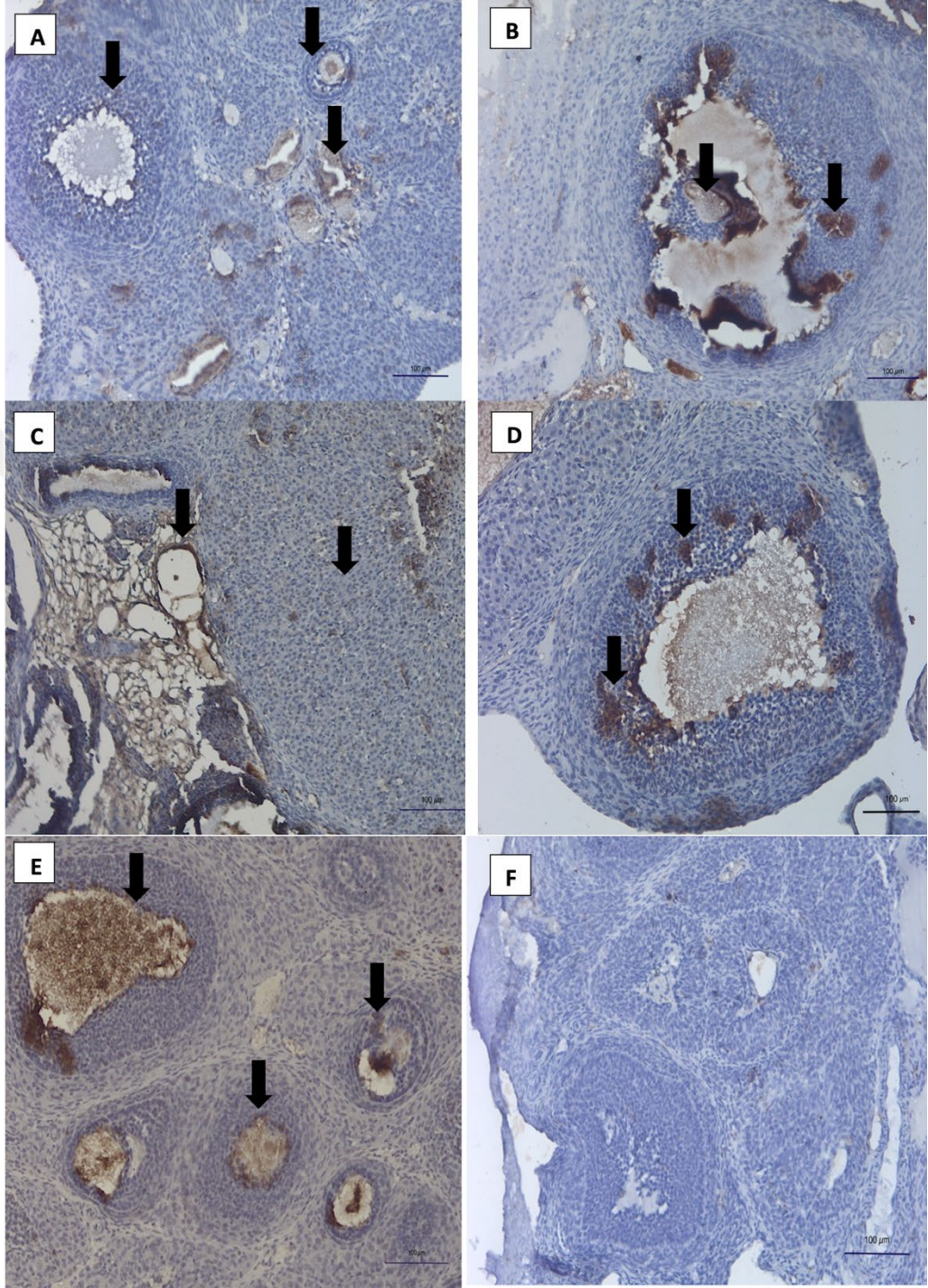
A: Kistik folliküller (+) ile dejenere olmuş ve incelmış granüloza tabakası (↓). B: Oositi çevreleyen kumulus ooforus yapısı ve geniş, tek parça halinde antrumu bulunan Graffian (Olgun) follikül (✱) görünümü(10x) . C: OHSS grubunda artmış sayıda bulunan korpus luteum (+) ve kistik follikül görünümü (4x). D: Korteks ve medullada yaygın hemorajik alanlar (→) (4x). E: Kistik folliküllerin dejenere olup bütünlüğünü yitirmesi oluşan yapılar (4x). F. Çok sayıda korpus luteum ve hemorajik sahalar izlenmekte (4x).



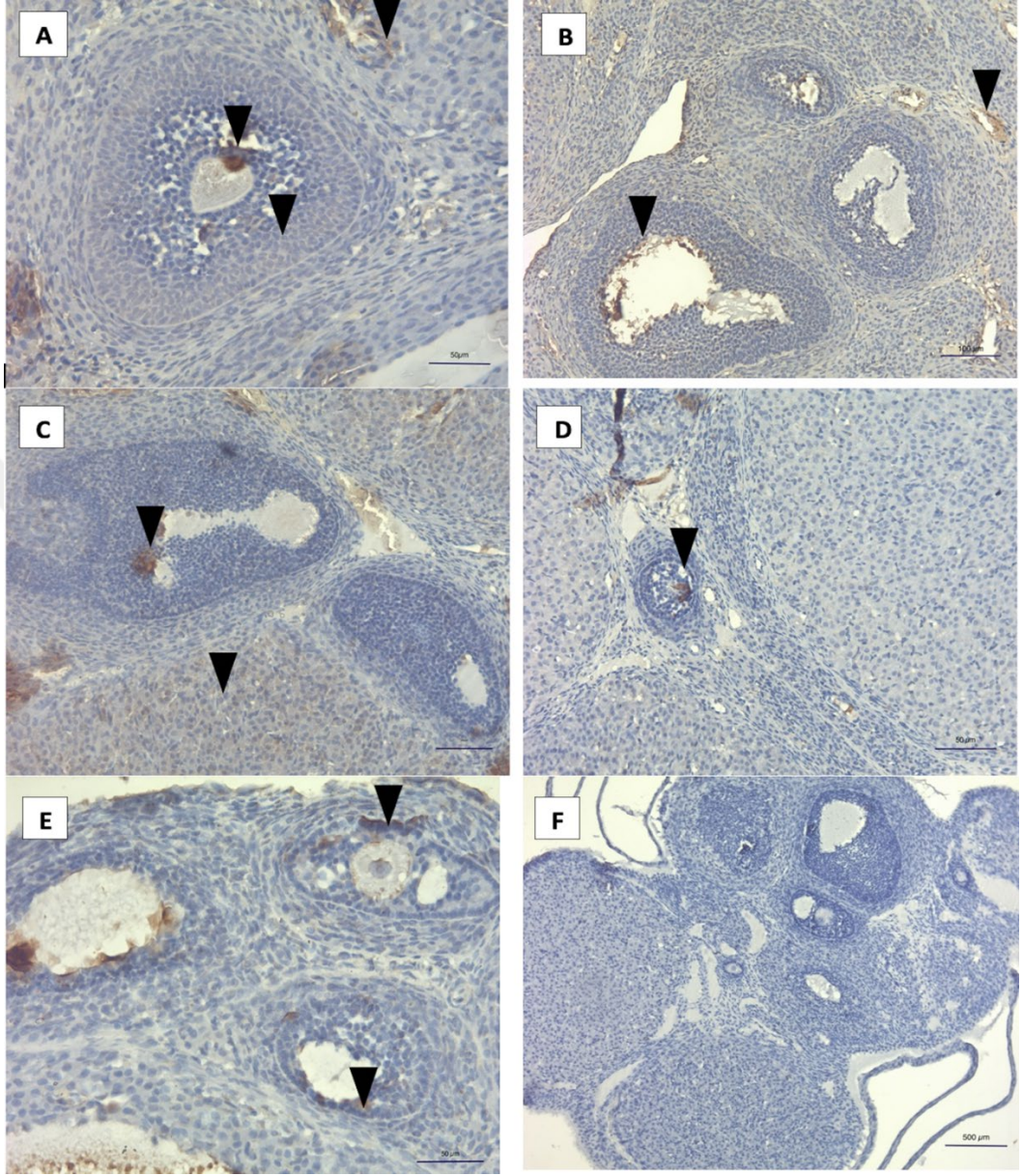
Resim 5. Melatonin uygulanmış OHSS grubunun hematoxilen-eozin ile boyanmış kesitlerinin görünümü. A: Büyük kistik folliküllerin (✱) dejenere olduğu ve hemorajik alanlar (➡) gözlenmektedir (10x). B: Etrafındaki kistik folliküllerin dejenerasyonu sonucu parçalara ayrılmış ama içindeki yapıların korunduğu ovaryumun küçük büyütme görünümü (10x). C: Geniş ve eozinofilik görünümde olan ve luteinize olmuş bir korpus luteum (✚) ve sekonder folikül (⬇) görünümü (10x). D: Gelişmekte olan folliküller (▼), alt tarafta büyük bir kistik folikül ile olgunlaşmaya başlamış bir sekonder folikül görünümü (10x).



Resim 6. OHSS grubuna ait hematoxilen-eozin boyama görüntüleri. A. Küçük büyütmede kistik yapılar (+) ve korpus luteum (*) görülmekte (4x). B. Büyük büyütmede Olgun (Graafian) follikülün (*) atreziye gitmesi, granüloza hücreleri arasında dejenerasyonlar (↓) ve antrumda apoptotik cisimler (⇒) izlenmektedir (10x).



Resim 7. VEGF-A antikorunun tüm grup ovaryum kesitlerindeki immünreaktivitesi görüntüleri. A: Kontrol grubunda atretik follikül ve geç primer follikül granuloza hücrelerindeki immünreaktivite (20x). B: KOH grubunda olgun follikül granuloza hücrelerindeki tutulum (20x). C ve D: OHSS grubunda medulladaki kan damarları etrafında ve olgun follikül granuloza ve antrumda immünreaktivite artışı (20x). E: Melatonin uygulanmış OHSS grubundaki gelişmekte olan follikül granuloza hücrelerindeki ve olgun follikül granuloza ve antrumda immünreaktivite (20x). F: Negatif kontrol grubu (20x).



Resim 8. VEGF-C antikoru ile ovarium kesitlerinde immünreaktivite görüntüleri. A: Kontrol grubuna ait sekonder follikülün oosit stoplazmasındaki immünreaktivite. B: OHSS uygulanmış melatonin grubuna ait görsel olarak olgun follikül granuloza hücre ve damar çevresindeki immünreaktivite. C: KOH grubuna ait follikül hücresi ve luteinize hücre gruplarındaki immünreaktivite. E: OHSS grubunda gelişmekte olan folliküllerin granuloza hücreleri ve teka tabakalarının immünreaktivite artışı. F: Negatif kontrol grubu.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda artan infertilite oranları nedeniyle ÜYTE kliniklerine başvuru sayısı giderek artmaktadır. Uygulanan tedavi protokolleri gebelik şansını artırmak ve oluşabilecek komplikasyonları önlemek amacıyla sürekli güncellenmektedir [1, 2]. Ovaryan hiperstimulasyon sendromu (OHSS) anovulatar kişilerde kullanılan ovulasyon indüksiyonu tedavisinin ciddi bir komplikasyonudur [77, 78]. OHSS patogenezi hala kesin olarak aydınlatılmamış olsa da patogenezinde özellikle VEGF, renin anjiotensin sistemi ve bazı sitokinlerin varlığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [9, 10, 98, 100]. Bu çalışmamızda ratlarda deneysel OHSS modeli oluşturularak melatoninin ovaryum üzerinde histomorfolojik ve biyokimyasal etkileri değerlendirildi.

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonda uygulanan protokoller ile döllenme kapasitesine sahip bir veya daha fazla olgun oosit elde etmek planlanmaktadır. Tedavi esnasında uyarılan folliküller sayı olarak artarken ovaryum ağırlığı da buna paralel olarak artar. OHSS’de ovaryum ağırlıklarının çok daha fazla arttığı gösterilmiştir [138]. Şiddetli OHSS’de ise vücut ağırlığında da artış olduğu bildirilmiştir [200]. Vücut ağırlıklarındaki değişikliklerin OHSS patolojisinden bağımsız olarak değerlendirildiği bu çalışmamızda en fazla ağırlık artışı görülen grup kontrol grubu idi. Grupların karşılaştırmasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Vücut ağırlıklarının artışı OHSS’nin şiddeti ile alakalı olduğundan OHSS modeli oluşturduğumuz grupta vücut ağırlığının çok artmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda ortalama ovaryum ağırlıklarının incelenmesinde

ovaryum ağırlığı en fazla OHSS grubuna aitti ve bu ağırlık artışı diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur.

KOH'da uygulanan ovulasyon indüksiyonunun amacı dölenebilecek bir veya daha fazla sağlıklı oosit elde etmektir. Bu tedavi nedeniyle komplikasyon olarak gelişen OHSS'de ise ovaryum hacmi, özellikle antral ve atretik follikül sayıları ile korpus luteum sayılarının arttığı gösterilmiştir [82, 117]. Bu bulgular OHSS patogenezinde hem neden hem de sonuç olarak görülmektedir. Özellikle KOH'da antrum oluşmuş follikül sayılarının (sekonder ve graaf follikülü) 20'den fazla olması, oosit toplama işlemi esnasında ise 25 follikül ve fazlası ile toplanan oositin 24'ten fazla olması OHSS lehine yorumlanır [85, 142]. Bu durumun gözden kaçması ile bireylerde OHSS tablosu meydana gelmekte, ovaryum hacmi ve ağırlığındaki artış ile artan kistik follikül sayıları ve bu kistik folliküllerin rüptürü sonucu abdominal distansiyon oluşmaktadır [5]. Bu parametrelerin OHSS'nin önlenmesi ve oluşuktan sonraki klinik takibi için yapılan çalışmalarda serum estradiol düzeylerinden daha anlamlı olduğu görülmüştür [80]. Bu nedenle deneyimizde tüm gruplardaki deneklerin ovaryan follikülleri histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir. OHSS modeli oluşturduğumuz grupta kistik follikül, atretik follikül, korpus luteum sayılarının çok arttığı görülmüştür. Kistik folliküllerin bazen dev boyutlara ulaşip dejenere olarak rüptüre olduğu ve ovaryum bütünlüğünü bozduğu, artan korpus luteum sayısı ve büyüklüğü nedeniyle de medullanın küçüldüğü gözlenmiştir.

Folikül gelişimi sırasında büyüyen folliküllerin granüloza hücrelerinde oluşan aşırı Bcl-2 ekspresyonu transgenik farelerde apoptozisi azaltmıştır [179]. Benzer şekilde serbest radikaller atretik folliküllerde apoptotik kaskadın aktivasyonunu tetiklemektedir [180]. Büyüyen insan follikülündeki FS melatonin konsantrasyonundaki artışın atreziden kaçınmada önemli bir faktör olduğuna inanılmaktadır [27], çünkü bu sınıfta bulunan melatonin kritik hücrelerin apoptozunu azaltmakta, preovuluar folliküllerin tam olarak gelişmesine izin vermekte ve ovulasyon için olgun oositler sağlamaktadır [189]. Birkaç çalışmada melatoninin antral folliküllerdeki etkileri, örneğin seks steroid üretiminin düzenlenmesi, LH mRNA ekspresyonu, Bcl2 ve kaspaz 3 üretimi ve insülin benzeri büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta aktivitesi üzerine etkileri tanımlamıştır [27, 166, 188]. Melatonin ayrıca, sıçan dokularında [190] hem CuZnSOD hem de MnSOD için mRNA seviyelerini, insan endotel hücrelerinde GSH sentezini [165] artırmakta ve Bcl-2 ekspresyonunu indükleyerek ve kaspaz 3 aktivitesini azaltarak apoptozisin intrinsik mitokondriyal yolağının indüksiyonunu önlemektedir. Bu etkilerin hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu ve sıçanlarda hücre çoğalmasını düzenlediği gözlenmiştir [191]. Yaptığımız çalışmada histomorfometrik olarak tüm gruplardaki sıçan ovaryumlarının incelenmesinde sekonder, Graaf ve atretik follikül sayıları değerlendirildi. Melatonin uygulanan OHSS grubundaki sekonder ve Graaf follikül sayısı artmışken, atretik follikül sayıları OHSS grubu ile karşılaştırıldığında azalmıştır. Bu bulgu melatoninin intrafolliküler seviyesinin artmasına bağlı olarak follikülleri apoptozisten koruduğunu desteklemektedir.

OHSS grubundaki kistik follikülerin sayısı, melatonin uygulanmış OHSS grubundakinden daha fazla olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. OHSS grubundaki kistik folliküllerin aşırı boyutlara ulaşması, içinde kanama odakları olması ve rüptüre olmaları nedeni ile sayım işlemi oldukça güçtü. Oysa melatonin uygulanan OHSS grubunda bu kistik yapıların daha küçük boyutlarda, antral içeriği boşalmış, büzüşmüş ve ovaryumun yapısına zarar vermeyecek şekilde olduğu aynı zamanda atreziye giden follikül sayılarında da anlamlı azalma olduğu gözlemlendi. Bu sonuç ile melatoninin, var olan follikül ve oositleri koruduğu, OHSS'de oluşan kistik yapıların morfolojisinde de bir onarım rolü üstlendiğini düşünebiliriz. FS'de bulunan melatoninin serbest radikalleri ortadan kaldırması, antioksidan enzimleri uyarması ve granüloza hücreleri tarafından seks steroid hormonu üretimini teşvik etmesi gibi etkileri vardır [163]. Follikülogenezde olduğu gibi, melatonin farklı luteal aşamalarda çeşitli işlevlere sahiptir. Büyük folliküllerdeki yüksek melatonin konsantrasyonu progesteron üretimi ile sonuçlanan uygun lüteinizasyon ile ilişkilendirilmiştir. Melatonin, steroidogenez yolağında önemli bir ikinci haberci olan cAMP'yi inhibe ederek steroidogenez baskılamaktadır [27]. İnsanda, preovuluar folliküldeki melatonin seviyelerinin artması, luteinize granüloza hücrelerini oksidatif stresten korur, böylece oksidatif stres luteal fonksiyonu inhibe ettiğinden, sonraki korpus luteumun erken luteolizini önlemektedir [199]. Ayrıca melatonin, PGF2a'nın sentezleyici enzimi olan ve progesteron üretimi ve luteal işlevi sürdürmek için gerekli olan siklooksijenaz-2 gen ekspresyonunu inhibe etmektedir [27]. Melatonin ve türevlerinin doğrudan etkisinin yanı sıra, bu indol ayrıca dolaylı

olarak korpus luteumu da korumaktadır [27, 203]. Bu nedenle, FS'deki melatonin konsantrasyonu da OHSS'nin öngörülmesinde faydalı olabilir. OHSS'yi öngörmede kullanılan diğer parametreler (serum E2 düzeyi, follikül sayısı, vb.) gibi melatoninin de potansiyel klinik değeri gösterilmiştir [201]. Melatonin uygulanmış OHSS grubundaki korpus luteum artışı ile atretik follikül sayısındaki azalış ise melatonin ve türevlerinin hem steroidogenezi baskılaması ile hem de siklooksijenaz-2 gen ekspresyonu üzerinden var olan korpus luteumları koruması ile açıklanabilir. Ayrıca, melatoninin oositlerin olgunlaşmasını ve sayısını arttırabileceği bildirilmiştir [202]. Ovaryan cevabı yüksek olan hastalarda da yüksek melatonin konsantrasyonu tespit edilmiştir [203].

OHSS patogenezinin sorumlu olduğu düşünülen VEGF'nin ovaryan folliküllerin aşırı uyarılması sonucu artmış follikül sayıları ve çapları nedeniyle aşırı eksprese olduğu ve OHSS'li hastalardan alınan asit sıvısında yüksek konsantrasyonlarda VEGF bulunduğu gösterilmiştir [90, 138]. KOH protokolünde uygulanan hCG'nin özellikle VEGF'yi arttırdığı, VEGF'nin de vaskülarizasyon artışı ve kapiller geçirgenlik artışına neden olarak intravasküler ortamdaki sıvının üçüncü boşluklara kaçıışı ile klinik tablonun oluşmasına büyük katkı sağladığı bildirilmiştir [96]. İmmünohistokimyasal olarak, teka hücreleri, granüloza hücreleri ve stroma hücrelerinde VEGF immünreaktivitesinin arttığı gösterilmiştir [200]. VEGF artışının patogeneizde yer alan renin anjiyotensin sistemini uyardığı ve sitokin salınımını arttırdığı bilinmektedir [83, 135]. Çalışmamızda değerlendirilen peritoneal aspirat sıvılarındaki VEGF düzeylerinin diğer

çalışmaların sonuçları ile korele biçimde, OHSS grubunda anlamlı olarak arttığı görüldü. Melatonin uygulanmış OHSS grubunda ise VEGF seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. VEGF seviyesinin yüksek ölçüldüğü OHSS grubunun histolojik incelemesinde korpus luteum ve kistik follüküllerin sayısının ve boyutlarının artması nedeniyle medullanın daralmış olduğu, vaskülarize alanların arttığı ve ovaryumun hemen her yerinde hemorajik alanlar olduğu tespit edildi. OHSS modeli oluşturulan sıçanlarda antral follüküllerin granüloza hücrelerinde VEGF seviyelerinin arttığı bildirilmiştir [200]. Başka bir çalışmada ise VEGF'nin esas kaynağının ovaryum olduğu gösterilmiş ve VEGFR-2 inhibitörünün vasküler geçirgenliği azalttığı bildirilmiştir [95]. Yapılan diğer bir çalışmada OHSS'de FS'de melatonin seviyelerinin VEGF seviyeleri ile korele olarak arttığı ortaya koyulmuştur. Aynı çalışmada melatoninin, MT-2 reseptörü aracılığı ile AKT sinyalini aktive ettiği ve VEGF ekspresyonunun melatoninle indüklendiği gösterilmiştir. Ek olarak melatoninin bloke edilmesiyle OHSS oluşturulmuş sıçan ovaryumlarında VEGF ekspresyonunun zayıfladığı ve OHSS semptomlarının kısmen azaldığı bildirilmiştir [204]. Başka bir çalışmada ekzojen uygulanan melatonin tedavisinin sıçan ovaryumlarında VEGF ve VEGF-1 ekspresyonunu anlamlı bir şekilde artırdığı gözlemlenmiştir [205]. OHSS hastalarının granüloza hücrelerinde MT2 ekspresyonunun daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum melatonin ve reseptörünün OHSS'nin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir [201]. MT2'nin PKOS ve vasküler geçirgenlikle yakından bağlantılı olduğu bildirilmiştir [206, 207]. VEGF-A ve VEGF-C immünreaktivitelerinin deney gruplarında karşılaştırmalı olarak incelendiği

çalışmamızda, tüm gruplardaki ovaryumlarda VEGF immünreaktivitesi değişen oranlarda görülmekle birlikte OHSS grubunda tutulumun daha belirgin olduğu görüldü. Medullar bölgede kan damarları çevresinde, stromal hücreler, sekonder ve olgun folliküllerin granüloza hücreleri ve etrafındaki teka tabakaları hücrelerinde immünreaktivite daha fazla gözlemlendi. Buna karşın melatonin uygulanmış OHSS grubunda ise VEGF tutulumunun OHSS grubuna göre azaldığı görüldü.

KOH'da uygulanan tedavi protokollerinde özellikle gonadotropin ile indüklenmiş hastaların kan estradiol seviyelerinde anlamlı artış saptanmıştır [87]. Fakat OHSS patogenezinde bu seviyelerin çok daha fazla arttığı ve hatta kan estradiol seviyelerinin OHSS'nin önlenmesi ve OHSS tedavisinin izleminde önemli bir parametre olduğu bilinmektedir [142]. Çalışmamızda OHSS grubu serum estradiol seviyelerinin belirgin olarak arttığı görülmüştür. Melatoninin OHSS modeli oluşturulmuş gruptaki peritoneal sıvıdaki artmış VEGF ve IL-6 seviyeleri ile kan serumundaki E2 düzeylerini anlamlı ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir.

OHSS patogenezinde yer alan ve son yıllarda üzerinde daha çok çalışma yapılan diğer bir konu ise bazı sitokinlerdir. Özellikle IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-a ve diğer bazı sitokinlerin artmış kapiller geçirgenlik, ovaryan neovaskülarizasyon, enflamatuvar yanıt ve hepatik albümin üretimini azaltarak patogenezi etkilediği anlaşılmıştır [15, 123-125, 127, 128, 131]. Çalışmamızda

peritoneal aspiratta IL-6 düzeylerinin OHSS grubunda Kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiştir.

OHSS ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen bu sendromun melatonin ile ilişkisi ve ekzojen olarak uygulanan melatoninin ovaryumlar üzerindeki etkisini konu alan çalışma oldukça az sayıdadır. Çalışmamızda ekzojen uygulanan melatoninin biyokimyasal parametreler, ovaryum histolojisi, follikül gelişimi, ovulasyon indüksiyonu üzerine genel olarak olumlu etkileri olduğu görülmüştür. Ancak melatoninin etki mekanizmalarının aydınlatılması anlamında daha ileri çalışmaların planlanmasının da uygun olacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

OHSS hakkında yapılan diğer çalışmalar incelenerek çalışmamızda sıçanlarda deneysel OHSS modeli oluşturulmuştur ve hem OHSS patogenezinin sorumlu olduğu düşünülen IL-6, VEGF, E2 gibi parametreler hem de OHSS oluşturulmuş modelde melatoninin ovaryumlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. İnfertilite tedavisinde kullanılan ovulasyon indüksiyonundaki amacın döllenme kapasitesi yüksek oositler elde etmek olduğu düşünüldüğünde, indüksiyonda kullanılan hCG miktarı ile tetiklenen kimi zaman hayatı tehdit edecek klinik semptomlara yol açan OHSS'nin patogenezi, önlenmesi ve tedavisi için bu çalışmanın yararlı olabileceği düşünülmüştür. Yaptığımız deneysel çalışmada rastgele seçilmiş ratlarla deneysel olarak kontrol, KOH, OHSS ve melatonin uygulanmış OHSS grupları oluşturulmuştur. Histomorfometrik olarak deney grupları arasında ovaryum çapları, sekonder (antral), Graafian (olgun), atretik ve kistik folliküller ile korpus luteum sayıları değerlendirilmiştir. Her deney grubundaki sıçanların deneyin ilk günü ve son günü vücut ağırlıkları ölçülmüştür. İmmunohistokimyasal olarak tüm deney grupları arasında VEGF A ve VEGF C tutulumları değerlendirilmiştir. Alınan kan ve peritoneal aspirat sıvılarından E2 ile IL-6 ve VEGF düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Follikülogenezis sırasında ve ovulasyon indüksiyonunda folliküler sıvıda artmış olarak bulunan melatoninin ekzojen olarak verilmesi durumunda OHSS modeli oluşmuş sıçan ovaryumlarında olgun follikülleri arttırdığı, atretik follikülleri anlamlı olarak azalttığı, korpus luteum sayılarını arttırdığı gösterilmiştir. Yine KOH ve OHSS gruplarında peritoneal aspirat sıvısındaki ileri derecede artmış VEGF ve IL-6

seviyelerini azalttığı ortaya çıkmıştır. Kan örneklerinden ölçülen E2 seviyelerini de anlamlı olarak düşürdüğü gözlenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda ekzojen uygulanan melatoninin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliği nedeniyle biyokimyasal parametreler, ovaryum histolojisi, follikül gelişimi ve ovulasyon üzerine olumlu etkileri olduğu görülmüştür. Melatoninin OHSS'nin önlenmesi ve tedavisine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Literatürde OHSS ve melatonin ilişkisi bakımından kısıtlı sayıda çalışma olmasından dolayı OHSS patogenezi ve klinik seyrinde melatonin etkisi ile ilgili çalışmalara daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Selter, J., et al., *Life-threatening complications among women with severe ovarian hyperstimulation syndrome*. American journal of obstetrics and gynecology, 2019. **220**(6): p. 575. e1-575. e11.
2. Sutcliffe, A.G. and M. Ludwig, *Outcome of assisted reproduction*. The Lancet, 2007. **370**(9584): p. 351-359.
3. Roque, M., et al., *Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer*. Fertility and sterility, 2015. **103**(5): p. 1190-1193.
4. Rova, K., H. Passmark, and P.G. Lindqvist, *Venous thromboembolism in relation to in vitro fertilization: an approach to determining the incidence and increase in risk in successful cycles*. Fertility and sterility, 2012. **97**(1): p. 95-100.
5. Delvigne, A. and S. Rozenberg, *Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(1): p. 77-96.
6. Thomsen, L. and P. Humaidan, *Ovarian hyperstimulation syndrome in the 21st century: the role of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger and kisspeptin*. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 2015. **27**(3): p. 210-214.
7. Humaidan, P., et al., *Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials*. Human Reproduction, 2016. **31**(9): p. 1997-2004.
8. Pfeifer, S., et al., *Optimizing natural fertility: a committee opinion*. Fertility and Sterility, 2017. **107**(1): p. 52-58.
9. Kwik, M. and E. Maxwell, *Pathophysiology, treatment and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2016. **28**(4): p. 236-41.
10. Nelson, S.M., *Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome*. Thrombosis research, 2017. **151**: p. S61-S64.
11. Blumenfeld, Z., *The ovarian hyperstimulation syndrome*, in *Vitamins and hormones*. 2018, Elsevier. p. 423-451.
12. Delbaere, A., et al., *Increased angiotensin II in ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome: role of early pregnancy and ovarian gonadotropin stimulation*. Fertil Steril, 1997. **67**(6): p. 1038-45.
13. Kumar, P. and S.F. Sait, *Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction*. J Hum Reprod Sci, 2011. **4**(1): p. 2-7.
14. Orvieto, R., et al., *Interleukin-2 and SOCS-1 proteins involvement in the pathophysiology of severe ovarian hyperstimulation syndrome-a preliminary proof of concept*. Journal of ovarian research, 2014. **7**(1): p. 106.
15. Shi, S.-L., et al., *Expression of CD11c+ HLA-DR+ dendritic cells and related cytokines in the follicular fluid might be related to pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome*. International journal of clinical and experimental pathology, 2015. **8**(11): p. 15133.

16. Field, S.L., et al., *Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation*. *Molecular reproduction and Development*, 2014. **81**(4): p. 284-314.
17. Chen, S.-U., et al., *Signal mechanisms of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian hyperstimulation syndrome: dopamine targets their common pathways*. *Human reproduction*, 2010. **25**(3): p. 757-767.
18. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nature reviews cancer*, 2003. **3**(6): p. 401-410.
19. Romeu, L.R.G., et al., *Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF, and PCNA in ovaries of pinealectomized female rats*. *Fertility and sterility*, 2011. **95**(4): p. 1379-1384.
20. Albert, C., et al., *The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome*. *Molecular Human Reproduction*, 2002. **8**(5): p. 409-418.
21. Watanabe, T., et al., *Gene expression signature for recurrence in stage III colorectal cancers*. *Cancer*, 2009. **115**(2): p. 283-292.
22. Abramov, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome*. *Fertility and Sterility*, 1997. **67**(2): p. 261-265.
23. Chen, C.-D., et al., *Relationships of serum pro-inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor with liver dysfunction in severe ovarian hyperstimulation syndrome*. *Human Reproduction*, 2000. **15**(1): p. 66-71.
24. Tamura, H., et al., *Melatonin and female reproduction*. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2014. **40**(1): p. 1-11.
25. Schlabritz-Loutsevitch, N., et al., *The human myometrium as a target for melatonin*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003. **88**(2): p. 908-913.
26. Woo, M.M., et al., *Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001. **86**(10): p. 4789-4797.
27. Tamura, H., et al., *Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications*. *Fertil Steril*, 2009. **92**(1): p. 328-43.
28. Kandemir, Y.B., C. Aydin, and G. Gorgisen, *The effects of melatonin on oxidative stress and prevention of primordial follicle loss via activation of mTOR pathway in the rat ovary*. *Cell. Mol. Biol.(Noisy le Grand)*, 2017. **63**: p. 100-106.
29. Sadler, T.W., *Langman's medical embryology*. 2018: Lippincott Williams & Wilkins.
30. Oktem, O. and B. Urman, *Understanding follicle growth in vivo*. *Human reproduction*, 2010. **25**(12): p. 2944-2954.
31. Yoshino, T. and D. Saito. *Epithelial-to-mesenchymal transition-based morphogenesis of dorsal mesentery and gonad*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2019. Elsevier.

32. Seidman, J.D., et al., *Surface epithelial tumors of the ovary*, in *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 2002.
33. Russell, P., *Common epithelial tumours of the ovary—a new look*. 1985, Taylor & Francis.
34. M., G. *Embryology ovary*. 2020 [cited 2020 August 21st]; Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/ovarynontumorembryology.html>.
35. Clement, P.B., *Anatomy and histology of the ovary*, in *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 1987, Springer. p. 438-470.
36. REEVES, G., *Specific stroma in the cortex and medulla of the ovary: cell types and vascular supply in relation to follicular apparatus and ovulation*. *Obstetrics & Gynecology*, 1971. **37**(6): p. 832-844.
37. Ying, J., et al., *Can ovaries be preserved after an ovarian arteriovenous disconnection? One case report and a review of surgical treatment using Da Vinci robots for aggressive ovarian fibromatosis*. *Journal of Ovarian Research*, 2019. **12**(1): p. 52.
38. Sternberg, S.S., *Histology for pathologists*. 1997, Philadelphia (PA); New York (N.Y.): Lippincott-Raven. 929-959.
39. Hallas-Potts, A., J.C. Dawson, and C.S. Herrington, *Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 1-10.
40. Pawlina, W. and M.H. Ross, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 2018: Lippincott Williams & Wilkins.
41. Del Campo, M., et al., *Effect of superior ovarian nerve and plexus nerve sympathetic denervation on ovarian-derived infertility provoked by estradiol exposure to rats*. *Frontiers in physiology*, 2019. **10**: p. 349.
42. Richards, J.S. and S.A. Pangas, *The ovary: basic biology and clinical implications*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(4): p. 963-72.
43. Fujisawa, M., et al., *Ovarian stromal cells as a source of cancer-associated fibroblasts in human epithelial ovarian cancer: A histopathological study*. *PLoS One*, 2018. **13**(10): p. e0205494.
44. Drummond, A.E., *The role of steroids in follicular growth*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006. **4**: p. 16.
45. Hirshfield, A.N., *Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist*. *Environ Mol Mutagen*, 1997. **29**(1): p. 10-5.
46. Macklon, N.S. and B.C. Fauser, *Follicle development during the normal menstrual cycle*. *Maturitas*, 1998. **30**(2): p. 181-8.
47. Macklon, N.S. and B.C. Fauser, *Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human*. *Arch Med Res*, 2001. **32**(6): p. 595-600.
48. Sun, Y.C., et al., *The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances*. *Int J Biol Sci*, 2017. **13**(4): p. 449-457.

49. Hillier, S.G., *Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **179**(1-2): p. 39-46.
50. Williams, C.J. and G.F. Erickson, *Morphology and Physiology of the Ovary*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2020, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
51. Barnett, K.R., et al., *Ovarian follicle development and transgenic mouse models*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(5): p. 537-55.
52. Gilbert, R.O., *Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract*. J Dairy Sci, 2019. **102**(4): p. 3754-3765.
53. Kara, E., et al., *Modulation of Gonadotropins Activity by Antibodies*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 15.
54. Laven, J.S.E., *Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Polymorphisms and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 23.
55. Reed, B.G. and B.R. Carr, *The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2020, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
56. Hamilton-Fairley, D. and A. Taylor, *Anovulation*. BMJ (Clinical research ed.), 2003. **327**(7414): p. 546-549.
57. Dosouto, C., T. Haahr, and P. Humaidan, *Advances in ovulation trigger strategies*. Panminerva Med, 2019. **61**(1): p. 42-51.
58. Pundir, J., et al., *Overview of systematic reviews of non-pharmacological interventions in women with polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod Update, 2019. **25**(2): p. 243-256.
59. Mansfield, M.J. and S.J. Emans, *Adolescent menstrual irregularity*. J Reprod Med, 1984. **29**(6): p. 399-410.
60. Mikhael, S., A. Punjala-Patel, and L. Gavrilova-Jordan, *Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Disorders Impacting Female Fertility*. Biomedicines, 2019. **7**(1).
61. Weiss, N.S., et al., *Gonadotrophins for ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome*. Cochrane Database Syst Rev, 2019. **1**(1): p. Cd010290.
62. Morin-Papunen, L., et al., *Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(5): p. 1492-500.
63. *Use of clomiphene citrate in women*. Fertil Steril, 2006. **86**(5 Suppl 1): p. S187-93.
64. Diamond, M.P., et al., *Endometrial shedding effect on conception and live birth in women with polycystic ovary syndrome*. Obstet Gynecol, 2012. **119**(5): p. 902-8.
65. Lobo, R.A., et al., *An extended regimen of clomiphene citrate in women unresponsive to standard therapy*. Fertil Steril, 1982. **37**(6): p. 762-6.

66. Imani, B., et al., *Predictors of chances to conceive in ovulatory patients during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(5): p. 1617-22.
67. Imani, B., et al., *A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility*. Fertil Steril, 2002. **77**(1): p. 91-7.
68. Guzick, D.S., et al., *Efficacy of treatment for unexplained infertility*. Fertil Steril, 1998. **70**(2): p. 207-13.
69. Sanner, K., et al., *Ovarian epithelial neoplasia after hormonal infertility treatment: long-term follow-up of a historical cohort in Sweden*. Fertil Steril, 2009. **91**(4): p. 1152-8.
70. Zreik, T.G., et al., *Fertility drugs and risk of ovarian cancer: dispelling the myth*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008. **20**(3): p. 313-9.
71. Gerli, S., et al., *Recombinant versus urinary follicle-stimulating hormone in intrauterine insemination cycles: a prospective, randomized analysis of cost effectiveness*. Fertility and sterility, 2004. **82**(3): p. 573-578.
72. Gerli, S., et al., *Ovulation induction with urinary FSH or recombinant FSH in polycystic ovary syndrome patients: a prospective randomized analysis of cost-effectiveness*. Reproductive BioMedicine Online, 2004. **9**(5): p. 494-499.
73. AR., G., *Ovulation induction*, in *Imaging of the infertile couple*, B.C. Goldstein SR, Editor. 2001, Martin Dunitz: London, UK. p. 143–160.
74. Land, J.A., et al., *High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome*. Fertility and sterility, 1996. **65**(5): p. 961-965.
75. Chang, P., et al., *Recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in assisted reproductive technology: results of a clinical trial comparing two doses of rhCG (OvidrelR) to urinary hCG (ProfasiR) for induction of final follicular maturation in in vitro fertilization–embryo transfer*. Fertility and sterility, 2001. **76**(1): p. 67-74.
76. Claman, P., V. Wilkie, and D. Collins, *Timing intrauterine insemination either 33 or 39 hours after administration of human chorionic gonadotropin yields the same pregnancy rates as after superovulation therapy*. Fertility and sterility, 2004. **82**(1): p. 13-16.
77. Jayaprakasan, K., et al., *Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresholds in a prospective cohort of 1,012 women*. Fertil Steril, 2012. **98**(3): p. 657-63.
78. Kahnberg, A., et al., *Prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing in vitro fertilization*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2009. **88**(12): p. 1373-81.
79. Luke, B., et al., *Factors associated with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) and its effect on assisted reproductive technology (ART) treatment and outcome*. Fertil Steril, 2010. **94**(4): p. 1399-1404.
80. Papanikolaou, E.G., et al., *Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin-releasing*

- hormone antagonist in vitro fertilization cycles.* Fertil Steril, 2006. **85**(1): p. 112-20.
81. Steward, R.G., et al., *Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome and live birth: an analysis of 256,381 in vitro fertilization cycles.* Fertil Steril, 2014. **101**(4): p. 967-73.
 82. Geva, E. and R.B. Jaffe, *Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology.* Fertil Steril, 2000. **74**(3): p. 429-38.
 83. Levin, E.R., et al., *Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome.* J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 1978-85.
 84. Neulen, J., et al., *Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(6): p. 1967-71.
 85. Pellicer, A., et al., *The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor.* Fertil Steril, 1999. **71**(3): p. 482-9.
 86. Whelan, J.G., 3rd and N.F. Vlahos, *The ovarian hyperstimulation syndrome.* Fertil Steril, 2000. **73**(5): p. 883-96.
 87. Revel, A., et al., *Characterization of intraperitoneal cytokines and nitrites in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome.* Fertil Steril, 1996. **66**(1): p. 66-71.
 88. Bergh, P.A. and D. Navot, *Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology.* J Assist Reprod Genet, 1992. **9**(5): p. 429-38.
 89. Goldsman, M.P., et al., *Increased capillary permeability induced by human follicular fluid: a hypothesis for an ovarian origin of the hyperstimulation syndrome.* Fertil Steril, 1995. **63**(2): p. 268-72.
 90. Abramov, Y., U. Elchalal, and J.G. Schenker, *Severe OHSS: An 'epidemic' of severe OHSS: a price we have to pay?* Hum Reprod, 1999. **14**(9): p. 2181-3.
 91. Golan, A., et al., *Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review.* Obstet Gynecol Surv, 1989. **44**(6): p. 430-40.
 92. Aboulghar, M.A. and R.T. Mansour, *Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures.* Hum Reprod Update, 2003. **9**(3): p. 275-89.
 93. Morris, R.S., et al., *Inhibition of ovarian-derived prorenin to angiotensin cascade in the treatment of ovarian hyperstimulation syndrome.* Hum Reprod, 1995. **10**(6): p. 1355-8.
 94. McClure, N., et al., *Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome.* Lancet, 1994. **344**(8917): p. 235-6.
 95. Soares, S.R., et al., *Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome.* Hum Reprod Update, 2008. **14**(4): p. 321-33.

96. Pau, E., et al., *Plasma levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 may determine the onset of early and late ovarian hyperstimulation syndrome*. Hum Reprod, 2006. **21**(6): p. 1453-60.
97. Polishuk, W. and J. Schenker, *Ovarian overstimulation syndrome*. Fertility and Sterility, 1969. **20**(3): p. 443-450.
98. Navot, D., et al., *Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome*. Fertility and Sterility, 1987. **48**(1): p. 57-61.
99. Kwik, M. and E. Maxwell, *Pathophysiology, treatment and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome*. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 2016. **28**(4): p. 236-241.
100. Tollan, A., et al., *Transcapillary fluid dynamics during ovarian stimulation for in vitro fertilization*. American journal of obstetrics and gynecology, 1990. **162**(2): p. 554-558.
101. Miller, I., et al., *The dual role of PEDF in the pathogenesis of OHSS: negating both angiogenic and inflammatory pathways*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016. **101**(12): p. 4699-4709.
102. Sealey, J.E., S.A. Atlas, and J.H. Laragh, *Prorenin and other large molecular weight forms of renin*. Endocr Rev, 1980. **1**(4): p. 365-91.
103. Palumbo, A., J. Ávila, and F. Naftolin, *The Ovarian Renin-Angiotensin System (OVRAS): A Major Factor in Ovarian Function and Disease*. Reprod Sci, 2016. **23**(12): p. 1644-1655.
104. Hofmann, G.E., et al., *Endometrial thickness is predictive of histologic endometrial maturation in women undergoing hormone replacement for ovum donation*. Fertil Steril, 1996. **66**(3): p. 380-3.
105. Glorioso, N., et al., *Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid*. Science, 1986. **233**(4771): p. 1422-4.
106. Sealey, J.E., et al., *Cyclical secretion of prorenin during the menstrual cycle: synchronization with luteinizing hormone and progesterone*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(24): p. 8705-8709.
107. Sealey, J.E., S.A. Atlas, and J.H. Laragh, *Prorenin and other large molecular weight forms of renin*. Endocrine Reviews, 1980. **1**(4): p. 365-391.
108. Palumbo, A., J. Ávila, and F. Naftolin, *The Ovarian Renin–Angiotensin System (OVRAS) A Major Factor in Ovarian Function and Disease*. Reproductive Sciences, 2016. **23**(12): p. 1644-1655.
109. Fernandez, L.A., et al., *Renin-like activity in ovarian follicular fluid*. Fertility and sterility, 1985. **44**(2): p. 219-223.
110. Blumenfeld, Z., N. Yoffe, and M. Bronshtein, *Transvaginal sonography in infertility and assisted reproduction*. Obstetrical & gynecological survey, 1991. **46**(1): p. 36-49.
111. Ong, A., et al., *The pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome (OHS): a possible role for ovarian renin*. Clinical endocrinology, 1991. **34**(1): p. 43-49.

112. CULLER, M.D., et al., *Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1986. **62**(3): p. 613-615.
113. Fernandez, L.A., J. Twickler, and A. Mead, *Neovascularization produced by angiotensin II*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1985. **105**(2): p. A2.
114. Robertson, A.L. and P.A. Khairallah, *Effects of angiotensin II and some analogues on vascular permeability in the rabbit*. Circulation Research, 1972. **31**(6): p. 923-931.
115. Yoshimura, Y., et al., *Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries*. Endocrinology, 1993. **133**(4): p. 1609-1616.
116. McClure, N., et al., *Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome*. The Lancet, 1994. **344**(8917): p. 235-236.
117. Revel, A., et al., *Characterization of intraperitoneal cytokines and nitrites in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome*. Fertility and sterility, 1996. **66**(1): p. 66-71.
118. Kumar, P., et al., *Ovarian hyperstimulation syndrome*. Journal of human reproductive sciences, 2011. **4**(2): p. 70.
119. Hume, D.A., et al., *The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(13): p. 4174-4177.
120. Nakamura, Y., et al., *Increased number of mast cells in the dominant follicle of the cow: relationships among luteal, stromal, and hilar regions*. Biology of reproduction, 1987. **37**(3): p. 546-549.
121. LOUKIDES, J.A., et al., *Human follicular fluids contain tissue macrophages*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1990. **71**(5): p. 1363-1367.
122. Zolti, M., et al., *Cytokine involvement in oocytes and early embryos*. Fertility and sterility, 1991. **56**(2): p. 265-272.
123. Mori, T., et al., *Modulation of porcine granulosa cell functions by interleukin-1*. Steroids, 1989. **54**(5): p. 543-552.
124. Gottschall, P.E., G. Katsuura, and A. Arimura, *Interleukin-1 beta is more potent than interleukin-1 alpha in suppressing follicle-stimulating hormone-induced differentiation of ovarian granulosa cells*. Biochemical and biophysical research communications, 1989. **163**(2): p. 764-770.
125. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism*. 1991.
126. Motro, B., et al., *Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(8): p. 3092-3096.
127. Geva, E., et al., *Elevated levels of interleukin-6 in the follicular fluid at the time of oocyte retrieval for in vitro fertilization may predict the development of early-form ovarian hyperstimulation syndrome*. Fertility and sterility, 1997. **68**(1): p. 133-137.

128. Funke, L., et al., *Capillary leak syndrome associated with elevated IL-2 serum levels after allogeneic bone marrow transplantation*. *Annals of hematology*, 1994. **68**(1): p. 49-52.
129. MJ, E., Finn AH. *Interaction between neutrophils and endotheli—um*. *Ann Thor (7~ c Surg*, 1993, 56 (6): 1503—1508.
130. Burke-Gaffney, A., T. Flood, and A. Keenan, *Cytokine Modulation of Adult and Neonatal Leukocyte Adherence to Vascular Endothelium*, in *Vascular Endothelium*. 1993, Springer. p. 155-156.
131. Chistyakova, G., et al., *Immunological and hemostasiological disorders in women with ovarian hyperstimulation syndrome*. *Gynecological Endocrinology*, 2014. **30**(sup1): p. 39-42.
132. Naz, R.K., D. Thurston, and N. Santoro, *Circulating tumor necrosis factor (TNF)- α in normally cycling women and patients with premature ovarian failure and polycystic ovaries*. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1995. **34**(3): p. 170-175.
133. Larsen, C.G., et al., *The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes*. *Science*, 1989. **243**(4897): p. 1464-1466.
134. Goldsman, M.P., et al., *Increased capillary permeability induced by human follicular fluid: a hypothesis for an ovarian origin of the hyperstimulation syndrome*. *Fertility and sterility*, 1995. **63**(2): p. 268-272.
135. Krasnow, J.S., et al., *Vascular permeability factor and vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome: a preliminary report*. *Fertility and sterility*, 1996. **65**(3): p. 552-555.
136. Levin, E.R., et al., *Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome*. *The Journal of clinical investigation*, 1998. **102**(11): p. 1978-1985.
137. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. *Endocrine reviews*, 1997. **18**(1): p. 4-25.
138. Chuderland, D., et al., *The role of pigment epithelium-derived factor in the pathophysiology and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome in mice*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013. **98**(2): p. E258-E266.
139. Miller, I., et al., *GnRH agonist triggering modulates PEDF to VEGF ratio inversely to hCG in granulosa cells*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015. **100**(11): p. E1428-E1436.
140. Crowth, S.E., et al., *The many facets of PEDF in drug discovery and disease: a diamond in the rough or split personality disorder? Expert opinion on drug discovery*, 2013. **8**(7): p. 769-792.
141. Ninio-Many, L., et al., *microRNA-125a-3p reduces cell proliferation and migration by targeting Fyn*. *Journal of cell science*, 2013. **126**(13): p. 2867-2876.
142. Medicine, P.C.o.t.A.S.f.R., *Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: a guideline*. *Fertility and sterility*, 2016. **106**(7): p. 1634-1647.

143. Toftager, M., et al., *Risk of severe ovarian hyperstimulation syndrome in GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol: RCT including 1050 first IVF/ICSI cycles*. Human Reproduction, 2016. **31**(6): p. 1253-1264.
144. Lainas, G., et al., *Pregnancy and neonatal outcomes following luteal GnRH antagonist administration in patients with severe early OHSS*. Human Reproduction, 2013. **28**(7): p. 1929-1942.
145. Garcia-Velasco, J.A., *How to avoid ovarian hyperstimulation syndrome: a new indication for dopamine agonists*. Reproductive biomedicine online, 2009. **18**: p. S71-S75.
146. Aboulghar, M., *Prevention of OHSS*. Reproductive biomedicine online, 2009. **19**(1): p. 33-42.
147. Tso, L.O., et al., *Metformin treatment before and during IVF or ICSI in women with polycystic ovary syndrome*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014(11).
148. Mai, Q., et al., *Effect of letrozole on moderate and severe early-onset ovarian hyperstimulation syndrome in high-risk women: a prospective randomized trial*. American journal of obstetrics and gynecology, 2017. **216**(1): p. 42. e1-42. e10.
149. Álvarez, C., et al., *Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(8): p. 2931-2937.
150. Wong, K.M., S. Mastenbroek, and S. Repping, *Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates*. Fertility and sterility, 2014. **102**(1): p. 19-26.
151. of the American, T.P.C., *In vitro maturation: a committee opinion*. Fertility and Sterility, 2013. **99**(3): p. 663-666.
152. Siristatidis, C.S., et al., *In vitro maturation in subfertile women with polycystic ovarian syndrome undergoing assisted reproduction*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2018(11).
153. Hardeland, R., et al., *Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 350-84.
154. Reiter, R.J., et al., *Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 238-50.
155. Barrett, P. and M. Bolborea, *Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin*. J Pineal Res, 2012. **52**(4): p. 376-88.
156. Reiter, R.J. and F. Fraschini, *Endocrine aspects of the mammalian pineal gland: a review*. Neuroendocrinology, 1969. **5**(3): p. 219-55.
157. Hardeland, R., *Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance*. Endocrine, 2005. **27**(2): p. 119-30.
158. Tan, D.X., et al., *Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger*. Curr Top Med Chem, 2002. **2**(2): p. 181-97.

159. Reiter, R.J., et al., *Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 7231-72.
160. Reiter, R.J., et al., *Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage*. Pol J Pharmacol, 2004. **56**(2): p. 159-70.
161. Urata, Y., et al., *Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(7-8): p. 838-47.
162. Tamura, H., et al., *The role of melatonin as an antioxidant in the follicle*. J Ovarian Res, 2012. **5**: p. 5.
163. Goud, A.P., et al., *Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(7): p. 1295-304.
164. Carlomagno, G., et al., *Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011. **159**(2): p. 267-72.
165. Reiter, R.J., et al., *Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence*. Cell Biochem Biophys, 2001. **34**(2): p. 237-56.
166. Vijayalaxmi, et al., *Melatonin as a radioprotective agent: a review*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **59**(3): p. 639-53.
167. Ferreira, S.G., et al., *Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats*. Braz J Med Biol Res, 2013. **46**(3): p. 278-86.
168. Sliwinski, T., et al., *Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair*. Mutat Res, 2007. **634**(1-2): p. 220-7.
169. Reiter, R.J., et al., *Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions*. Adv Med Sci, 2007. **52**: p. 11-28.
170. Cruz, M.H., et al., *Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage*. Theriogenology, 2014. **82**(7): p. 925-32.
171. Devine, P.J., S.D. Perreault, and U. Luderer, *Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity*. Biology of reproduction, 2012. **86**(2): p. 27, 1-10.
172. Al-Gubory, K.H., et al., *Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy*. Reproduction, 2004. **128**(6): p. 767-74.
173. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease*. Hum Toxicol, 1988. **7**(1): p. 7-13.
174. Hussein, T.S., et al., *Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 22): p. 5257-68.
175. Foghi, A., et al., *Fas-induced apoptosis in rat thecal/interstitial cells signals through sphingomyelin-ceramide pathway*. Endocrinology, 1998. **139**(4): p. 2041-7.

176. Savill, J. and V. Fadok, *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 784-8.
177. Ott, M., et al., *Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1259-63.
178. Hsu, S.Y., et al., *Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis*. Endocrinology, 1996. **137**(11): p. 4837-43.
179. Ptak, A., et al., *Induction of cytochromes P450, caspase-3 and DNA damage by PCB3 and its hydroxylated metabolites in porcine ovary*. Toxicol Lett, 2006. **166**(3): p. 200-11.
180. Brzezinski, A., et al., *Melatonin in human preovulatory follicular fluid*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(4): p. 865-7.
181. Nakamura, Y., et al., *Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production*. Fertil Steril, 2003. **80**(4): p. 1012-6.
182. Cruz, M.H., et al., *Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review*. Anim Reprod Sci, 2014. **145**(3-4): p. 150-60.
183. Rocha, R.M., et al., *Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes in vitro development of caprine preantral follicles*. Domest Anim Endocrinol, 2013. **44**(1): p. 1-9.
184. Tamura, H., et al., *Melatonin and pregnancy in the human*. Reprod Toxicol, 2008. **25**(3): p. 291-303.
185. Hockenbery, D.M., et al., *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 241-51.
186. Liu, F. and T.B. Ng, *Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues*. Biochem Cell Biol, 2000. **78**(4): p. 447-53.
187. Wang, F., et al., *Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine*. J Pineal Res, 2013. **55**(3): p. 267-74.
188. Woo, M.M., et al., *Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4789-97.
189. Reiter, R.J., et al., *Melatonin and reproduction revisited*. Biol Reprod, 2009. **81**(3): p. 445-56.
190. Sugino, N., et al., *Suppression of intracellular superoxide dismutase activity by antisense oligonucleotides causes inhibition of progesterone production by rat luteal cells*. Biol Reprod, 1999. **61**(4): p. 1133-8.
191. Lee, S., et al., *Role of nitric oxide in the regulation of superoxide dismutase and prostaglandin F(2alpha) production in bovine luteal endothelial cells*. J Reprod Dev, 2010. **56**(4): p. 454-9.
192. Rizzo, A., et al., *Roles of reactive oxygen species in female reproduction*. Reprod Domest Anim, 2012. **47**(2): p. 344-52.

193. Vu, H.V., et al., *Roles of prostaglandin F2alpha and hydrogen peroxide in the regulation of Copper/Zinc superoxide dismutase in bovine corpus luteum and luteal endothelial cells*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012. **10**: p. 87.
194. Espey, L.L., *Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction*. *Biol Reprod*, 1994. **50**(2): p. 233-8.
195. Taketani, T., et al., *Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells*. *J Pineal Res*, 2011. **51**(2): p. 207-13.
196. Minegishi, K., et al., *Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F2alpha -induced luteolysis in rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **283**(6): p. E1308-15.
197. Tamura, H., et al., *Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle*. *Endocr J*, 2013. **60**(1): p. 1-13.
198. Miyamoto, K., et al., *Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(4): p. 674-81.
199. Maganhin, C.C., et al., *Effects of melatonin on ovarian follicles*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013. **166**(2): p. 178-84.
200. Ozgur, S., et al., *The effects of resveratrol on ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model*. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2018. **57**(3): p. 383-388.
201. Li, Y., et al., *Higher melatonin in the follicle fluid and MT2 expression in the granulosa cells contribute to the OHSS occurrence*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2019. **17**(1): p. 37.
202. Loren, P., et al., *Melatonin scavenger properties against oxidative and nitrosative stress: impact on gamete handling and in vitro embryo production in humans and other mammals*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. **18**(6): p. 1119.
203. Tong, J., et al., *Melatonin levels in follicular fluid as markers for IVF outcomes and predicting ovarian reserve*. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2017. **153**(4): p. 443-451.
204. Li, Y., et al., *Melatonin stimulates VEGF expression in human granulosa-lutein cells: A potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020: p. 110981.
205. Kandemir, Y.B., et al., *Is the effect of melatonin on vascular endothelial growth factor receptor-2 associated with angiogenesis in the rat ovary?* *Clinics*, 2019. **74**.
206. Li, C., et al., *Association of rs10830963 and rs10830962 SNPs in the melatonin receptor (MTNR1B) gene among Han Chinese women with polycystic ovary syndrome*. *Molecular human reproduction*, 2011. **17**(3): p. 193-198.
207. Masana, M.I., et al., *MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002. **302**(3): p. 1295-1302.

8. ÖZET

Deneysel Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu Modelinde Melatoninin Yapısal ve Vasküler Değişiklikler Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Son yıllarda artan infertilite nedeniyle kullanılan yardımcı üreme teknikleri ile başarılı gebelik oranları giderek artmaktadır. Ovaryan follikülleri uyarmak için kullanılan teknikler bazı komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu komplikasyonların en önemlisi ve hayatı tehdit edeni Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)'dur. OHSS patogenezinde başlıca 3 mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Bunlardan ilki artan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) duyarlılığı ile intravasküler alandan ekstrasvasküler alan ve üçüncü boşluklara anormal sıvı kaçıdır. Bunun sonucunda intravasküler volüm azalmasına bağlı hipotansiyon ve şok tablosu görülmektedir. İkinci mekanizma inflamatuvar medyatörlerin [İnterlökin-1 (IL-1), İnterlökin-6 (IL-6), Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF- α)] artışına bağlı inflamatuvar süreçtir. Üçüncü mekanizma ise Renin-Anjiotensin-Aldosteron sisteminin aşırı aktivasyonuna bağlı peritoneal ve plevral boşluklar gibi üçüncü boşluklara hızlı bir şekilde sıvı kaçıdır. Melatonin lipofilik yapıda bir hormon olup kan-beyin bariyerini kolayca geçebilmektedir. Melatonin sadece sistemik dolaşımında yer almaz, aynı zamanda intrafolliküler sıvıda bulunup folliküllerin olgunlaşmasında da önemli bir role sahiptir. Bununla beraber, melatoninin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkisi ve VEGF ekspresyonunu düzenleyici rol oynaması nedeniyle OHSS tedavisinde melatonin kullanımının başarılı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda 22 günlük, 28 adet *Wistar Albino* cinsi dişi sıçan kullanılarak OHSS modeli oluşturuldu. Bunun için her bir grupta 7 tane olmak üzere sıçanlar rasgele 4 gruba ayrıldı. OHSS modelinin indüklendiği grupta 7 günlük melatonin tedavisinin uygulanmasının ardından tüm hayvanlar genel anestezi altında sakrifiye edildi. Ovaryum dokuları toplandı ve karşılaştırmalı olarak makroskopik ve histolojik olarak değerlendirildi. Ayrıca, serum örneklerinden E2 (Estradiol), peritoneal sıvıdan ise VEGF ve IL-6 parametreleri ELISA yöntemiyle analiz edildi.

Anahtar Kelimeler: Ovaryan hiperstimülasyon sendromu, ovaryum, melatonin, VEGFA, IL-6.

9. ABSTRACT

Investigating the Effects of Melatonin on Structural and Vascular Changes in Experimentally Induced Ovarian Hyperstimulation Syndrome

In recent years, the rate of successful pregnancies through assisted reproductive treatments for infertility has increased gradually. However, techniques applied in order to stimulate ovarian follicles lead to some complications. One of the worst and even life-threatening complication of these techniques is OHSS. Three mechanisms are suggested to be underlying in the pathogenesis of OHSS. The first mechanism is the fluid escape from intravascular space to extravascular space and body cavities due to increased VEGF sensitivity. Eventually, hypotension and shock develops due to intravascular volume reduction. The second mechanism is inflammatory process due to the increase of inflammatory mediators. And the third mechanism is excessive fluid escape to serous body cavities such as peritoneal, pleural cavities as a result of Renin-Angiotensin-Aldosterone system overactivation. Melatonin is a lipophilic hormone which can pass blood-brain barrier readily. Melatonin is found not only in the systemic circulation but also within the follicular fluid and has an important role in the maturation of the follicles. It may be considered that melatonin may be a very beneficial agent in the treatment of OHSS owing to its antioxidant, anti-inflammatory effects and regulatory role in VEGF expression. In the present study, 22 days old female *Wistar Albino* rats were randomly divided into 4 groups, each of which containing 7 rats and an experimental OHSS was induced in one these groups. All animals in all groups were sacrificed at the end of the experiment and ovaries were harvested. Macroscopic evaluation of ovaries was followed by histomorphometric analysis. Additionally, blood levels of E2 (estradiol), and VEGF and IL-6 levels in peritoneal fluid were measured through ELISA.

Keywords: Ovarian hyperstimulation syndrome, ovary, melatonin, VEGFA, IL-6.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: FERHAT

Soyadı: YİĞİT

Doğum Yeri ve Tarihi: ANKARA-1981

Eğitimi:

1997-2005 Samsun OMÜ Tıp Fakültesi

1993-1996 Kırıkkale Lisesi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği (THED), Histoloji ve Embriyoloji Uzmanları Derneği (HEMUD), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)

Bilimsel Etkinlikleri: Histopathologic Examination and a Research Field of Endometriosis. doi.http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2020.164