

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP)
DOKTORA PROGRAMI

OVARIAN HİPERSTİMÜLASYON SENDROMU (OHSS)
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA, İNDOMETAZİN'İN
OVARYUM ÜZERİNDEKİ YAPISAL, BİYOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER DÜZEYDEKİ ETKİLERİ

Esra GÖKMEN YILMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-22005 proje numarası, Yükseköğretim Kurulu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından 15011 proje numarası ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 122S789 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Doktora Programı çerçevesinde Esra GÖKMEN YILMAZ tarafından hazırlanan “Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) Oluşturulan Sıçanlarda, İndometazin’in Ovaryum Üzerindeki Yapısal, Biyokimyasal ve Moleküler Düzeydeki Etkileri” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/12/2024

Üye (T.D.)	Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Gökhan CESUR	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE	Pamukkale Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Recep KUTLUBAY	Pamukkale Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e, yeri geldiğinde danışman hocam olarak yeri geldiğinde ise büyüğüm olarak bana yol gösterdiği ve desteklediği için çok teşekkür ederim. Ayrıca Anabilim Dalı hocalarımız olan; Prof. Dr. Kemal ERGİN'e ve Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ'e, Anabilim Dalı'mızdan emekli olmuş ve/veya ayrılmış olan Doç. Dr. H. Kübra BAŞALOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi N. Tülin BOYLU'ya, Prof. Dr. Recep KUTLUBAY'a ve Doç. Dr. K. Murat GÜRSES'e kendimi bu alanda geliştirmeme olan katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca Anabilim Dalımızdaki tüm çalışma arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

2007 senesinde lisans eğitimime başladığım günden bugüne dek mesleğimi sevmemi sağlayan tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Tezimin deney hayvanları kısmını gerçekleştirirken sağlamış olduğu imkanlar ve kolaylıklar için Prof. Dr. Turhan DOST'a ve Öğr. Gör. Meltem ÖZTÜRK AYDIN'a çok teşekkür ederim. Laboratuvar imkanlarından faydanlanmam konusunda cömertçe yardımda bulunan Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyeleri olan Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Özlem BOZKURT GİRİT'e ve Dr. Öğr. Üyesi Mahmut Alp KILIÇ'a çok teşekkür ederim.

'Kışıma renk veren dostlarım'; Arş. Gör. Dr. Didem BAKAY İLHAN'a, Dr. H. Fulya YILMAZ'a, Arş. Gör. Dr. Celal Can GÜNGÖR'e, MSc. Gözde ALKAN YEŞİLYURT'a ve Dr. Cenk ORAK'a yanımda oldukları ve özverili davranışları için çok teşekkür ederim. 'İyi dostlar biriktirdim, hepsi ailem oldu.'

Bana sevmeyi, hoşgörüyü, dürüstlüğü, adil olmayı, çalışmanın ve üretmenin ne kadar kıymetli olduğunu öğreten ve sorumluluk bilinci ile yetiştiren sevgili annem Remziye GÖKMEN ve babam Yusuf GÖKMEN'e sevgilerini ve desteklerini her koşulda hissettiğim için sonsuz teşekkür borçluyum. Canım ağabeyim Engin GÖKMEN'e çok teşekkür ederim.

Tüm hırslardan, yarışlardan ve egodan arınmış bir sevgi dilini kendisiyle keşfettiğim, sevdikçe ve sevildikçe daha çok parladığım çok değerli eşim Tahir YILMAZ'a, birlikte yola çıktığımız ilk günden beri süregelen desteği için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT	xviii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Ovaryum Anatomisi	2
2.2. Ovaryum Histolojisi	3
2.2.1. Folikülogenez ve Ovaryum Folikülleri	4
2.2.2. Ovulasyon.....	10
2.3. Sıçanlarda Ovaryum	12
2.4. İnfertilite	13
2.5. Yardımcı Üreme Teknolojileri	14
2.6. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu	15
2.6.1. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromunun Sınıflandırılması	16
2.6.2. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromunun Patofizyolojisi	17
2.6.3. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromunun Önlenmesi ve Tedavisi.....	20
2.7. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar	22
2.7.1. İndometazin	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25

3.1. Gereç.....	25
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	26
3.1.3. Hayvan Materyali	28
3.1.3.1. Deney Grupları ve Hayvan Deneyleri Çalışma Planı.....	29
3.1.3.2. Hayvan Deneylerinin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması.....	30
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Kimyasalların Hazırlanması	37
3.2.1.1. %10'luk Tamponlanmış Nötral Formalin (pH=7.0).....	37
3.2.1.2. Western Blot Yöntemi için Hazırlanan Tamponlar.....	37
3.2.2. Doku Örneklerinde Histokimyasal İncelemeler	39
3.2.2.1. Doku Takibi ve Bloklama	39
3.2.2.2. Parafin Bloklardan Kesit Alma	40
3.2.2.3. Alınan Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması.....	41
3.2.2.4. Alınan Kesitlerin Toluidin Mavisi ile Boyanması.....	42
3.3. Biyokimyasal İncelemeler	43
3.3.1. BCA Analizleri	43
3.3.2. ELİSA Deneyleri	45
3.4. Western Blot.....	47
3.4.1. Over Dokusunun Homejenizasyonu ve Protein İzolasyonu	47
3.4.2. İzole Proteinler ile BCA Analizi ve Seyreltmeler	47
3.4.3. SDS-PAGE Jel Dökme, Örnek Yükleme ve Yürütme	48
3.4.4. SDS-PAGE Jelin Membrana Transfer Edilmesi, Blotlama.....	49
3.4.5. Membranın Bloklanması, Primer ve Sekonder Antikor ile Muamele Edilmesi ve Görüntülenmesi.....	50
3.5. İstatistiksel Analiz	51

4.BULGULAR	52
4.1. Hayvan Ağırlık Değişimleri Ve Ovaryum Ağırlıkları Bulguları.....	52
4.1.1. Hayvan Ağırlık Değişimleri	52
4.1.2. Ovaryum Ağırlıkları	53
4.2. Makroskopik Bulgular.....	54
4.3. Mikroskopik Bulgular	55
4.3.1. Hematoksilen – Eozin Boyamasına Ait Bulgular.....	55
4.3.2. Toluidin Mavisi Boyamasına Ait Bulgular	61
4.4. ELİSA Deneylerine Ait Bulgular	66
4.4.1. BCA Deneyleri (Serum, Doku ve Periton Sıvısı).....	66
4.4.1.1. Serum BCA Deneyleri.....	66
4.4.1.2. Doku BCA Deneyleri	66
4.4.1.3. Periton Sıvısı BCA Deneyleri	67
4.4.2. Serum Histamin Değerleri.....	68
4.4.3. Serum VEGF Değerleri	70
4.4.4. Serum ve Doku VEGFR-2 Değerleri	72
4.4.4.1. Serum VEGFR-2 Değerleri	72
4.4.4.2. Doku VEGFR-2 Değerleri.....	74
4.4.5. Serum ve Doku E ₂ Değerleri	75
4.4.5.1. Serum E ₂ Değerleri.....	76
4.4.5.2. Doku E ₂ Değerleri	77
4.4.6. Periton Sıvısı ve Doku Albumin Değerleri.....	79
4.4.6.1. Periton Sıvısı Albumin Değerleri	79
4.4.6.2. Doku Albumin Değerleri.....	81
4.5. Western Blot Deneylerine Ait Bulgular	82
5.TARTIŞMA.....	84

6.SONUÇ VE ÖNERİLER	96
KAYNAKLAR.....	98
EK 1. Etik Kurul Onayı	111
BİLİMSEL ETİK BEYANI	112
ÖZGEÇMİŞ.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OHSS	: Ovarian hiperstimülasyon sendromu
LH	: Luteinizan hormon
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
PCOS	: Polikistik over sendromu
ART	: Yardımcı Üreme Teknolojileri (Assisted Reproductive Technology)
IUI	: Intrauterin inseminasyon
IVF	: In vitro fertilizasyon
ICSI	: Intrasiitoplazmik sperm enjeksiyonu
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
ARDS	: Akut solunum sıkıntısı sendromu (Acute respiratory distress syndrome)
COS	: Kontrollü yumurtalık stimülasyonunu (Controlled Ovarian Stimulation)
CC	: Klomifen sitrat
hMG	: İnsan menopozal gonodotropin (human menopausal gonadotropin)
FSH	: Folikül stimulan hormon
GnRH	: Gonodotropin salgılatıcı hormon (Gonadotrophin-Releasing Hormone)
hCG	: İnsan koriyonik gonadotropin (human Chorionic Gonadotropin)
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor)
VPF	: Vasküler geçirgenlik faktörü (vascular permeability factor)
ZO-1	: Zonula okludens-1
RAS	: Renin-anjiyotensin sistemi
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor)
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor),

TGF-α	: Dönüştürücü büyüme faktörü-alfa
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü (basic Fibroblast Growth Factor)
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor)
LH	: Luteinleştirici hormon
ER Stres	: Endoplazmik Retikulum Stres
GnRHA	: Gonadotropin salgılatıcı hormon agonisti
FDA	: Food and Drug Administration
NSAID	: Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs)
GDF-8:	Growth differentiation factor-8

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dişi genital sistemin median görünümü.....	3
Şekil 2. Ovaryumun genel görünümü ve şematize çizimi	4
Şekil 3. Primordiyal folikül	5
Şekil 4. Unilaminer primer folikül	6
Şekil 5. Multilaminer primer folikül	6
Şekil 6. Sekonder folikül	8
Şekil 7. Olgun graaf folikülü	9
Şekil 8. Foliküllerin şematize çizimleri	10
Şekil 9. Korpus luteum yapısı	12
Şekil 10. Sıçandişi genital diseksiyonu	13
Şekil 11. Deney gruplarının sembolize görüntüsü	31
Şekil 12. Gruplara ait sıçan ağırlık değişimlerinin karşılaştırılması. Grup 1 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5; Grup 2 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5 arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p<0,05$).	53
Şekil 13. Gruplara ait sıçan over ağırlıklarının karşılaştırılması. Grup 1 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5; Grup 2 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5; Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0,05$).	55
Şekil 14. Serumda bulunan protein miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik.....	66
Şekil 15. Dokuda bulunan protein miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik.....	67
Şekil 16. Periton sıvısında bulunan protein miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik.....	67

Şekil 17. Serumda bulunan Histamin miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik.....	68
Şekil 18. Serum Histamin/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 arasında; Grup 2 ile Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 4 arasında ve Grup 4 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).....	69
Şekil 19. Serumda bulunan VEGF miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik	70
Şekil 20. Serum VEGF/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 4 arasında; Grup 4 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).....	71
Şekil 21. VEGFR-2 miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik	72
Şekil 22. Serum VEGFR-2/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).	73
Şekil 23. Doku VEGFR-2/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 3 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).	75
Şekil 24. E ₂ miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik.....	75
Şekil 25. Serum E ₂ /BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0,05$).....	77
Şekil 26. Doku E ₂ /BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).....	78

Şekil 27. Albumin miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik	79
Şekil 28. Periton sıvısı Albumin/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 3 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).....	80
Şekil 29. Doku Albumin/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Gruplar arası anlamlı farklılık tespit edilemedi.	82

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Sıçanların abdominal bölgeden temiz kesiler ile diseke edilmesi	31
Resim 2. Laparotomi işlemi	32
Resim 3. 2 mL % 0.9 steril salin ile peritoneal lavaj işlemi	33
Resim 4. Periton masajı	34
Resim 5. Peritondaki toplam sıvının mikropipet yardımıyla geri toplanması	35
Resim 6. Santrifüj sonrası elde edilen serum görüntüsü	36
Resim 7. Rotari mikrotom ve su banyosu	40
Resim 8. Uygun derece seyreltme uygulanmamış olan ve spektrofotometrenin okuma aralığı dışında olan örneklerin görüntüleri	44
Resim 9. Uygun oranlarda seyreltilmiş olan örneklerin BCA analizi öncesi görüntüleri.....	45
Resim 10. Spektrofotometrede 450 nm’de ölçüm öncesi sarı renge dönmüş olan örnekler	46
Resim 11. Jel döküldükten sonra donma aşaması	49
Resim 12. Gruplara ait sağ overlerin makroskobik görünümeleri.....	55
Resim 13. Grup 1 (Kontrol) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)	57
Resim 14. Grup 2 (Sham) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)	57
Resim 15. Grup 3 (OHSS) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)	58
Resim 16. Grup 3 (OHSS) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatlarındaki hemorajik bölge odakları (H&E - 10X).....	58

Resim 17. Grup 4 (OHSS+1 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X).....	59
Resim 18. Grup 4 (OHSS+1 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatlarındaki hemorajik bölge odakları (H&E - 10X).....	59
Resim 19. Grup 5 (OHSS+5 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X).....	60
Resim 20. Grup 5 (OHSS+5 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatlarındaki hemorajik bölge odakları (H&E - 10X).....	60
Resim 21. Grup 1 (Kontrol) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X).....	61
Resim 22. Grup 2 (Sham) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X)	62
Resim 23. Grup 3 (OHSS) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X)	63
Resim 24. Grup 4 (OHSS+1 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X).....	64
Resim 25. Grup 5 (OHSS+5 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X).....	65
Resim 26. Gruplara ait farklı proteinlerin ifadenme derecelerinin temsil görüntüleri.....	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Doku takip protokolü.....	40
Tablo 2. Hematoksilen-Eozin ile Boyama Protokolü	41
Tablo 3. Toluidin Mavisi ile Boyama Protokolü	42
Tablo 4. Gruplara ait sıçan ağırlık değişimlerinin ortalama ve standart sapma değerleri, n=7	52
Tablo 5. Gruplara ait sıçan ovaryum ağırlıklarının ortalama ve standart sapma değerleri, n=7	53
Tablo 6. Gruplara ait birim başına serum histamin değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	68
Tablo 7. Gruplara ait birim başına düşen serum VEGF değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri	70
Tablo 8. Gruplara ait birim başına düşen serum VEGFR-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri	73
Tablo 9. Gruplara ait birim başına düşen doku VEGFR-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri	74
Tablo 10. Gruplara ait birim başına düşen serum E ₂ değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	76
Tablo 11. Gruplara ait birim başına düşen doku E ₂ değerlerinin ortalama ve standart sapma değerler	77
Tablo 12. Gruplara ait birim başına düşen periton sıvısı albümin değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri	80
Tablo 13. Gruplara ait birim başına düşen doku albumin değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri	82

ÖZET

OVARIAN HİPERSTİMÜLASYON SENDROMU (OHSS) OLUŞTURULAN SIÇANLARDA, İNDOMETAZİN'İN OVARYUM ÜZERİNDEKİ YAPISAL, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER DÜZEYDEKİ ETKİLERİ

Gökmen Yılmaz E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Doktora Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2024

Amaç: İndometazin'in farklı dozlarının OHSS üzerindeki etkilerini yapısal, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle ayrıntılı olarak araştırmak amaçlanmıştır. Literatürdeki çelişkili sonuçlardan biri olan histaminin ve mast hücrelerinin OHSS üzerindeki etkileri araştırılarak açıklık getirilmesi amaçlanmaktadır. Bunların yanı sıra literatürde sınırlı sayıda mevcut olan OHSS patofizyolojisine ait verilere katkı sağlanması ve patofizyolojinin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada hayvan materyali olarak, immatür (22 günlük) ve ağırlıkları 40-80 gram arasında değişen 40 adet *Wistar albino* cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar her gruba 8'er tane olacak şekilde rastgele olarak 5 gruba ayrıldılar. Sıfır kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmazken, sham grubuna 6 gün boyunca 0.1 mL % 0.9'luk steril salin subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. OHSS gruplarına 4 gün boyunca 10 IU PMSG subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Ardından deneyin 5. gününde 30 IU hCG subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Tedavi gruplarında ise; 6 gün boyunca 1 mg/kg ve 1 mg/kg indometazin subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Deneyin 7. gününde sıçanlar genel anestezi altına sakrifiye edildiler. Ardından serum, periton sıvısı ve doku örneklerinden ELİSA ile protein tayini işlemleri, histokimyasal boyamalar ve western blot işlemleri gerçekleştirildi.

Bulgular: Gerçekleştirilen deneyler sonucunda; OHSS deney grubunda sıçan kilo değişimleri ve over ağırlıkları artmış olarak saptandı. Bu verilerin indometazin sayesinde

dozu ile ters orantılı olarak düşüş olduğu saptandı. Ek olarak OHSS durumunda gözlemlenen üçüncül boşluklara sıvı kaçıışı, OHSS gruplarında gözlemlendi. Bu durumun indometazin uygulanan gruplarda düşüş sağladığı tespit edildi. Ayrıca histopatolojik incelemelerde; OHSS grubunda artmış sayıda kistik folikül, korpus luteum ve hemorajik bölge odakları saptandı. Bu bulgular ilaç uygulanan gruplarda doz ile ters orantılı olarak düşüş gösterdi. Mast hücrelerinin OHSS durumunda hem sayı, hem yoğunluk, hem de lokasyon olarak değişikliğe uğradığı tespit edildi.

Sonuç: İndometazin'in doz bağımlı olarak OHSS semptomlarını azalttığı ve patofizyolojisinde iyileşme sağladı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Histamin, İndometazin, Mast Hücreleri, Ovarian Hiperstimulasyon Sendromu.

ABSTRACT

STRUCTURAL, BIOCHEMICAL, AND MOLECULAR EFFECTS OF INDOMETHACIN ON THE OVARY IN RATS WITH OVARIAN HYPERSTIMULATION SYNDROME (OHSS)

Gökmen Yılmaz E. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, (Medicine) Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2024

Objective: The aim was to investigate the effects of different doses of indomethacin on OHSS in detail using structural, biochemical and molecular methods. The aim was to clarify the effects of histamine and mast cells on OHSS, which are among the contradictory results in the literature. In addition, it was aimed to contribute to the limited data available in the literature on the pathophysiology of OHSS and to better understand the pathophysiology.

Materials and Methods: In the study, 40 immature (22 days old) female Wistar albino rats weighing between 40-80 grams were used as animal material. The rats were randomly divided into 5 groups, 8 in each group. No procedure was applied to the zero control group, while the sham group was injected with 0.1 mL of 0.9% sterile saline subcutaneously (s.c.) for 6 days. The OHSS groups were injected with 10 IU PMSG subcutaneously (s.c.) for 4 days. Then, on the 5th day of the experiment, 30 IU hCG was injected subcutaneously (s.c.). In the treatment groups, 1 mg/kg and 1 mg/kg indomethacin were injected subcutaneously (s.c.) for 6 days. The rats were sacrificed under general anesthesia on the 7th day of the experiment. Then, protein determination procedures with ELISA, histochemical staining and western blot procedures were performed from serum, peritoneal fluid and tissue samples.

Results: As a result of the experiments performed; it was determined that the weight changes and ovary weights of the rats in the OHSS experimental group increased. It was determined that these data decreased inversely proportional to the dose thanks to indomethacin. In addition, the fluid leakage to the tertiary spaces observed in OHSS was observed in the OHSS groups. It was determined that this situation decreased in the

indomethacin-administered groups. In addition, in histopathological examinations; an increased number of cystic follicles, corpus luteum and hemorrhagic area foci were detected in the OHSS group. These findings decreased inversely proportional to the dose in the drug-administered groups. It was determined that mast cells underwent changes in both number, density and location in OHSS.

Conclusion: Indomethacin was found to reduce the symptoms of OHSS in a dose-dependent manner and provide improvement in its pathophysiology.

Key Words: Histamine, Indomethacin, Mast cells, Ovarian Hyperstimulation Syndrome.

1. GİRİŞ

Ovarian hiperstimülasyon sendromu (OHSS), infertilite tedavilerinin bir komplikasyonu olarak ya da nadiren doğal ovaryen siklus sırasında ortaya çıkabilen masif ovaryen büyüme, çoklu ovaryen kistler ve kapiller geçirgenlikteki artışa bağlı intravasküler alandan üçüncül boşluğa sıvı kaçışı ile karakterize olan bir sendromdur (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Güçyetmez ve Ayyıldız, 2013). OHSS gelişen vakalarda ovaryum hacimce genişlemiştir ve içi sıvı dolu foliküllerle kaplıdır. Şiddetli vakalarda tromboz, emboli, inme ve hatta ölüm gibi ciddi komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Güçyetmez ve Ayyıldız, 2013). Ayrıca, yapılan bazı çalışmalar ile OHSS'yi takip eden gebeliklerde artmış oranda preeklampsi ve preterm eylem riski olduğu da gösterilmiştir (Courbiere, Oborski, Braunstein, Desparoir, Noizet ve Gamerre, 2011).

OHSS'nin patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır ve OHSS'yi tamamen ortadan kaldıracak bir yöntem henüz mevcut değildir. Uygulanan tedavi yöntemleri hastanın klinik tablosu ve risk faktörleri göz önüne alınarak, hekimin deneyimi ve gözlemlerine dayanarak seçilmekte olan semptomatik ve ampirik (deneysel) yöntemlerdir. Ayrıca bu yöntemler İVF başarısında verim düşüklüğüne sebep olabilmektedir. Bu nedenle OHSS'nin ortaya çıkmasını önlemek için, genel bir koruyuculuk etkisine sahip ajanların keşfedilmesine olan ihtiyaç büyüktür.

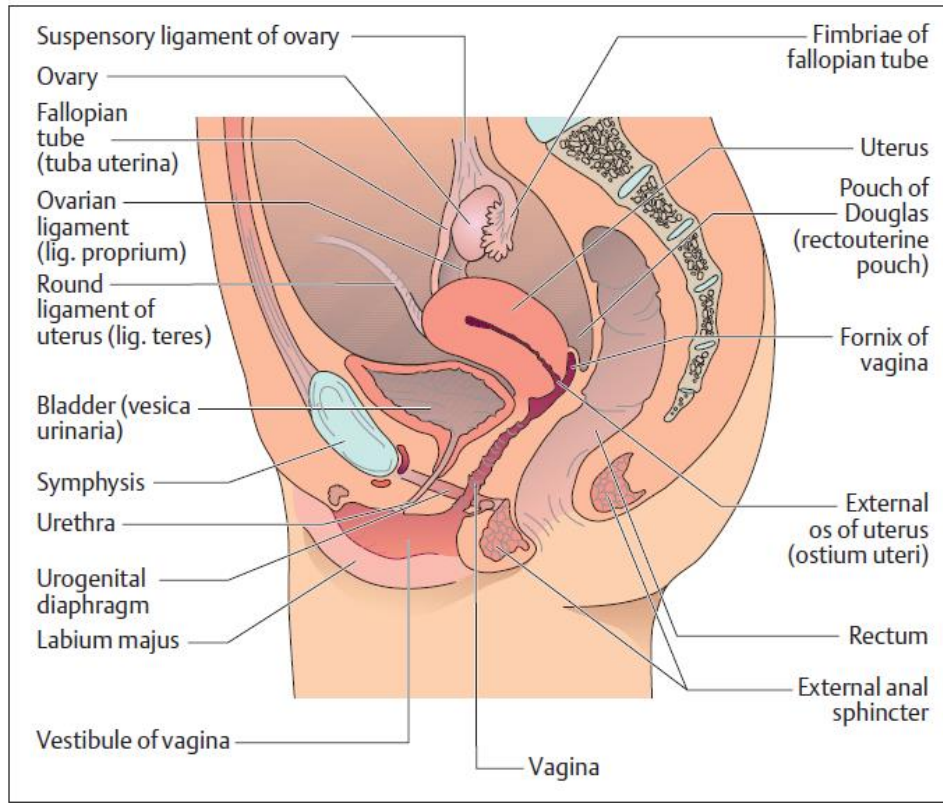
Bu çalışma ile, indometazinin OHSS üzerindeki etkilerini yapısal, biyokimyasal parametreler ve moleküler belirteçler açısından ayrıntılı olarak araştırmak ve literatürdeki mevcut çelişkili bilgilerden bir kısmına açıklık getirmek amaçlanmaktadır. Ayrıca OHSS ile 'endoplazmik retikulum stres' arasında doğrudan bir bağlantı kurulması amaçlanmaktadır. Literatürdeki çelişkili sonuçlardan biri olan histaminin OHSS üzerindeki etkileri araştırılarak açıklık getirilmesi amaçlanmaktadır. Tüm bunlara ek olarak, bu araştırma ile farklı dozlarda uygulanacak olan indometazinin etkileri kıyaslanacak ve en etkili olan dozun belirlenmesi sağlanacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Anatomisi

Kadın genital sistemi; dış genital organlar (organa genitalia feminina eksterna) ve iç genital organlar (organa genitalia feminina interna) olmak üzere ikiye ayrılır. Dış genital organlar; diaphragma urogenitale ile arcus pubicus'un altında yer alır. Mons pubis, labium majus pudendi, labium minus pudendi, clitoris, bulbus vestibuli ve glandula vestibularis majoris dış genital organlardır. İç genital organlar ise pelvis boşluğunda yer alır ve ovaryumlar, tuba uterina, uterus ve vajina bu gruba dahil organlardır (Arıncı ve Elhan, 1997; Faller ve Shuenke, 2004).

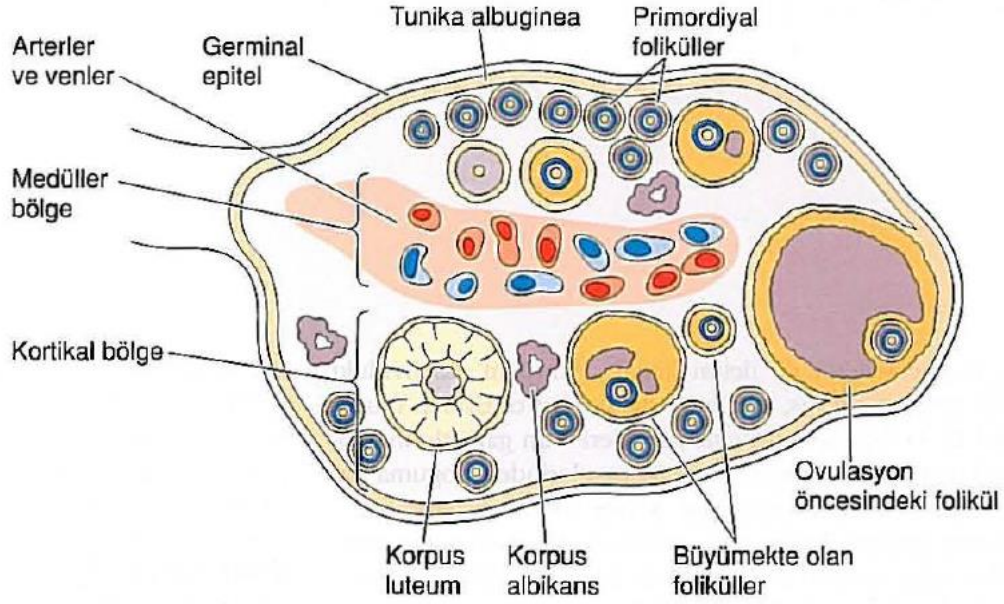
Ovaryumlar pelvis'in yan duvarında bulunan fossa ovarica'ya yerleşmişlerdir. Tuba uterinanın alt arka kısmında bulunan ovaryumlar, lig. latum uteri içinde yer alırlar ve uzun eksenleri dikey yerleşimlidir. Pembe-gri renkte olan ovaryumların dış yüzeyi yüzeyi ergenlik dönemine kadar periton zarı ile kaplı olup, düz ve parlaktır. Ergenlik döneminden sonra matlaşma meydana gelir. Ovulasyonların gerçekleşmesi ve yapılan doğumlar sebebiyle yüzeyleri pürüzlü bir görünüm alır. Her bir ovaryum yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde ve 0,8 cm kalınlığındadır. Ağırlıkları 3 ila 5 gram arasındadır. 'Facies lateralis,' ve facies medialis olarak iki yüzeyi, extremitas tubaria ve extremitas uterina olarak iki ucu ve margo liber ve margo mesovarioca olarak iki kenarı bulunur. Her iki ovaryumun ön bölgesinde hilus adı verilen sinirlerin ve kan damarlarının girdiği bir kısım bulunur. Mezovaryum olarak adlandırılan yapı; periton kıvrımıdır ve kan damarlarının ovaryumlara iletilmesinde görev alır. Ayrıca ovaryumu, uterusun yan yüzeylerinde bulunan ligamentum latuma bağlar. Ligamentum ovarii yardımı ile ise uterusun yan duvarına bağlanırlar (Şekil 1.) (Arıncı ve Elhan, 1997).



Şekil 1. Dişi genital sistemin median görünümü (Faller ve Shuenke, 2004)

2.2. Ovaryum Histolojisi

Nulliparlarda ovaryumlar, yaklaşık olarak 3 cm uzunluğa, 1.5 cm genişliğe ve 1 cm kalınlığa sahip badem şeklinde organlardır. Germinal epitel olarak adlandırılan yüzey epitelleri tek katlı yassı epitel ya da tek katlı kübik epitel ile örtülüdür. Germinal epitelin hemen altında, tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokusundan oluşan bir yapı bulunur. Overler korteks ve medulla bölgesi olmak üzere iki bölge içerirler. Korteks bölgesi, tunika albuginea'nın altında bulunan ve ovaryum foliküllerini, korpus luteum ile korpus albicans yapılarını içeren bölgedir. İçerisinde oositleri içeren ovaryum folikülleri, korteks bölgesinin stromal kısmında gömülü durumdadır. Overlerin medulla bölgesi ise; gevşek bağ dokusundan oluşan, kan damarları, lenf damarları ve sinirler açısından oldukça zengin olan iç bölgedir. Korteks ve medulla bölgeleri arasında ayırt edici kesin bir sınır bulunmamaktadır (Şekil 2.) (Junqueira ve Carneiro, 2009).



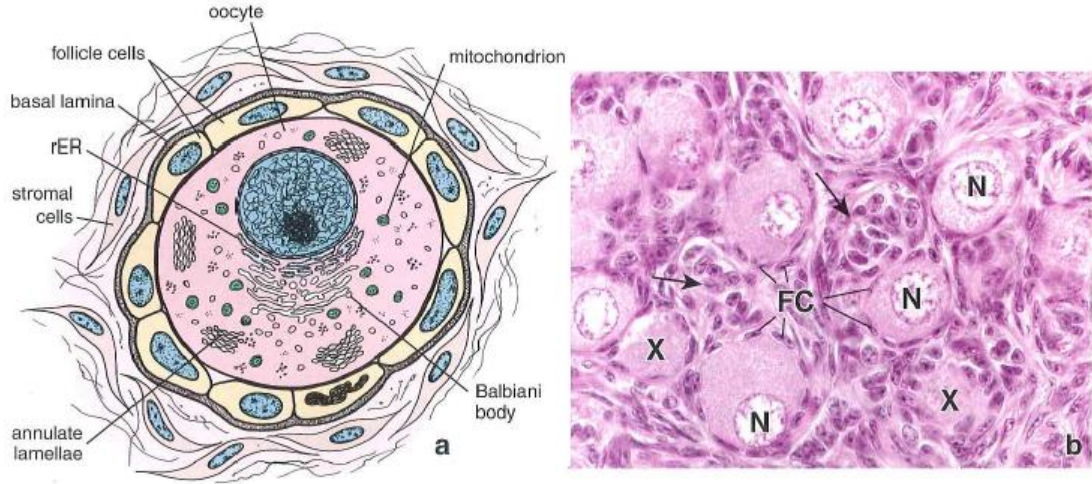
Şekil 2. Ovaryumun genel görünümü ve şematize çizimi (Junqueira ve Carneiro, 2009).

2.2.1. Folikülogenez ve Ovaryum Folikülleri

Primordiyal folikülden graaf folikül oluşumu aşamasına kadar olan gelişim sürecine folikülogenez adı verilir ve ovariumun korteksinde gerçekleşir. Bir ovarium folikülü, bir ya da daha fazla folikül hücresi ya da granüloza hücresi katmanıyla çevrili tek bir oositten oluşur (Junqueira ve Carneiro, 2009). Foliküller korteks bölgesinin stromasında bulunurlar (Ross ve Pawlina, 2006).

Oogenezin ilk aşamaları fetal dönemde gerçekleşir ve seri mitotik bölünmeler ile tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrili primer oosit içeren, primordiyal foliküllerin sayısında artma meydana gelir. Primordiyal foliküller ovarium korteksinin en üst kısmında yer alır ve içermiş olduğu primer oositler mayoz bölünmenin birinci profaz evresinde arreste uğramıştır. Primordiyal foliküller fetal dönemin üçüncü ayında oluşmaya başlarlar. Olgun bir ovariumda primordiyal foliküller tunika albuginea'nın alt kısmında yer alırlar. Burada primer oosit tek katlı yassı folikül hücreleri ile sarılmıştır. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi ise bazal lamina ismi verilen yapı ile sarılmıştır (Şekil 3.) (Ross ve Pawlina, 2006). Bu

aşamadaki primer oositler hücreler; açılmış halde kromozomlara, çekirdeğe yakın yerleşimli stoplazmik organeller, çok sayıda mitokondrion ve az miktarda golgi kompleksi ile endoplazmik retikulum organelleri içermektedir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

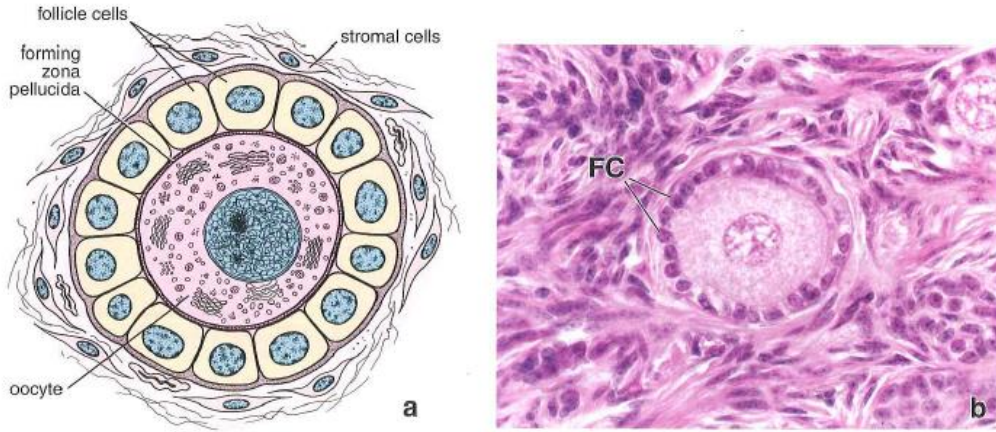


Şekil 3. Primordiyal folikül (Ross ve Pawlina, 2006)

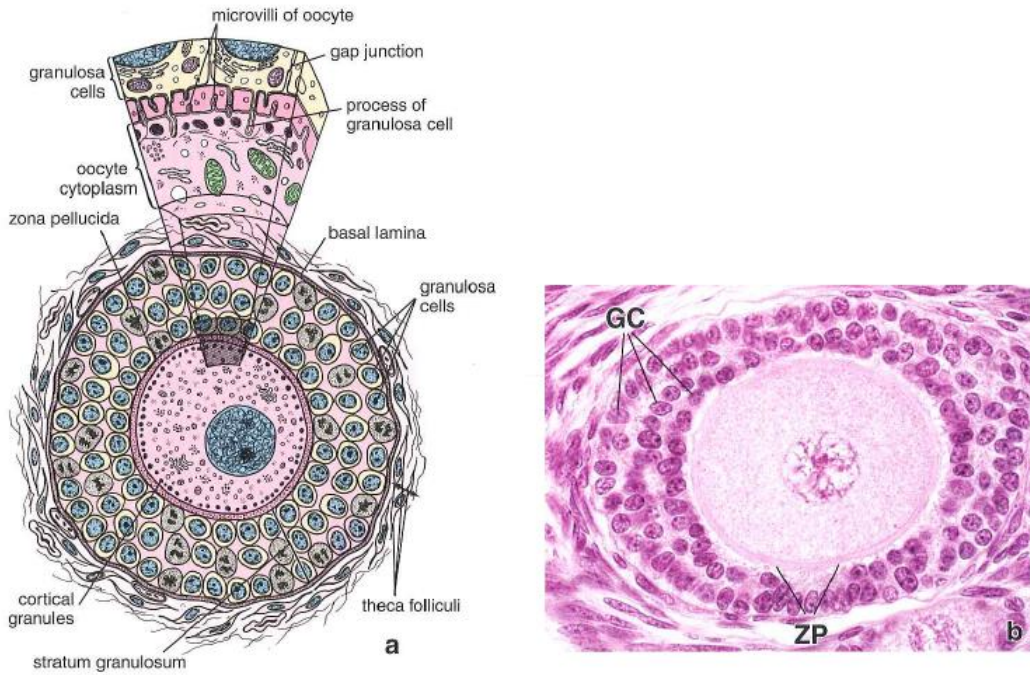
Puberte ile birlikte foliküler büyüme başlar ve ilk ovulasyon menarştan bir süre sonra gerçekleşir (Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006). Normal şartlar altında her siklus sırasında sadece bir oosit tam olgunluğa ulaşarak ovule olur. Üreme yaşam döngüsü içerisindeki bir kadın, hayatı boyunca yaklaşık olarak 400 adet olgun ovum üretir. Bu durum doğum esnasında 600.000 ile 800.000 civarında olan primer oositlerin pek çoğunun olgunlaşmayı tamamlayamayarak atreziye uğradıklarını göstermektedir (Ross ve Pawlina, 2006).

Foliküler büyüme hipofiz tarafından salgılanan folikül uyarıcı hormon (FSH) uyarısı ile başlar. FSH uyarısı ile birlikte; oositte, folikül hücrelerinde ve yakın bölge stromasında değişiklikler ortaya çıkar. Oositin; çekirdeği büyür, mitokondriler sayıca artar ve endoplazmik retikulum genişleyerek büyür. Folikül hücreleri ise; çoğalarak tek katlı kübik şeklini alırlar. Bu aşamadaki foliküle unilaminer (tek tabakalı) primer folikül adı verilir. Bu aşamada oosit ile folikül hücreleri arasında ‘zona pellusida’ şekillenmeye başlar (Şekil 4.). Folikül hücreleri çoğalmayı sürdürerek çok katlı folikül hücrelerini yani granüloza tabakasını oluşturur. Bu aşamadaki foliküle; multilaminer primer folikül veya preantral

folikül ismi verilir. Bu aşamada ‘zona pellusida’ tam olarak oluşmuştur (Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006). Zona pellusidayı ışık mikroskobu altında asidofilik boyalarla boyayarak göstermek mümkündür. Bu oluşumda bazal lamina halen varlığını sürdürmektedir (Şekil 5.) (Ross ve Pawlina, 2006).

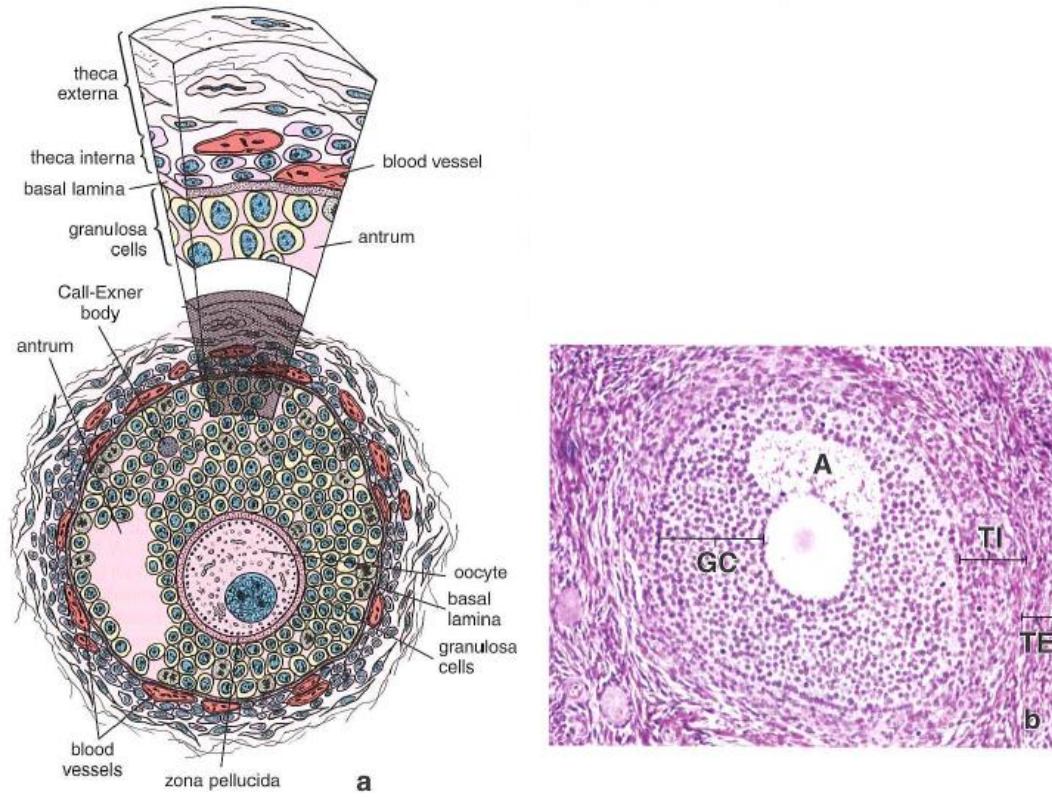


Şekil 4. Unilaminer primer folikül (Ross ve Pawlina, 2006)



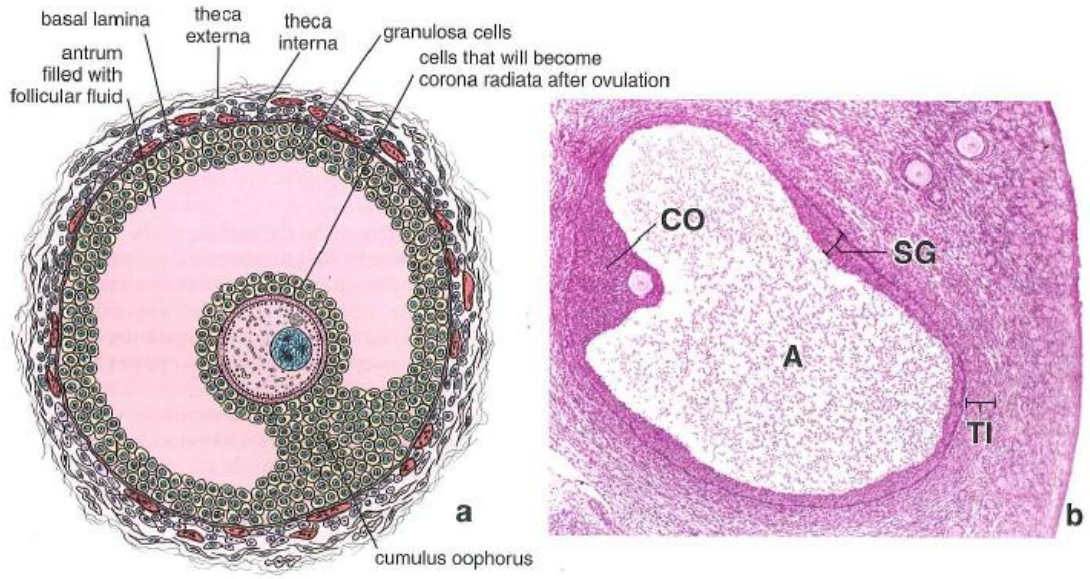
Şekil 5. Multilaminer primer folikül (Ross ve Pawlina, 2006)

Foliküller büyüdükçe; korteksin derin kısmına doğru ilerlerler ve granüloza hücreleri çoğalmaya devam eder. Folikülü çevreleyen stromal hücreler bazal laminanın etrafında ‘teka folikülü’ olarak adlandırılan ve ‘teka interna’ ile ‘teka eksterna’ olarak iki kısımdan oluşan bağ dokusu katmanlarına farklılaşırlar. Teka interna, kübik salgı hücrelerinden oluşan yoğun vaskülarizasyon gösteren tabakadır. Bu tabakadaki hücreler bol miktarda luteinizan hormon (LH) reseptörüne sahiptir. Bu durum LH uyarısı geldikten sonra östrojen öncülleri olan androjenleri sentezlemelerini sağlar. Teka eksterna ise bağ dokusu hücrelerini, düz kas hücrelerini ve kollajen lifleri içeren dış tabakadır. Teka interna ve teka eksterna arasındaki sınır belirgin değildir. Ancak granüloza hücreleri ile teka interna hücreleri arasında bulunan bazal lamina bu iki komşu arasında belirgin bir sınır oluşturmaktadır (Ross ve Pawlina, 2006). Aynı zamanda granüloza hücreleri arasında folikül sıvısı (likör folikülü) birikmeye başlar. Bu sıvı hyaluronan açısından zengindir ve kaviteler birleştikçe antrum adı verilen boşlukları oluşturur. Bu foliküle sekonder folikül veya antral folikül ismi verilir. Sekonder folikül büyüdükçe antrum genişler ve bazı hücreler folikül duvarında belirli yerlerde yoğunlaşırlar (Junqueira ve Carneiro, 2009). Granüloza hücreleri oositin etrafındaki bölge haricindeki yerlerde nispeten aynı kalınlıkta iken, oosit ile temasta olduğu bölgede kumulus ooforus adı verilen tümsek yapıyı oluşturur. Oositin etrafını çevreleyen ve ovulasyon sırasında oosit ile birlikte atılan hücrelere ise korona radiata ismi verilmektedir (Şekil 6.) (Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).



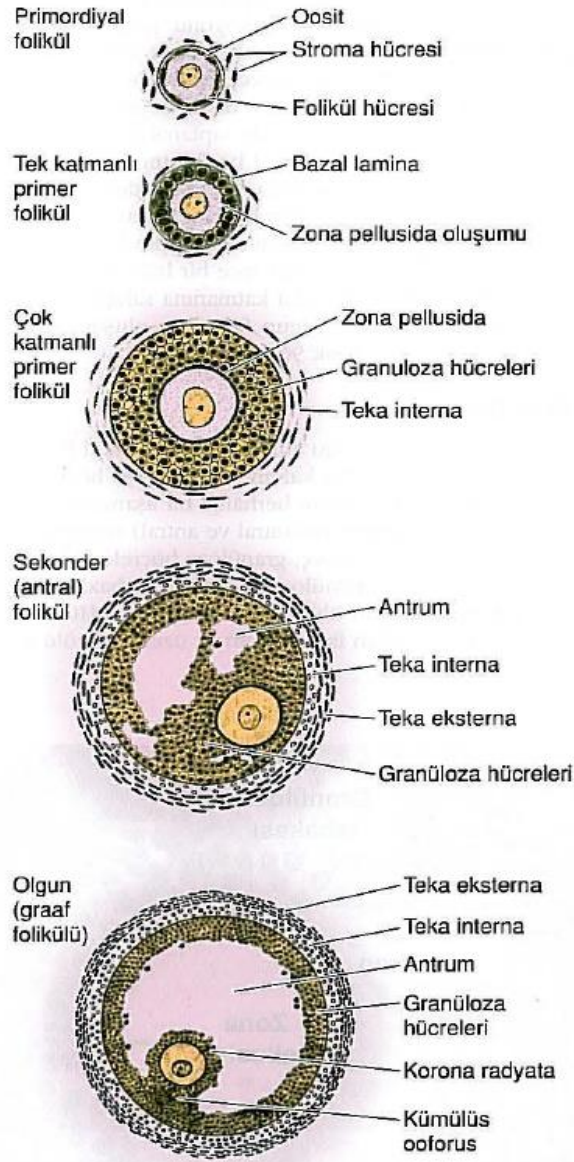
Şekil 6. Sekonder folikül (Ross ve Pawlina, 2006)

Her menstürasyon döngüsünde genellikle bir folikül baskın hale gelir ve diğerlerinden daha fazla büyür. Bu folikül, ‘graaf folikülü’ veya ‘olgun folikül’ olarak adlandırılır ve oldukça büyük bir boyuta sahiptir. Ovaryumun yüzeyinde ‘stigma’ bir çıkıntı oluşturur. Bu aşamada folikül büyüdükçe; granüloza hücrelerindeki mitoz kapasitesi azalır, antrumun boyutu artar ve granüloza tabakası incilir. Teka tabakaları daha belirgin bir şekilde ortaya çıkarken, teka interna hücrelerinin stoplazmalarında lipid damlacıkları oluşmaya başlar (Şekil 7.) (Ross ve Pawlina, 2006).



Şekil 7. Olgun graaf folikülü (Ross ve Pawlina, 2006)

Foliküllerin çoğu foliküler atreziye uğrar ve dejenere olarak ‘atretik folikülü’ oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2006). Gelişimin herhangi bir aşamasında bulunan pek çok folikül atreziye uğrar ve makrofajlar tarafından sindirilirler. İlerleyen aşamalarda ise ortadan kaldırılan folikülün bulunduğu alan fibroblastlarca kaplanır ve nebde dokusu oluşturulur (Junqueira ve Carneiro, 2009). Şekil 8.’de foliküllerin şematize çizimleri tek bir görsel üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 8. Foliküllerin şematize çizimleri (Junqueira ve Carneiro, 2009)

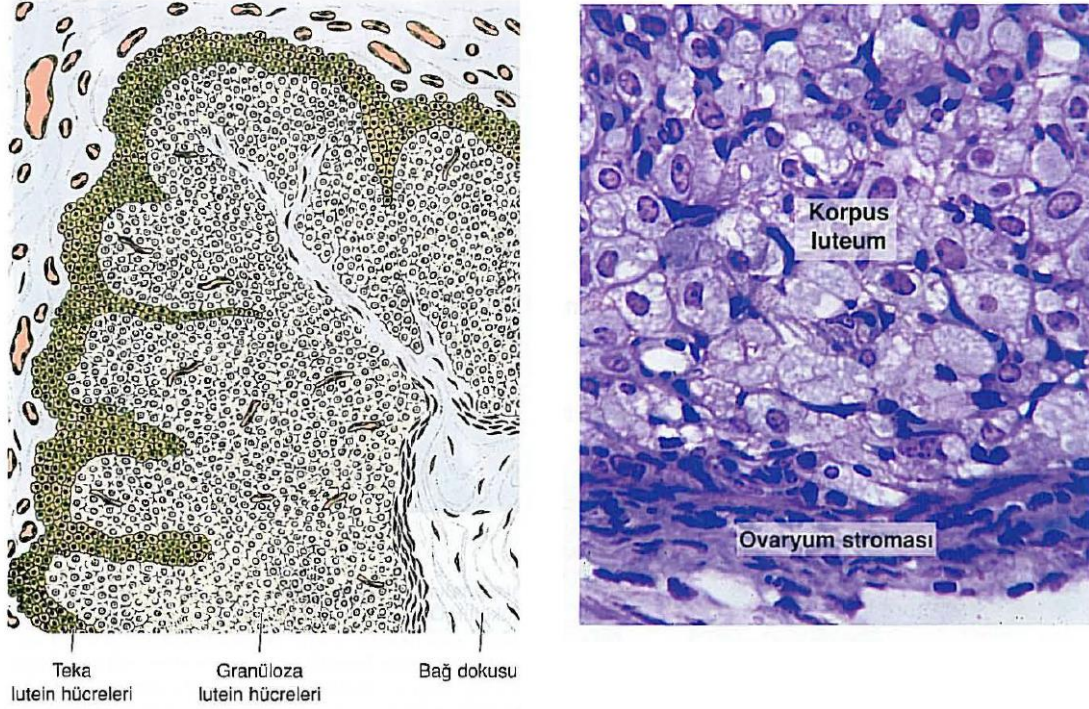
2.2.2. Ovulasyon

Ovulasyon olarak adlandırılan süreç, sekonder oositin graaf folikülden atıldığı bir süreçtir ve hormon aracılığıyla gerçekleşir. Serbest kalan oosist ve korona radiata hücreleri tuba uterinanın fimbriyaları tarafından yakalanır. Bu süreç mensturasyon siklusunun yaklaşık 14. gününde gerçekleşir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Ovulasyonu başlatan tetik mekanizması, ovulasyondan yaklaşık 24 saat kadar önce adenohipofizden LH salınımındaki artış ile başlar. Bu duruma cevaben granüloza hücrelerinde bulunan LH reseptörleri azalır ve böylelikle östrojen üretimi durur (Ross ve Pawlina, 2006). Kandaki LH seviyesinin artışı ile birlikte ovaryumdaki kan akışında bir artma meydana gelir. Eş zamanlı olarak lokal bir şekilde prostaglandin, histamin, vazopressin ve kolajenaz salınımı da gerçekleşir. Granüloza hücreleri daha gevşek bir örüntüye sahip olurlar. Folikül duvarının küçük bir kısmı zayıflar ve bu zayıflama ile birlikte folikül dış duvarının yırtılması ve ovulasyon gerçekleşir. Folikül yüzeyinde stigmanın belirmesi, ovulasyonun yakın olduğunun göstergesidir (Junqueira ve Carneiro, 2009). Bu durumlar primer oositin mayoz bölünmesinin kaldığı yerden devam etmesi için gerekli uyarıyı vermiş olur. Mayoz 1'in tamamlanması, LH pikinden yaklaşık 12-24 saat kadar sonra, ovulasyondan hemen önce tamamlanır. Birinci mayozun tamamlanmasıyla sekonder oosit ve birinci polar cisimcik oluşur (Ross ve Pawlina, 2006). Birinci kutup cisimciği, nükleus ve çok az miktarda sitoplazma içeren oldukça küçük bir hücredir. Birinci kutup cisimciğinin atıldıktan sonra, oositin nükleusu (çekirdeği) ikinci mayoz bölünmeye başlar. Bu aşamadaki bir oositin bölünmesi, metafaz evresinde duraklar. Folikül duvarındaki yırtılma ile birlikte; oosit, zona pellusida, korona radiata, birinci kutup cisimciği ve az miktardaki folikül sıvısı ovaryumdan atılır ve fimbriyalar tarafından yakalanır. Ardından bu yapı tuba uterina boyunca ilerler. Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse, oosit ovulasyondan 24 saat sonrasında bozulmuş olur (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Ovulasyon sonrasında ovaryum içerisinde kalan folikül parçaları olan, granüloza ve teka interna hücreleri lüteinizasyona uğrarlar. Granüloza hücrelerinin boyutlarında artış meydana gelir. Bu aşamadan itibaren bu hücelere 'granüloza lutein' hücreleri adı verilir. Teka internada yer alan hücreler ise artık 'teka lutein' hücreleri olarak adlandırılırlar. Granüloza lutein ve teka lutein hücreleri birlikte korpus luteumun yapısını oluştururlar ve progesteron üretmeye başlarlar (Junqueira ve Carneiro, 2009). Korpus luteum, geçici bir endokrin salgı bezidir ve ovaryumun korteks bölgesinde yer alır (Şekil 9.) (Ross ve Pawlina, 2006). Korpus luteumun geleceği, fertilizasyon gerçekleşmesine ve ardından gebelik oluşumuna bağlı olarak şekillenir. Gebelik oluşmazsa, korpus luteum 10-12 günlük bir süre boyunca progesteron salgıladıktan sonra dejenere olur. Bu durum progesteron miktarındaki düşüş ile sonuçlanacağı için menstrasyon gerçekleşir. Korpus luteumun gerilemesi tamamlandıktan sonra tekrar FSH salınımı uyarılır ve yeni bir menstrasyon siklusu

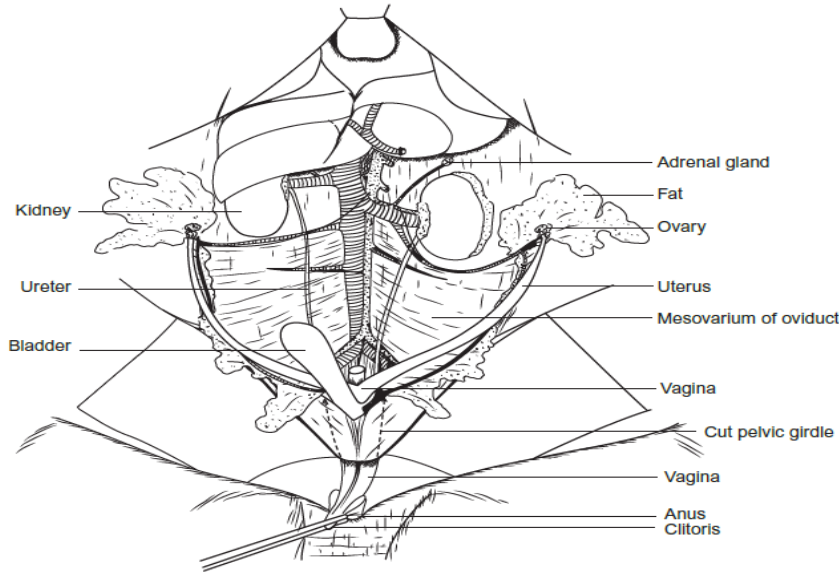
uyarılmış olur. Korpus luteum menstrasyon siklusunun bir kısmı boyunca mevcut yapısını korur. Bu yapıya ‘menstrasyon korpus luteumu’ ismi verilir. Ardından makrofajlar tarafından sindirimi gerçekleştirilir. Sindirimin ardından bulunduğu bölge fibroblastlarca kaplanarak ‘korpus albicans’ adı verilen yapıyı oluşturur (Junqueira ve Carneiro, 2009).



Şekil 9. Korpus luteum yapısı (Junqueira ve Carneiro, 2009).

2.3. Sıçanlarda Ovaryum

Sıçanlarda ovaryumlar, böbreklerin kaudalinde bulunur. Hebel ve Stromberg (1976) sağ yumurtalığı, 4.-5. lumbar vertebra seviyesinde, sol ovaryumu ise 5.-6. lumbar vertebra hizasına olduğunu göstermişlerdir. Ancak Rowett (1952) ovaryumları, biraz daha önde, sol yumurtalık sol böbreğin yanında yer alacak şekilde göstermiştir (Şekil 10.).



Şekil 10. Sığandışi genital disseksiyonu (Maynard ve Downes, 2019).

Yetişkin bir sığanda ovaryumlar, $5 \times 4 \times 3 \text{ mm}^3$ boyutunda ve yaklaşık 60 mg ağırlığındadır. Sağ ovaryum abdominal aortun bir dalı ile kan desteğini temin ederken, sol ovaryumda damarlar böbrek damarlarıyla bağlantılıdır. Yumurtalık arterleri 'broad ligament' içerisinde uzanır ve iliak arterlerden çıkan uterin arterlerle anastomoz yapar (Maynard ve Downes, 2019).

2.4. İnfertilite

İnfertilite; Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO - World Health Organization) ve Uluslararası Yardımcı Üreme Teknolojileri İzleme Komitesi'nin (ICMART - International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies) tanımlamalarına göre; 12 ay veya daha uzun süreli, düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiden sonra klinik gebelik elde edememeye sonuçlanan bir üreme sistemi hastalığıdır (Zegers-Hochschild, Adamson, de Mouzon, Ishihara, Mansour, Nygren, Sullivan ve Vanderpoel, 2009). Açıklanan verilere göre, dünya çapında 186 milyondan daha fazla insan infertilite ile mücadele etmektedir (Inhorn ve Patrizio, 2015). İnfertilite durumu; erkek, kadın veya her ikisi kaynaklı olarak ortaya çıkabilmektedir. Erkek infertilite sebepleri temel olarak; azospermi veya koital

infertilite şeklinde sınıflandırılmaktadır. Azospermi ve koital infertilite sebepleri ise; varikozel, testis yetmezliği, genital sistem enfeksiyonu, testis bozuklukları, testis kanseri, hormonal bozukluklar, retrograd ejakülasyon, uzun süreli ısıya maruziyet, obezite, ileri yaş, sigara, alkol, ağır metal veya pestisit maruziyeti, oksidatif stres, genetik faktörler, çeşitli çevresel ve beslenme faktörleri veya idiyopatik olabilmektedir (Mamuna ve Menaz, 2017). Kadın infertilite sebepleri ise; yaş, fiziksel sorunlar, hormonal bozukluklar, polikistik over sendromu (PCOS) ve endometriyosis gibi hastalıklar, obezite, genetik problemler, yaşam tarzı alışkanlıkları, idiyopatik veya endokrin fonksiyonlarını bozan pek çok kimyasal ve çevresel faktörlere maruziyet olabilmektedir (Hart, 2016; Ziv-Gal ve Flaws, 2016).

2.5. Yardımcı Üreme Teknolojileri

Yardımcı Üreme Teknolojileri (ART - Assisted Reproductive Technology), infertilite sebebiyle başarılı bir gebelik elde edememe durumuna çözüm olarak, 1978 yılından itibaren başarılı bir şekilde uygulanmaktadır ve o zamandan bu yana 7 milyondan fazla doğumla başarılı sonuç elde edilmesini sağlamıştır (Adamson, de Mouzon, Chambers, Zegers-Hochschild, Mansour, Ishihara, Banker ve Dyer, 2018). Günümüzde Yardımcı Üreme Teknolojilerine (ART) başvurulma sıklığı dünya çapında giderek artmaktadır (Farquhar ve Marjoribanks, 2018). Yardımcı Üreme Teknolojileri (ART), içerisinde pek çok farklı uygulama ve yöntem barındırmakla birlikte; en sık kullanılanları intrauterin inseminasyon (IUI), in vitro fertilizasyon (İVF), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemleridir (Nardelli, Stafinski, Motan, Klein ve Menon, 2014).

Günümüzde İVF ile embriyo transferi prosedürü oldukça standart hale gelen bir uygulama olmuştur ve birkaç temel adımdan oluşmaktadır (Farquhar ve Marjoribanks, 2018; Eugster ve Vingerhoets, 1999). Bunlar sırasıyla; bir veya birden fazla oositin olgunlaşmasını sağlamak için ilaç veya enjeksiyon uygulamaları ile ovaryumun hormonal olarak uyarılması aşaması, olgunlaşmış olan oositin ultrason kontrollü aspirasyon ile veya laparoskopi ile ovaryumdan geri çağırılması aşaması, laboratuvar koşullarında oositlerin sperm ile birleştirildiği fertilizasyon aşaması ve son olarak da fertilize olmuş oositlerin, yani embriyoların, uterusu yerleştirildiği embriyo transferi aşamasıdır (Eugster ve Vingerhoets, 1999).

İn vitro fertilizasyon (İVF), infertilite için etkili bir çözüm yöntemi olarak uygulanmakla birlikte, bazı olası riskleri içinde barındırmaktadır. Bunlardan ilki, başarılı gebelik elde etme olasılığını artırmak için uterusu tek seferde birden fazla embriyo transferinin gerçekleştirilmesine bağlı olarak ortaya çıkan çoğul gebelik durumudur. Çeşitli İVF programları neticesinde gerçekleşen doğumların %20-30'u çoğul gebelik ile sonuçlanmaktadır. Çoğul gebelik oluşumuna bağlı olarak prematüre doğum ve düşük doğum ağırlığı gibi riskler de ortaya çıkabilmektedir. İkinci ve daha önemli komplikasyon ise; oosit eldesi için ovaryumun hormonal olarak uyarılması ile ortaya çıkan Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)'dir (Eugster ve Vingerhoets, 1999; Pelinck, Hoek, Simons ve Heineman, 2002).

2.6. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu

Ovarian hiperstimülasyon sendromu (OHSS), çoğunlukla infertilite tedavilerinin bir komplikasyonu olarak, nadiren de doğal ovarian siklus sırasında ortaya çıkabilen masif ovaryen büyüme, çoklu ovaryen kistler ve kapiller geçirgenlikteki artışa bağlı intravasküler alandan üçüncül boşluğa sıvı kaşısı ile karakterize olan bir sendromdur. Bu sıvı kaşısı temel olarak abdominal boşluğa olmakla birlikte, daha ağır vakalarda plevral veya perikardiyal alana doğru da gerçekleşebilmektedir (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Güçyetmez ve Ayyıldız, 2013). OHSS gelişen vakalarda ovaryum hacimce genişlemiştir ve içi sıvı dolu foliküllerle kaplıdır. OHSS gelişimi için risk oluşturan etmenleri; genç yaş, düşük vücut kütle indeksi, çoğul gebelik oluşması, polikistik over sendromu (PCOS) varlığı, bazal serum Anti-Müllerian Hormon (AMH) düzeyinin 3,3 ng/mL'dan yüksek olması, sayıca 8'den fazla antral follikül varlığı, OHSS öyküsü ve yüksek veya hızla yükselen serum östradiol konsantrasyonu olarak saymak mümkündür (Delvigne ve Rozenberg, 2002; Tummon, Gavrilova-Jordan, Allemand ve Session, 2005; Ocal, Sahmay, Cetin, Irez, Guralp, ve Cepni, 2011; Soave ve Marci, 2014; Delvigne, 2009).

2.6.1. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromunun Sınıflandırılması

OHSS'nin klinik olarak sınıflandırılması, başlangıç zamanlarına göre erken OHSS ve geç OHSS şeklinde yapılmaktadır. Erken OHSS, ovaryumun hormonal olarak uyarılmasını takip eden 4. ile 7. gün arasında ortaya çıkan ovaryum yanıtı ile ilişkilidir ve genellikle ekzojen hCG uygulamasının akut bir sonucudur (Mathur, Akande, Keay, Hunt ve Jenkins, 2000). Öte yandan, geç OHSS, ilk 10 günlük periyottan sonra ortaya çıkan ve daha çok implante olan/olmuş embriyo tarafından üretilen endojen hCG veya luteal faz desteği olarak uygulanan hCG ile ortaya çıkmaktadır (Papanikolaou, Pozzobon, Kolibianakis, Camus, Tournaye, Fatemi, Steirteghem ve Devroey, 2006). Fiziksel semptomlar genellikle abdominal şişkinlik hissi ile başlar ve sonrasında bulantı, kusma, ishal, uyuşukluk ve iştah kaybıyla devam eder. Karın boşluğunda sıvı birikimini (asit) temsil eden nefes darlığı ve/veya azalmış idrar çıkışı öyküsü de bu süreçte ortaya çıkabilir. Klinik bulgular ise; hızlı kilo alımı, oligüri veya anüri, hemokonsantrasyon, lökositoz, hipovolemi, elektrolit dengesizliği, ascites birikimi, plevral ve perikardiyal efüzyonlar, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS - Acute respiratory distress syndrome), tromboembolik sonuca sebep olan hiperkoagülasyon ve çoklu organ yetmezliği şeklinde olabilmektedir (Whelan ve Vlahos, 2000). Ayrıca şiddetli vakalarda tromboz, emboli, inme, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ve hatta ölüm gibi ciddi komplikasyonlar da ortaya çıkabilmektedir (Eugster ve Vingerhoets, 1999; Pelinck, Hoek, Simons ve Heineman, 2002; Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Güçyetmez ve Ayyıldız, 2013). Tüm bunlara ek olarak, yapılan bazı çalışmalar ile OHSS'yi takip eden gebeliklerde artmış oranda preeklampsi ve preterm eylem riski olduğu da gösterilmiştir (Courbiere, Oborski, Braunstein, Desparoir, Noizet ve Gamerre, 2011).

İVF tedavisi sonucunda ortaya çıkan ve son yıllarda insidansı giderek artan (%1-23) OHSS'nin gelişmesine sebep olarak; kontrollü yumurtalık stimülasyonunu (COS - Controlled Ovarian Stimulation) gerçekleştirmek için kullanılan klomifen sitrat (CC), insan menopozal gonodotropin (hMG - human menopausal gonadotropin), folikül stimulan hormon (FSH), gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH - Gonadotrophin-Releasing Hormone), GnRH analogları ve insan koriyonik gonadotropin (hCG - human Chorionic Gonadotropin) gibi ajanlar öngörülmektedir. Tüm bu ajanlar arasında ise, OHSS

gelişiminde temel sorumlu olarak hCG uygulaması görülmektedir (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Güçyetmez ve Ayyıldız, 2013).

2.6.2. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromunun Patofizyolojisi

OHSS'nin patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte temel mekanizmanın, oosit olgunlaşmasını tetiklemek için uygulanan hCG'nin granuloza hücrelerinde masif lüteinizasyona sebep olması ve granuloza hücreleri tarafından vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF - vascular endothelial growth factor) salgılanması olduğu düşünülmektedir. VEGF, vasküler geçirgenlik faktörü (VPF - vascular permeability factor) olarak da adlandırılan oldukça etkili vazoaaktif bir glikoproteindir ve vasküler geçirgenlikle birlikte anjiyogenezi de artırarak OHSS'nin patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. Histamin ile karşılaştırıldığında, VEGF'in endotel geçirgenliği 50.000 kat daha fazla arttırdığı ortaya konmuştur (Roberts ve Palade, 1995) ve yapılan çalışmalar ile şiddetli OHSS durumlarının, daha yüksek VEGF seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Levin, Rosen, Cassidenti, Yee, Meldrum, Wisot ve Pedram, 1998; Namavar Jahromi, Parsanezhad, Shomali, Bakhshai, Alborzi, Moin Vaziri ve Anvar, 2018; Pellicer, Albert, Mercader, Bonilla-Musoles, Remohi ve Simon, 1999).

İnsan VEGF geni (VEGFA, OMIM 192240) kromozom 6p12 üzerinde bulunur (Zhao, Nyholt, Thomas, Treloar ve Mongomer, 2008) ve sekiz ekzondan oluşur (Busso, Garcia-Velasco, Gomez, Alvarez, Simon ve Pellicer, 2008). VEGF geni, kemirgenlerde ve insanlarda aynı ekzonik yapıyı gösterir ve aralarında %95 protein homolojisi bulundurur (Rizk, 2009). VEGF molekülü biyolojik aktivitesini, tirozin kinaz reseptör ailesine ait olan ve endotelyal hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanarak gösterir (Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman ve Schuh, 1995). VEGF için tanımlanan spesifik endotelyal hücre membran reseptörleri; VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) ve VEGFR-3'tür (Shibuya, 2011).

Flk-1/KDR reseptörü, esas olarak vasküler geçirgenlikte, anjiyogeneizde ve vaskülogenezde rol oynamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı Flk-1/KDR reseptörünü hedeflemek, jinekolojik-onkoloji alanında çalışan araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Flt-1 reseptörü ise, mevcut damarlardaki endotel hücreleri arasındaki sıkı

bağlantıların sağlanmasını ve bakımını kontrol ederek VEGF biyoaktivitesinin bir düzenleyicisi olarak işlev görür ve vasküler geçirgenliği inhibe eder (Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman ve Schuh, 1995). Flt-1 reseptörü ayrıca çözünür bir reseptör (sVEGFR-1) olarak da üretilmektedir (Kendall, Wang ve Thomas, 1996). sVEGFR-1, VEGF'yi bağlamak için tam uzunluktaki VEGF reseptörleri ile rekabet eder ve vasküler geçirgenliği inhibe etmek için Flk-1/KDR ile heterodimerize olur (Roeckl, Hecht, Sztajer, Waltenberger, Yayon ve Weich, 1998). VEGFR-3 ise, erken embriyogenezde anjiyogenezi düzenleyebilir, ancak çoğunlukla lenfanjiyogenezin kritik düzenleyicisi olarak işlev görür (Shibuya, 2011). Yapılan çalışmalar ile ovaryum foliküllerinin teka interna hücre yüzeyinde de VEGF reseptörlerinin bulunduğu (Busso, Garcia-Velasco, Gomez, Alvarez, Simon ve Pellicer, 2008) ve OHSS gelişmeyen kadınların önemli ölçüde daha yüksek sVEGFR-1 plazma seviyelerine sahip olduğu, OHSS gelişen kadınlarda ise önemli ölçüde daha yüksek miktarda VEGF ve daha düşük sVEGFR-1 seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Pau, Alonso-Muriel, Gómez, Novella, Ruiz, García-Velasco, Simon ve Pellicer, 2006).

VEGF ve OHSS arasındaki ilişkinin temel aşamalarına yakından bakılırsa; hCG uygulamasına yanıt olarak OHSS gelişen kadınlarda VEGF'nin, granüloza-lutein hücreleri ve endotel hücreleri tarafından üretildiği görülmektedir. Buna bağlı olarak, granüloza lutein hücrelerinde VEGF ve Flk-1/KDR reseptörünün mRNA ekspresyonu önemli ölçüde artış göstermektedir. VEGF daha sonra foliküler sıvıya salınarak hem otokrin hem de parakrin bir şekilde vasküler geçirgenliğin en üst seviyeye ulaşmasına sebep olmaktadır (Gomez, Soares, Busso, Garcia-Velasco, Simon ve Pellicer, 2010; Scotti, Abramovich, Pascuali, Irusta, Meresman, Tesone ve Parborell, 2014). OHSS durumunda vasküler geçirgenliğin artma sebebi, foliküler sıvıdaki VEGF'in hücreler arasındaki sıkı bağlantılardan sorumlu olan ZO-1 (zonula okludens-1) proteininin bozulmasına (Levin, Rosen, Cassidenti, Yee, Meldrum, Wisot ve Pedram, 1998) ve endotelyal klaudin-5 ekspresyonunun azalmasına (Rodewald, Herr, Duncan, Fraser, Hack, Konrad, Gagsteiger, Kreienberg ve Wulff, 2009) sebep olduğu ve böylece hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağladığı şeklinde ortaya konmuştur. Vasküler geçirgenliğin artışı sonucunda, intravasküler alandan üçüncül boşluğa sıvı kaçıışı meydana gelmektedir (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017).

OHSS gelişimi veya şiddeti üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak etkili olabilecek diğer önerilen faktörler ise; histamin, prostoglandinler, interlökin-1 β ve interlökin-6,

anjiyotensin II, ovaryum içi renin-anjiyotensin sistemi (RAS), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF – insulin-like growth factor), epidermal büyüme faktörü (EGF - epidermal growth factor), dönüştürücü büyüme faktörü-alfa ve beta (TGF- α - transforming growth factor alpha ve TGF- β - transforming growth factor beta), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF - basic Fibroblast Growth Factor), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF - platelet-derived growth factor)'dür (Gomez, Soares, Busso, Garcia-Velasco, Simon ve Pellicer, 2010; Namavar Jahromi, Parsanezhad, Shomali, Bakhshai, Alborzi, Moin Vaziri ve Anvar, 2018; Naredi, Talwar ve Sandeep, 2014; Whelan ve Vlahos, 2000).

Bunların içerisinde, histamin biyolojik olarak aktif bir mediatör olan pek çok canlı organizmada mevcuttur. Histaminler, insan vücudunda hemen hemen bütün dokularda bulunur ve çoğunlukla mast hücrelerindeki granüllerde ve beyaz kan hücreleri olan bazofiller ile eozinofillerde üretilir ve depolanır. Histaminler, inflamasyon veya aşırı duyarlılık reaksiyonlarının gelişmesi durumuna, vazodilatasyon, ödem, artmış vasküler geçirgenlik ve düz kas kasılması da dahil olmak üzere pek çok cevap oluşturulmasını sağlar (Benly, 2015). Ovaryumlardaki mast hücre sayısı ovarian siklus aşamasına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ayrıca normal siklus sırasında gerçekleşen LH (luteinleştirici hormon) pikinin hemen ardından veya İVF sikluslarındaki hCG enjeksiyonlarının hemen ardından ovaryumda histamin salınımı gerçekleştiği de bilinmektedir. Bu durum ödem ve hiperemi ile sonuçlanmaktadır (Krishna, Beesley ve Terranova, 1989). 1974 yılında yapılan bir çalışma ile sistemik histamin blokojı uygulanmasının OHSS gelişiminin engellenmesi üzerinde etkili olabileceği yönünde sonuçlar bildirilmiştir (Knox, 1974). Fakat bu sonucun tam tersini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Erlik, Friedman, Ben-David ve Paldi, 1979). Bu nedenle histaminin OHSS gelişimindeki rolü henüz kesinlik kazanmamıştır.

Tüm bu tanımlanan faktörlerin yanı sıra, 2016 yılında yapılan özgün bir çalışma ile, OHSS deney modeli oluşturulmuş olan sıçanlara tedavi edici ajan olarak Endoplazmik Retikulum Stres (ER Stres) mekanizmalarının baskılanmasını sağlayan bir kimyasal verildiğinde OHSS şiddetinde düşüş meydana geldiği ortaya konulmuştur. Bu bulgu, ER stres mekanizmalarının OHSS gelişimi üzerindeki potansiyel etkileri ile ilgili şüpheler doğurmuştur (Takahashi, Harada, Hirota, Zhao, Yoshino, Urata, Izumi, Takamura, Hirata, Koga, Wada-Hiraike, Fujii ve Osuga, 2016).

2.6.3. Ovarian Hiperstimülasyon Sendromunun Önlenmesi ve Tedavisi

Günümüzde OHSS'yi tamamen ortadan kaldıracabilecek henüz bir yöntem mevcut değildir (Namavar Jahromi, Parsanezhad, Shomali, Bakhshai, Alborzi, Moin Vaziri ve Anvar, 2018). Bu nedenle OHSS gelişiminin önlenmesine yönelik uygulamalar, yumurtalık stimülasyonu uygulamalarına tâbi tutulan tüm hastaların klinik tablolarının dikkatli bir şekilde incelenmesi ve potansiyel risk faktörlerinin belirlenmesi sonucunda oluşturulan tahminlere dayanmaktadır (Humaidan, Quartarolo ve Papanikolaou, 2010). Bu uygulamalar arasında ultrason ve serum E₂ (östrodiol) ölçme testleri kullanılarak yumurtlamanın izlenmesi, "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Delvigne ve Rozenberg, 2002).

OHSS gelişimini önlemek için uygulanabilecek yöntemler iki sınıfta toplanabilir. Bunlar birincil önleme yöntemleri ve ikincil önleme yöntemleridir. Birincil önleme yöntemlerinin temel prensibi, risk faktörlerinin değerlendirilmesinin ardından, hastalar ovarian stimülasyona düşük, normal veya yüksek yanıt verenler olarak sınıflandırılır ve hastaya uyacak şekilde stimülasyon protokolü kişiselleştirilir. Düşük ovarian yanıt veren hastalara daha yüksek ovarian yanıt verecek şekilde bir protokol uygulanırken; yüksek yanıt veren hastalara ise daha düşük bir ovarian yanıt ile ilişkili tedavi protokolleri uygulanır. İkincil önleme yöntemleri ise, ovaryumun yumurtalık stimülasyonuna aşırı yanıt vermesinden kaynaklanan risk faktörlerinin varlığında kullanılır ve tedavi döngüsü sırasında yüksek riskle ilerlemiş hastalarda OHSS'yi önlemek amacıyla ilgili yöntemler uygulanır (Humaidan, Quartarolo ve Papanikolaou, 2010).

Birincil önleme yöntemleri; uygulanan hormon dozlarının ve sürelerinin azaltılması, GnRH antagonist protokollerinin uygulanması, luteal faz desteği sağlamak için uygulanan hCG uygulamalarından kaçınma, in vitro maturasyon uygulanması, insülin direncinin ovarian fonksiyon bozukluğu rolü nedeniyle metformin gibi insülin ilişkili ajanların kullanımı şeklindedir. İkincil önleme yöntemleri ise; serum E₂ (östrodiol) seviyeleri düzelene kadar veya önemli ölçüde azalana kadar gonadotropin stimülasyonunun durdurulması ve hCG uygulamasının geciktirilmesini içeren yavaşlatma/azaltma (coasting) uygulamalarının başlatılması, hCG'nin azaltılmış dozlarda uygulanması, oositlerin/embriyoların kriyoprezervasyon işlemi ile dondurulması ve E₂ seviyelerinin düzelmesi ile uygulamalara devam edilmesidir. Ayrıca, erken OHSS'nin gelişmesini

önlemek için garantili tek yöntem olan hCG döngü iptalinin uygulanması, ovulasyonu tetiklemek için gonadotropin salgılatıcı hormon agonisti (GnRHa) ve rekombinant LH gibi alternatif ajanların kullanılması da ikincil önleme yöntemleri arasında yer almaktadır (Aboulghar, 2009; Humaidan, Quartarolo ve Papanikolaou, 2010; Namavar Jahromi, Parsanezhad, Shomali, Bakhshai, Alborzi, Moin Vaziri ve Anvar, 2018; Manno, Tomei, Marchesan ve Adamo, 2005).

OHSS'yi önlemek için kullanılan diğer olası stratejiler ise; stimülasyon sırasında ve yumurtanın alınmasından sonra GnRH antagonisti (GnRH-ant) uygulama protokolü, intravenöz albümin ve hidroksetil nişasta infüzyonu, kalsiyum glukonat infüzyonu, glukokortikoidlerin uygulanması, dopamin agonisti olan 'kabergolin' uygulanmasıdır (Aboulghar, 2009; Humaidan, Quartarolo ve Papanikolaou, 2010; Manno, Tomei, Marchesan ve Adamo, 2005). Şiddetli OHSS'li hastalarda erken dönemde GnRH antagonisti veya dopamin agonisti kullanımının yararlı etkileri olduğunu gösteren birtakım çalışmalar mevcuttur. Fakat bunların rutin kullanımları için etkinliğini gösterecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Baumgarten, Polanski, Campbell ve Raine-Fenning, 2013, Lainas, Kolibianakis, Sfontouris, Zorzovilis, Petsas, Tarlatzi ve Tarlatzis, 2012; Rollene, Amols, Hudson ve Coddington, 2009). Bu önlemler, OHSS'yi tamamen ortadan kaldırmamakta, ancak OHSS şiddetinde bir düşüş sağlamaktadır (Chen, Burmeister, Goldschlag ve Rosenwaks, 2003). OHSS'nin sebep olduğu istenmeyen sonuçları önlemek için tek başına veya yukarıdakilerle birlikte uygulanan önleyici stratejiler oluşturulmuş çeşitli çalışmalar mevcuttur. Tüm bu yaklaşımlara ek olarak, konfor hissini artırması için asit sıvı aspirasyonu da uygulanabilmektedir. Ayrıca hemokonsantrasyon sonucu tromboembolizm riskini önlemek için heparin uygulaması da önemli bir yer teşkil etmektedir (Al-Shawaf ve Grudzinskas, 2003).

Yukarıda da değinildiği gibi OHSS tedavi yöntemleri semptomatik ve deneyseldir. İlk olarak sıvı dengesini sağlamayı, plazma hacmini geri kazanmayı amaçlamaktadır. OHSS'ye karşı uygulanan koruma ve tedavi yöntemleri, hastanın klinik tablosu ve ilgili risk faktörleri göz önüne alınarak, hekimin deneyimi ve gözlemlerine dayanarak seçilmekte ve uygulanmaktadır (Al-Shawaf ve Grudzinskas, 2003). Bu yöntemler ise daha çok hastada ortaya çıkan sorunları ortadan kaldırmaya yönelik gözlemsel ve geçici süreçlere dayanmaktadır. Ayrıca hastanın bireysel tedavisi, OHSS'nin şiddetine ve herhangi bir ikincil komplikasyon varlığına göre değişiklik gösterebilmektedir. Bunların yanı sıra, siklusu

baskılamanın dışında uygulanan yöntemlerin hiçbiri tamamen verimli değildir (Delvigne ve Rozenberg). Siklus baskılama ise İVF başarısındaki düşüş ve zaman kaybı açısından verim düşüklüğü ile sonuçlanmaktadır. OHSS'nin ortaya çıkmasını önlemek için, hastanın kişisel klinik tablosunun gözlemi ile hekim deneyimini baz alan uygulamalardan ziyade, genel bir koruyuculuk etkisine sahip ajanların keşfedilmesine olan ihtiyaç büyüktür. Bu nedenle de daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar

Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID - Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs), dünya çapında oldukça sık reçete edilen ve FDA (Food and Drug Administration) onayına sahip olan bir ilaç grubudur. Bu ilaçlar antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilere sahiptir (Phillips ve Currier, 2004). Baş ve kas ağrıları, ateş, dismenore, artrit, pireksi, gut, migren ve bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca bazı vakalarda akut travma sonrası opioid amaçlı olarak da kullanılmaktadırlar (Dawood, 2006; Shekelle, Newberry, FitzGerald, Motala, O'Hanlon, Tariq, Okunogbe, Han ve Shanman, 2017; Oyler, Parli, Bernard, Chang, Procter ve Harned, 2015).

NSAID'ler için birbirinden farklı pek çok sınıflandırma biçimi mevcut olmakla birlikte, çoğunlukla kimyasal yapılarına ve seçiciliklerine göre sınıflandırılırlar. Bunlar; asetillenmiş salisilatlar, asetillenmemiş salisilatlar, propiyonik asitler, asetik asitler, enolik asitler, antranilik asitler, naftil alanin ve seçici COX-2 inhibitörleri şeklindedir (Ghlichloo ve Gerriets, 2020). Bu sınıflandırmanın yanı sıra NSAID'ler yarı ömürlerine göre de kısa ve uzun etkili olmak üzere 2 gruba ayrılırlar (Ardoin, 2006).

NSAID'lerin ana etki mekanizması, hücre zarı üzerinde yer alan siklooksijenaz enzimlerinin (Cox-1 ve Cox-2) katalitik etkisinin inhibisyonu üzerinedir. Siklooksijenaz enzimleri; araşidonik asidin tromboksanlara, prostaglandinlere (PG) ve prostasiklinlere dönüştürülmesinde rol oynar (Vane, 1971). Tromboksanlar, trombosit yapışmasında rol oynarken; prostaglandinler pro-inflamatuvar moleküllerdir ve fizyolojik ve/veya patolojik olarak ortaya çıkan anjiyogenezde ve vazodilatasyonda görev alır (Form ve Auerbach, 1983; Gately, 2000; Ghlichloo ve Gerriets, 2020; Harada, Nagy, Sullivan, Thomas, Endo, Rodan ve Rodan, 1994).

Yapılan çalışmalar ile bir prostaglandin çeşidi olan PGE₂'nin VEGF üretiminde görev aldığı (Pai, Szabo, Soreghan, Atay, Kawanaka ve Tarnawski, 2001) gösterildikten sonra, dolaylı olarak prostaglandin sentezinin bloke edilmesini sağlayan NSAID'lerin anti-anjiyogenik bir ajan olarak kullanıldığı alanlar giderek artmıştır. Ayrıca NSAID'ler üzerinde yapılan bir başka çalışma sonucunda, NSAID'lerin VEGF ile indüklenmiş vasküler geçirgenliği de azalttığı bulunmuştur (Pakneshan, Birsner, Adini, Becker ve D'Amato, 2008). Tüm bu bilgiler ışığında anti-anjiyogenik özelliklerinin ortaya konulmasıyla birlikte NSAID'ler, bilinen rutin reçete edilme sebepleri dışında, korneada, çeşitli tümör dokularında ve endometriyozisde teröpatik amaçla kullanılarak olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Fulton, 1984; Ozawa, Murakami, Tamura, Terada, Yaegashi ve Okamura, 2006). Ayrıca kolon kanseri ve Alzheimer hastalığının önlenmesinde kullanılmasına dair çalışmalar da mevcuttur (Tarnawski ve Jones, 2003). Bunlara ek olarak, NSAID'ler erken doğum eyleminde tokoliz amaçlı olarak da kullanılabilmektedirler. Ayrıca bir NSAID çeşidi olan aspirinin, antifosfolipid sendromunda düşük dozlarda uygulanması, preeklampsi ve tekrarlayan düşüklerin önlenmesinde rol oynamaktadır (Bloor ve Paech, 2013). Öte yandan infertil erkek bireylerde yapılan çalışmalar ile bir NSAID çeşidi olan rofekoksibin'in kullanımı sonrasında, sperm parametrelerinin morfoloji, konsantrasyon ve motilite açısından kalitesinin yükseldiği bildirilmiştir (Naz ve Kamal, 2017). Bir başka çalışma ile, NSAID çeşitleri olan meloksikam ve selekoksib kullanımı ile OHSS durumunda artmış olan VEGF seviyesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Çilgin, 2019; Quintana, Kopcow, Marconi, Young, Yovanovich ve Paz 2008).

2.7.1. İndometazin

İndometazin, (1-(p-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metilindol-3-asetik asit), NSAID sınıfına dahil olan bir ilaçtır ve diğer NSAID'lere benzer şekilde antipiretik, analjezik ve antiinflamatuvar özellikler gösterir. İndometazin ilk olarak 1965 yılında FDA ilaç onayı almıştır ve kapsül, rektal fitil, sürekli salınımlı formülasyonlar ve oral kullanım için süspansiyonlar olarak üretilmektedir (Nalamacho ve Wortmann, 2014). İndometazin, romatoloji alanında oldukça sık reçete edilen bir ilaç türüdür ve piyasaya sürülen birçok NSAID'in değerlendirilmesinde bir standart olarak kullanılmaktadır. İndometazinin güçlü

bir prostaglandin sentez baskılayıcısı olduğu gösterildikten sonra, romatoloji alanının dışında da pek çok durum için hem klinik ve hem de deneysel olarak kullanılmaya başlanmıştır. İndometazinin önemli klinik uygulamalarından bir diğeri ise; 1970'li yıllardan bu yana erken doğum durumları için tokolitik amaçla kullanılmasıdır. Yapılan ayrıntılı araştırmalar ve meta analiz sonuçlarına göre, olumsuz neonatal sonuçlarda indometazinin tokolitik amaçla kullanımına bağlı olarak artmış bir risk bulunmamıştır (Loe, Sanchez-Ramos ve Kaunitz, 2005). Bunların dışında indometazin; belirli neoplastik hastalıklarla ilişkili hiperkalsemi, dismenore, patent duktus arteriozus gibi durumlarda da kullanılmaktadır (Helleberg, 1981). 2008 yılında yayınlanan bir çalışma ile farklı NSAID ilaçlarının patolojik korneal neovaskülarizasyon durumu üzerine etkileri incelenmiş ve indometazinin diğer NSAID çeşidi ilaçlara kıyasla daha fazla oranda VEGF kaynaklı anjiogenezi ve vasküler geçirgenliği baskıladığı bulunmuştur (Pakneshan, Birsner, Adini, Becker ve D'Amato, 2008). Yapılan bir başka çalışmada indometazinin sıçan ayak ödeminde önemli bir inhibitör aktivite gösterdiği ve antiinflamatuar özellik sergilediği gösterilmiştir (Chatterjee, 2017).

Literatürde, indometazinin OHSS üzerine etkilerini incelemek üzerine 1970'li ve 1980'li yıllarda yapılmış olan birkaç yayın bulunmaktadır. Ancak bu yayınlar; birbiriyle çelişkili sonuçlar içermektedir ve araştırmaları günümüz imkanlarına ve incelemelerine göre oldukça yüzeysel bir seviyede kalmıştır (Borenstein, Elhalah, Lunenfeld ve Schwartz, 1989; Elchalal ve Schenker, 1997; Katz, Lancet, Borenstein ve Chemke 1984; Pride, Yuen, Moon ve Leung 1986; Schenker ve Polishuk, 1976). Biz bu çalışmamızla, indometazinin OHSS üzerindeki etkilerini biyokimyasal, yapısal ve moleküler seviyelerde ayrıntılı olarak araştırmayı ve literatürdeki mevcut çelişkili bilgilere açıklık getirmeyi amaçladık. Ayrıca yakın dönemde OHSS'nin patofizyolojisinde etkili olabileceğine dair bulgular sunulan ER stres mekanizması üzerinde indometazin kaynaklı değişiklikleri saptamayı ve OHSS ile ER stres arasında doğrudan bir bağlantı kurmayı amaçladık. Ayrıca literatürdeki çelişkili verilerden olan, mast hücrelerinin ve histaminin OHSS üzerindeki etkilerini araştırarak açıklık getirmeyi ve indometazinin OHSS semptomlarında meydana getirebileceği potansiyel değişiklikler sonrasında mast hücreleri ve histamin içeriğinde değişiklik olup olmayacağını saptamayı hedefledik. Tüm bunlara ek olarak, yaptığımız araştırma ile farklı dozlarda uygulanan indometazinin etkileri kıyaslanmış ve etkili olan dozun belirlenmesine katkı sağlanmasını amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi (Denver Instruments, SI-234, Germany)
- +4°C Buzdolabı (Bosch, KDN56NW20N, Germany)
- -80°C Buzdolabı (MELING, China)
- Buz makinesi (Scotsman AF80, Italy)
- Distile su cihazı (Nuve, ND12, Turkey)
- Otoklav (HMC Hirayama, Japan)
- pH metre (HANNA Instruments, USA)
- Sonikatör (Bandelin Ultrasonic HD2200, Germany)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich zentrifugen MIKRO 200r, Germany)
- Masaüstü santrifüj (Isolab, MCZ001267, Germany)
- Vorteks (Yellowline IKA TTS2, USA)
- Isı bloğu (Thermo Mixer, TS100, Turkey)
- Spektrofotometre (Epoch, Biotek, USA)
- Çalkalayıcı-Shaker (Shaker, Hangzhou miu instruments TS-300, China)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve, MK 318, Turkey)
- Western Blot Seti (Biorad Mini PROTEAN Tetra Cell, 552BR, USA)
- Mikropipet seti (Cleaver Scientific, UK)

- Görüntüleme cihazı (G:Box Syngene, DR4V/1309, UK)
- Sıcak Su Banyosu
- Plate Reader
- Olympus BX-50 Mikroskop (Olympus BX-50, Olympus Optical Co., Tokyo, Japonya)
- Işık mikroskobu (Olympus CX21, Japan)
- Mikrotom cihazı (Leica, RM 2135, Germany)
- Parafin cihazı (Leica, EG 1110, Germany)
- Çoklu boyama aparatı-Chamber (Biogen, USA).

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- PMSG 1000 IU (Biovendor, RP1782721000)
- hCG 1 mg (Abcam, ab51782)
- İndometazin (Cayman, 70270, USA)
- Sıçan E₂ ölçümü ELİSA kiti (Sunred, 201-11- 0175)
- Sıçan VEGF ölçümü ELİSA kiti (Sunred, 201-11- 0660)
- Sıçan VEGFR-2 ölçümü ELİSA kiti (Sunred, 201-11- 0665)
- Sıçan Histamine (HIS) ölçümü ELİSA kiti (SunRed, 201-11- 0798)
- Sıçan Albumin ölçümü ELİSA kit (Sunred, 201-11- 1235)
- Formaldehit (Tekkim, TK060160.05001)
- Etanol (Tekkim, TK200655.02501)
- Ksilol (Tekkim, TK090270.05003)
- Parafin (Tekkim, TK200661.05004)
- Entellan (Merck, M107961.0500)

- Harris Hematoksilen Boyası (Beslab, BS-001)
- Su Bazlı Eozin Boyası (Beslab, BS-013)
- Toluidine Mavisi (Chembio, CB3340.0100)
- RIPA Lizis Tamponu 10X (EMD Millipore, 20-188, Germany)
- Proteaz İnhibitör Kokteyli (BioVision, USA, K297)
- Bca Assay KIT (ABP Biosciences, P011, USA)
- Tris-Base (Sigma Life Science, T1503, USA)
- Glisin (Sigma-Aldrich, 15527, China)
- Metanol (Merck, 106009)
- Sodyum Klorür (Sigma Life Science, S3014, Germany)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Multicell, 800-100-EG, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379, France)
- 2-Merkaptoetanol (Biotech, UN2966, USA)
- Amonyum persülfat (Sigma Life Science, A3678, Japan)
- Akrilamid (Sigma Life Science, A3553, China)
- Bisakrilamid, TEMED (Sigma Life Science, T9281, China)
- Loading Dye-SDS-Page (Pagesta, 5x SDS-PAGE sample buffer, 751-00, Korea)
- Yağsız Süt Tozu (Evka)
- Filtre Kâğıdı-Whatman Kâğıdı (Cytiva, 1001-125, China)
- PVDF-Nitroselüloz promixed membran (Merck Millipore,)
- Protein Ladder (Thermo – 26619)
- ECL (Clarity Western ECL Substrate Biorad, 170-5060)
- Aktif kaspaz 3 Monoklonal Antibody (Elabscience / E-AB-22115)
- Kaspaz-12 Poliklonal Antibody (Elabscience / E-AB-64000)

- CHOP Poliklonal Antibody (Elabscience / E-AB-65670)
- Beta aktin Policlonal Antibody (Elabscience / E-AB-40338)

3.1.3. Hayvan Materyali

Çalışmada yer alan hayvan deneyleri; Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurul onayı ile (Ek 1: Etik kurul karar no: 64583101/2022/62), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi ve Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Hayvan materyali olarak; Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiş olan, immatür (22 günlük) ve ağırlıkları 40-80 gram arasında değişen 40 adet *Wistar albino* cinsi dişi sıçan kullanıldı. İmmatür sıçan kullanılacak olmasının sebebi, OHSS deney modelinin oluşturulabilmesini etkileyebilecek olan ovaryum siklusunun genç yaştaki sıçanlarda henüz başlamamış olmasıdır.

Sıçanlar; şeffaf kafesler içinde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık sirkadiyen ritimde, $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %45-60 bağıl nem koşullarına sahip odalarda tutuldu. Tüm sıçanlar standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile *ad libitum* olarak beslendi. Deney boyunca 2 günde bir sıçanların bulunduğu kafeslerin ortamı (talaş) temizlendi.

Sıçan OHSS deney modelini oluşturabilmek için; 22 günlük immatür *Wistar albino* cinsi dişi sıçanlara 4 gün boyunca 10 IU Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi ve foliküler uyarılma sağlandı. Ardından, deneyin 5. günü 30 IU hCG subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi ve oositlerin olgunlaşması sağlandı. Sıçanlarda hCG enjeksiyonu gerçekleştirildikten iki gün sonra VEGF ve Flk-1/KDR reseptörü maksimum seviyeye ulaştığı için, sıçanlar deneyin başlangıcından sonra 7. günde intraperitoneal (i.p.) 90/10 mg/kg - ketamin/ksilazin ile anestezi altına alındıktan sonra sakrifiye edildiler.

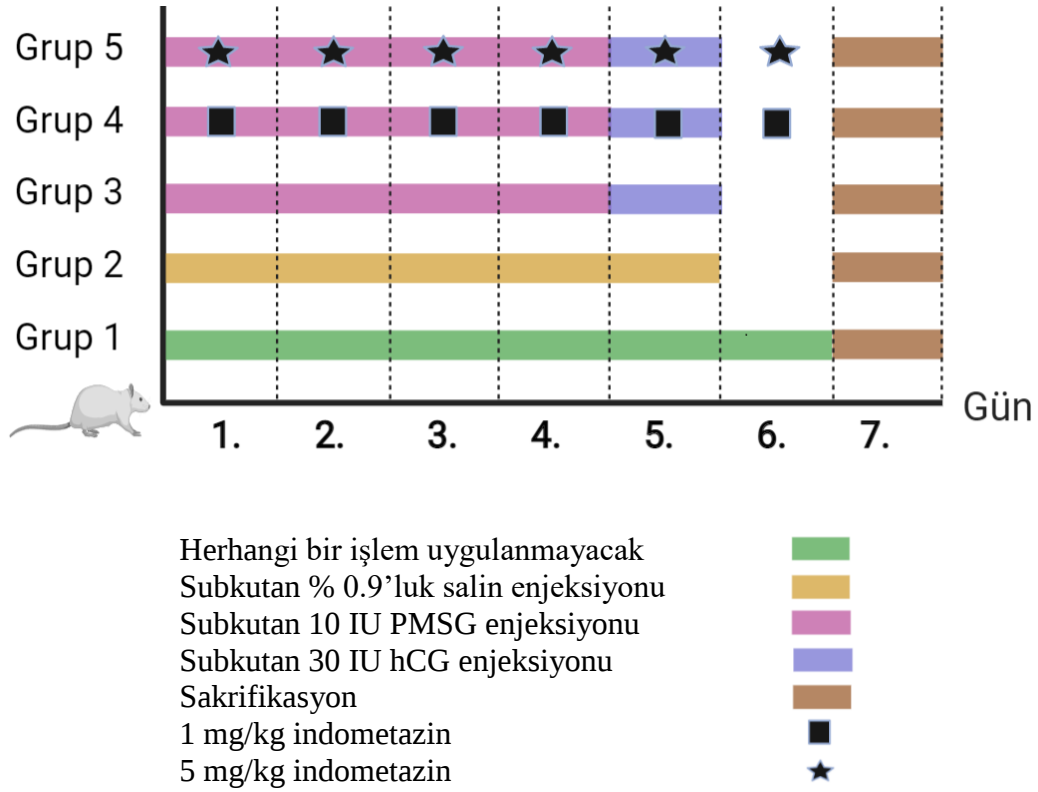
Deneyin başlangıcında ve sonunda sıçan ağırlıkları ölçüldü.

3.1.3.1. Deney Grupları ve Hayvan Deneyleri Çalışma Planı

Sıçanlar her gruba 8'er tane olacak şekilde rastgele olarak 5 gruba ayrıldılar. Deney gruplarına uygulanan işlemler Şekil 11'de özetlenmiştir.

- a. Grup 1 (Sıfır kontrol grubu): Bu gruptaki 22 günlük immatür sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmadı. OHSS modelinin başarı bir şekilde oluşturulup oluşturulmadığının kontrolü olarak kullanıldılar.
- b. Grup 2 (OHSS sham grubu): Bu gruptaki 22 günlük immatür sıçanlara, 22.-27. günler arasında (6 gün boyunca) 0.1 mL % 0.9'luk steril salin subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. (Sıçan OHSS modeli oluşturmak için kullanılacak olan hormonlar ve tedavi için kullanılan indometazin ilacı steril salin içerisinde çözdürüldükten sonra enjekte edilmektedir).
- c. Grup 3 (OHSS grubu): Bu gruptaki 22 günlük immatür sıçanlara 22.-25. günler arasında (4 gün boyunca) 0.1 mL % 0.9'luk steril salin içerisinde çözdürülmüş 10 IU Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Ardından, 26. gün, yani deneyin 5. gününde 30 IU hCG subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi.
- d. Grup 4 (OHSS ve 1mg/kg indometazin grubu): Bu gruptaki 22 günlük immatür sıçanlara 22.-25. günler arasında (4 gün boyunca) 0.1 mL % 0.9'luk steril salin içerisinde çözdürülmüş 10 IU Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Ardından, 26. gün, yani deneyin 5. gününde 30 IU hCG subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Uzun süreli tedavi etkilerini gösterebilmek için 22.-27. günler arasında (6 gün boyunca) 1mg/kg indometazin subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi.
- e. Grup 5 (OHSS ve 5mg/kg indometazin grubu): Bu gruptaki 22 günlük immatür sıçanlara 22.-25. günler arasında (4 gün boyunca) 0.1 mL % 0.9'luk steril salin içerisinde çözdürülmüş 10 IU Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Ardından, 26. Gün, yani deneyin 5. gününde 30 IU hCG subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. Uzun süreli tedavi etkilerini

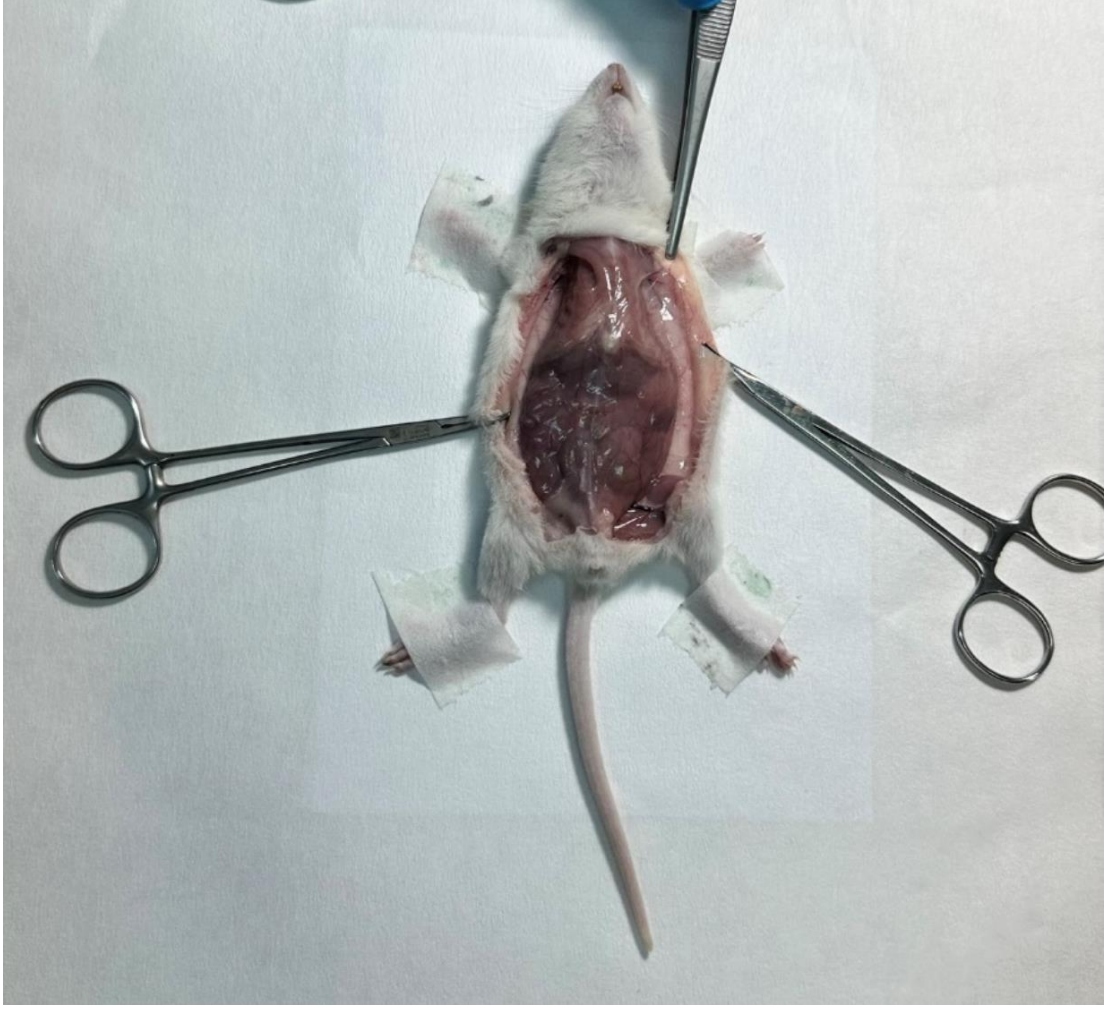
gösterebilmek için 22.-27. günler arasında (6 gün boyunca) 5mg/kg indometazin subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi.



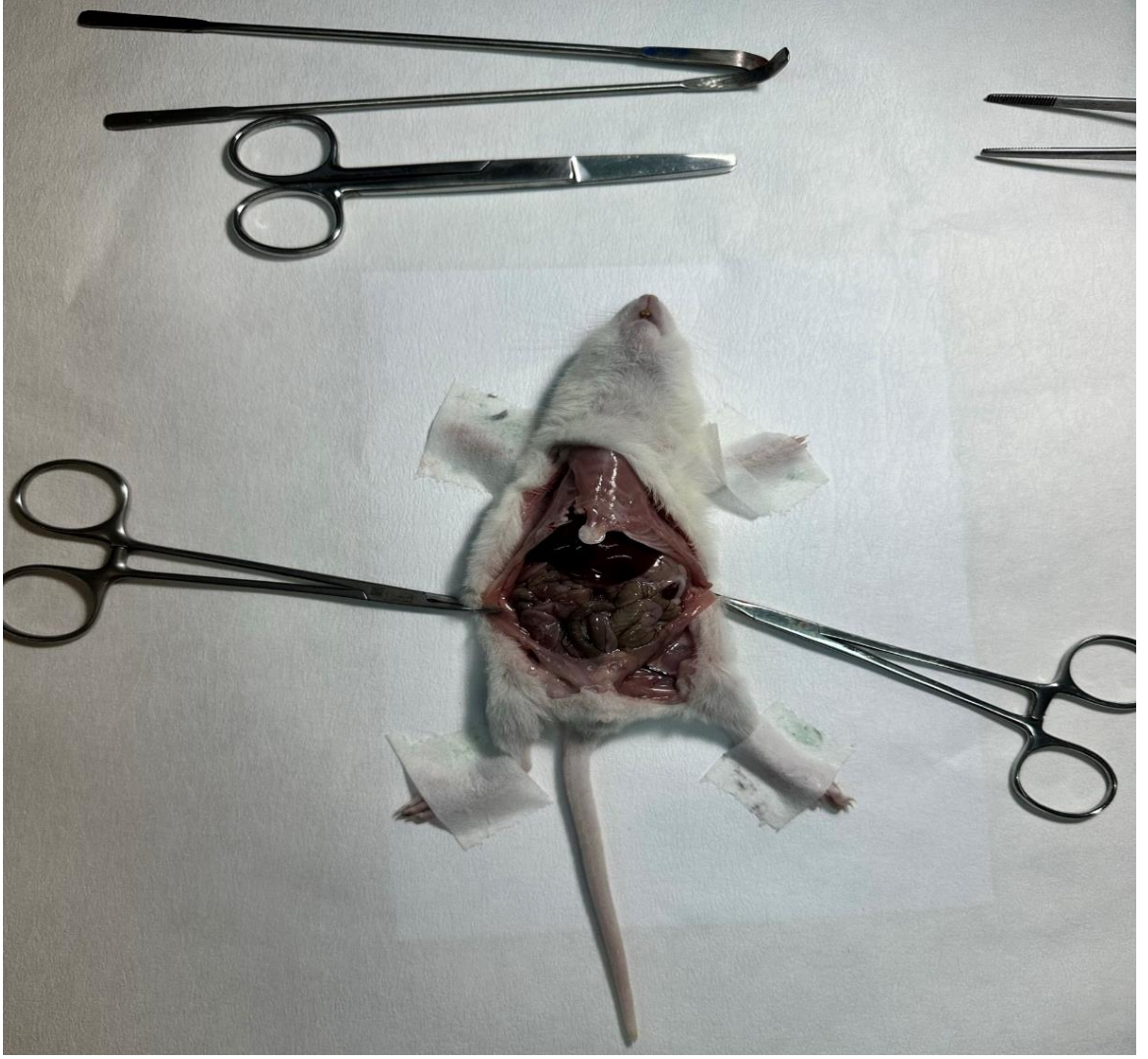
Şekil 11. Deney gruplarının sembolize görüntüsü

3.1.3.2. Hayvan Deneylerinin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması

Deneyin 7. gününde; sıçanlara intraperitoneal (i.p.) 90/10 mg/kg - ketamin/ksilazin enjeksiyonu ile genel anestezi altına sıçanlarda 'pedal refleksi' test edildikten sonra sıçanlar abdominal bölgeden temiz kesiler ile diseke edildi ve laparotomi işlemi (Resim 1. ve Resim 2.) gerçekleştirildi. Ardından 2 mL % 0.9'luk steril salin ile peritoneal lavaj (Resim 3.) yapıldı. 2 mL % 0.9'luk steril salin peritoneal kaviteye verildikten sonra 30 saniye masaj yapıldı ve mikropipet yardımıyla periton sıvısı dikkatlice geri toplandı (Resim 4. ve Resim 5.). Toplanan periton sıvıları, etiketlenmiş olan ependorf tüplere aktararak ileri biyokimyasal analizler için -80°C'da saklandı.



Resim 1. Sıçanların abdominal bölgeden temiz kesiler ile diseke edilmesi



Resim 2. Laparotomi işlemi



Resim 3. 2 mL % 0.9 steril salin ile peritoneal lavaj işlemi



Resim 4. Periton masajı



Resim 5. Peritondaki toplam sıvının mikropipet yardımıyla geri toplanması

Sıçanlar genel anestezi altındayken, yeşil uçlu 10 mL'lik enjektör yardımıyla kalpten 2-3 mL kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri sarı kapaklı kan tüplerine; enjektörün ucu ve sarı kan tüpünün kapağı çıkarılarak ve enjektör kan tüpünün çeperinde döndürülerek yavaşça aktarıldı. Kan örnekleri 15-20 dakika içerisinde 3.000 rpm'de 10 dakika +4°C'da santrifüj edildi (Resim 6.). Elde edilen serum örnekleri etiketlenmiş olan ependorf tüplere aktararak ileri biyokimyasal analizler için -80°C'da saklandı.



Resim 6. Santrifüj sonrası elde edilen serum görüntüsü

Sıçanlar, peritoneal lavaj işlemi gerçekleştirildikten ve kalpten kan alma işlemi tamamlandıktan sonra, halen genel anestezi altında iken kalpten toplam kan alımı ile sakrifikasyon gerçekleştirildi.

Sakrifiye edilen sıçanların bilateral ovaryum dokuları çıkarılarak ağırlıkları tartıldı ve büyüklükleri fotoğraflandı. Ardından sol over dokuları alüminyum folyoya sarılarak sıvı azota atıldı. Böylelikle hızlı bir dondurma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonrasında ise western blot ve doku ELISA analizleri gerçekleştirilene dek -80°C'a kaldırılarak saklandı. Sağ over dokuları ise histolojik incelemelerde kullanılmak üzere doku kasetine aktararak %10'luk nötral formaldehit içerisinde tespit edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kimyasalların Hazırlanması

3.2.1.1. %10'luk Tamponlanmış Nötral Formalin (pH=7.0)

- 100 mL Formaldehit
- 900 mL Distile su
- 4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 6.5 g Na_2HPO_4

3.2.1.2. Western Blot Yöntemi için Hazırlanan Tamponlar

Tris (1M):

- 60,55 g Tris-Base
- 500 mL Distile su
- pH 6,8'e ayarlandı

Tris (1,5M):

- 90,08 g Tris-Base
- 500 mL Distile su
- pH 8,8'e ayarlandı

Sodyum dodesil sülfat (SDS):

- 10 g SDS
- 100 mL Distile su

Tris Buffered Saline (TBS):

- 6,05 g Tris-HCl
- 8,76 g NaCl
- 1000 mL Distile su
- pH 7,6'ya ayarlandı.

Amonyum Persülfat :

- 0,1 g Amonyum persülfat (APS)
- 1 mL Distile su

Akrilamid–Bisakrilamid:

- 30 g Akrilamid
- 0,8 g Bisakrilamid
- 100 ml Distile su

Yürütme Tamponu (10X):

- 30,3 g Tris Base
- 144 g Glisin
- 10 g SDS
- 1000 mL Distile su

Yürütme Tamponu (1X):

- 100 mL Yürütme tamponu (10X)
- 900 mL Distile su

Transfer Tamponu:

- 3,03 g Tris-Base

- 14,4 g Glisin
- 200 mL Metanol
- 2 ml SDS (%10)

Yıkama tamponu / TBST:

- 1000 mL TBS
- 1 mL Tween 20

Bloklama Tamponu (%5):

- 5 g süt tozu
- 100 mL TBS

Strip Tamponu:

- %2 SDS
- 62,5 mM Tris (pH:6,8)
- 100 mM β -Merkaptoetanol

3.2.2. Doku Örneklerinde Histokimyasal İncelemeler

3.2.2.1. Doku Takibi ve Bloklama

Sıçanların sağ overleri ile histokimyasal doku takibi işlemi gerçekleştirildi. Bunun için dokular %10'luk nötral formaldehitte tespit edildikten sonra, bir gece (17 saat) akar su altında yıkandı. Ardından ise aşağıdaki tabloda (Tablo 1) gösterilen doku takip yöntemi uygulandı.

Tablo 1. Doku takip protokolü

KULLANILAN KİMYASAL	SÜRE
%50'lik Etanol	1 Saat
%70'lik Etanol	1 Saat
%80'lık Etanol	1 Saat
%96'lık Etanol	1 Saat
%96'lık Etanol	1 Saat
%100'lük Etanol	1 Saat
%100'lük Etanol	2 Saat
Ksilen (Oda Isısında)	30 Dakika
Ksilen (Etüvde)	45 Dakika
Ksilen (Etüvde)	30 Dakika
Sıvı Parafin (Etüvde)	1,5 Saat
Sıvı Parafin (Etüvde)	1,5 Saat
Bloklama	

Elde edilen parafin bloklar +4°C'da saklanmıştır.

3.2.2.2. Parafin Bloklardan Kesit Alma

Elde edilen parafin bloklardan rotari mikrotom yardımıyla (Resim 7.), aynı yapının iki kez değerlendirilmeye alınmasını önlemek için 50 µm aralıklarla, 4 µm kalınlığında kesitler alınarak lama aktarıldı (Woodruff, 1988). Her gruba ait en az 6 sıçandan ve her bir sıçandan en az 6'şar farklı kesit alınarak inceleme yapıldı.



Resim 7. Rotari mikrotom ve su banyosu

3.2.2.3. Alınan Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması

4 µm kalınlığında alınan kesitler 40°C'deki su banyosuna aktarılarak parafin kesitlerin açılması sağlandıktan sonra lama aktarılarak kurumaya bırakıldılar. Ardından kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece etüvde (60°C) bekletildikten sonra ksilol ile deparafinizasyon işlemine devam edilerek aşağıdaki tabloda (Tablo 2) gösterilen boyama protokolü kullanıldı. Kullanmış olduğumuz Eozin solüsyonu su bazlı olduğu için, öncelikle mevcut eozin solüsyonundan çalışma solüsyonu hazırlandı. Bunun için; her 100 mL Eozin solüsyonu içerisine 0.5 mL glacial asetik asit eklendi.

Tablo 2. Hematoksilen-Eozin ile Boyama Protokolü

KULLANILAN KİMYASAL	SÜRE
Ksilen	10 Dakika
Ksilen	10 Dakika
%100'lük Etanol	1 Dakika
%96'lik Etanol	1 Dakika
%80'lik Etanol	2 Dakika
%70'lik Etanol	4 Dakika
Akarsu	5 Dakika
Hematoksilen	2-7 Dakika
Akarsu	3-5 Dakika
Eozin Y (Su bazlı)	2-4 Dakika
Akarsu	2 Dakika
%50'lik Etanol	1 Dakika
%70'lik Etanol	1 Dakika
%80'lik Etanol	1 Dakika
%100'lük Etanol	30 Saniye
Ksilen	10 Dakika
Ksilen	10 Dakika
Entellan ile kapatma	

3.2.2.4. Alınan Kesitlerin Toluidin Mavisi ile Boyanması

Toluidin mavisi ile boyama işlemi dokuda yer alan ve metakromazi gösteren mast hücrelerinin konumu, sayısı ve boyanma yoğunlukları açısından değerlendirilebilmesi için yapıldı. Toluidin mavisi ile çalışma solüsyonu hazırlamak için, öncelikle 0.5 g NaCl 50 mL distile su içerisinde çözdürüldü (%1 NaCl solüsyonu). pH derecesi 2.0-2.5 arasında olacak şekilde HCl eklenerek ayarlandı. Ardından %1'lik toluidin mavisi stok solüsyonundan 5 mL ve %1'lik NaCl solüsyonundan 45 mL alınarak toluidin mavisi çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon her çalışma sırasında taze olarak hazırlanıp tüketildi. Burada önemli olarak çalışma solüsyonunun pH derecesinin, boyamada kontrast oluşturabilmek için, 2.5'ten düşük olmasına dikkat edilmiştir.

Boyama işlemine geçildiğinde ise; lama aktarılan 4 µm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon işlemi için bir gece etüvde (60°C) bekletildi. Ardından uygulanan adımlar Tablo 3.'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Toluidin Mavisi ile Boyama Protokolü

KULLANILAN KİMYASAL	SÜRE
Ksilen	10 Dakika
Ksilen	10 Dakika
%100'lük Etanol	30 Saniye
%100'lik Etanol	30 Saniye
%95'lik Etanol	30 Saniye
dH ₂ O	3-4 Dakika
Toluidin Mavisi	3 Dakika
Akarsu	1 Dakika
Akarsu	1 Dakika
%95'lik Etanol	5 Sefer Daldırma Çıkarma
%100'lük Etanol	5 Sefer Daldırma Çıkarma
Ksilen	7 Dakika
Ksilen	7 Dakika
Entellan ile kapatma	

3.3. Biyokimyasal İncelemeler

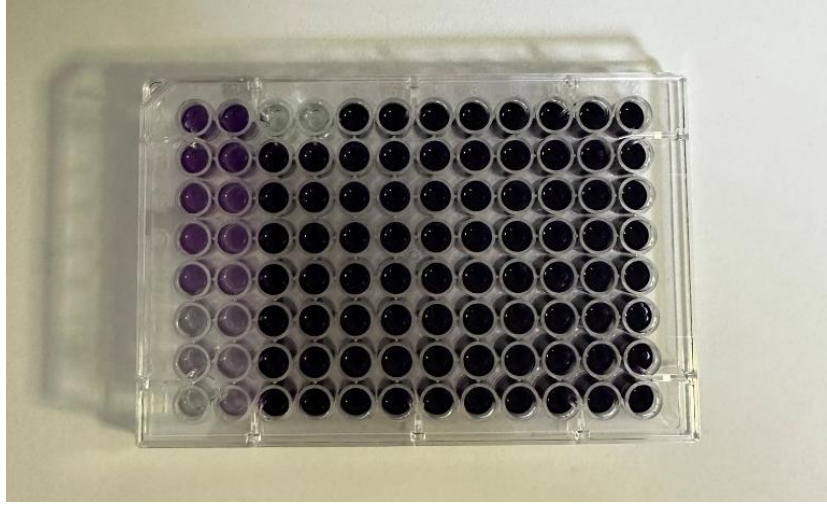
-80°C’de, uygun koşullar altında muhafaza edilmiş olan serum, periton sıvısı ve doku örnekleri kullanılarak ilgili proteinlerin miktarı ELISA yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle örneklerle BCA protein analizi yapılarak toplam protein miktarları tayin edildi.

3.3.1. BCA Analizleri

BCA protein analizleri için ABP Biosciences, P011 katalog numaralı kit kullanıldı.

Serum ve periton sıvısı örnekleri ek bir işleme tâbi tutulmazken, doku örneklerinden BCA analizini ve ELİSA deneylerini yapmadan önce protein izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Bunun için, ovaryum dokuları içerisinde buz olan bir kutuya alındı ve temiz bir beher içerisinde serum fizyolojik kullanılarak güzelce temizlendi. Ardından dokulardan fazla suyu uzaklaştırıp tartma işlemi gerçekleştirildi. Doku ağırlığının 5 katı hacimde olacak şekilde RIPA tamponu ve proteaz inhibitör kokteyl karışımı eklendi. Buz üzerinde ufak bir mekanik parçalama gerçekleştirildikten sonra, sonikatör yardımıyla homejenizasyon gerçekleştirildi. Ardından örnekler 16.000 g’de 10 dakika 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice alınarak -80°C’ye kaldırıldı.

Over dokusundan protein izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, serum, periton sıvısı ve doku örneklerinin spektrofotometrenin okuma aralığına girebilmesi için uygun seyreltme miktarı tayin edildi. Bunun için tüm örnekler farklı derecelerde seyreltilerek, 5 kat (5X), 10X, 15X, 20X, 30X, 40X, 45X, 50X, 55X, 60X, farklı örnek çeşitleri için ideal olan seyreltme oranları saptandı (Resim 8.).

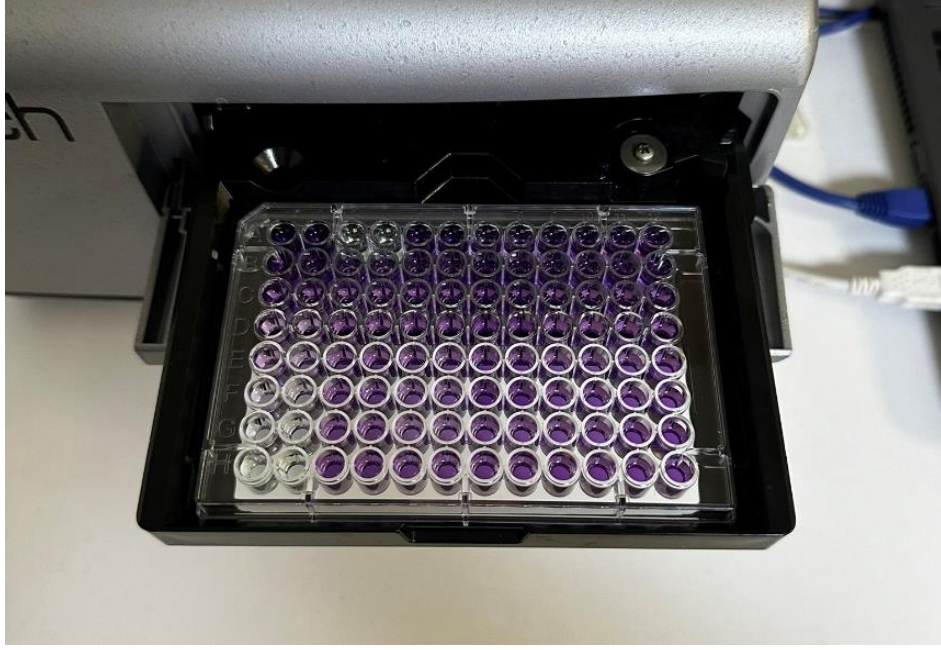


Resim 8. Uygun derece seyreltme uygulanmamış olan ve spektrofotometrenin okuma aralığı dışında olan örneklerin görüntüleri.

BCA protein analizi kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle, 50 birim A solüsyonu ile 1 birim B solüsyonu karıştırılarak BCA çalışma solüsyonu hazırlandı. Ardından BCA protein standartları ilgili oranlarda seyreltilerek farklı konsantrasyona sahip protein örnekleri elde edildi. 96 kuyucuklu plate içerisinde her bir standarttan ve örnekten ikişer tekrar olacak şekilde 20 μ L eklendi. Bunun üzerine 200 μ L BCA çalışma solüsyonu eklendi ve 30 saniye çalkalandı. 96 kuyucuklu plate'in üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından plate soğuduktan sonra spektrofotometrede 562 nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

Bu işlemin sonunda; serum ve doku örnekleri için ideal seyreltme oranının 50X, periton sıvısı için ideal seyreltme oranının ise 5X olduğu saptandı.

Bu oranlar saptandıktan sonra, 50X seyreltilmiş serum ve doku örnekleri ile 5X seyreltilmiş periton sıvısı örnekleri ile tekrar BCA analizi yapılarak çıkan değerler (μ g/mL birimi ile) kaydedildi ve grafik eğrileri oluşturuldu (Resim 9.).



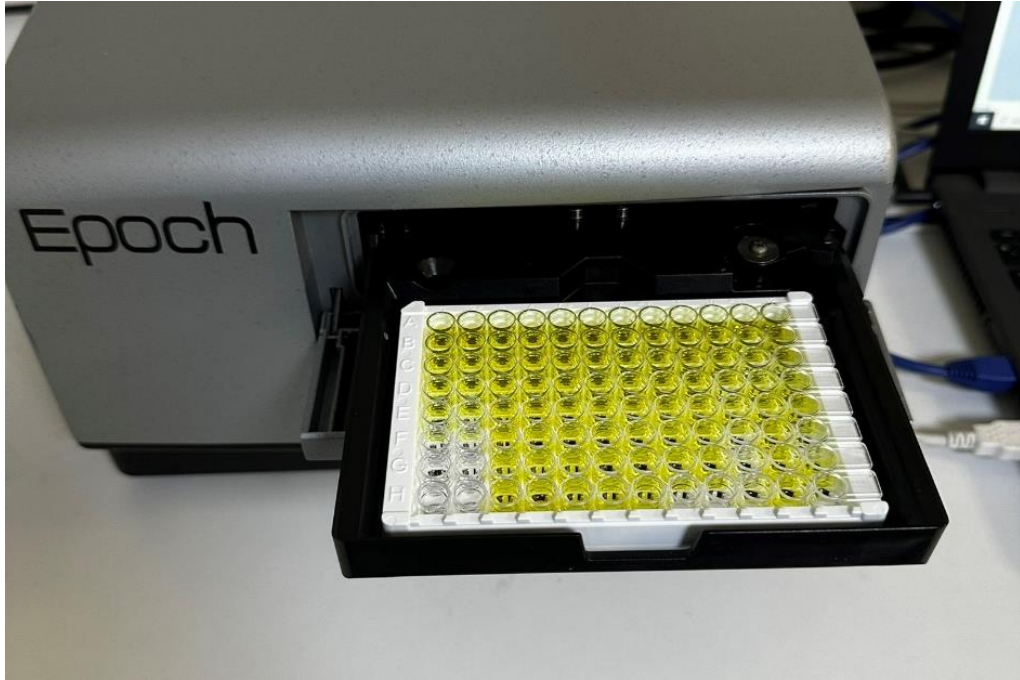
Resim 9. Uygun oranlarda seyreltilmiş olan örneklerin BCA analizi öncesi görüntüleri

3.3.2. ELİSA Deneyleri

ELİSA deneyleri, kullanılan kitlerin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Serum Histamin miktarının analizi için; SunRed marka 201-11- 0798 katalog numaralı, serum VEGF miktarının analizi için; SunRed marka 201-11- 0660 katalog numaralı, serum ve doku VEGF-R2 miktarının analizi için; SunRed marka 201-11- 0665 katalog numaralı, serum ve doku E₂ miktarının analizi için; SunRed marka 201-11- 0175 katalog numaralı, periton sıvısı ve doku albumin miktarının analizi için; SunRed marka 201-11- 1235 katalog numaralı ELİSA kitleri kullanıldı.

Kitlerin protokolleri birbirine oldukça benzerdi. BCA analizlerinde olduğu gibi her bir örnek iki tekrar olacak şekilde çalışıldı. Protokollerin aşamaları kısaca; her bir kitin kendi protein standartları, ilgili oranlarda seyreltme gerçekleştirilerek hazırlandı. Ardından standartların eklendiği kuyucuklara; 50 μ L protein standardı, 50 μ L streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Test kuyucuklarına ise; 40 μ L ilgili oranlarda seyreltilmiş olan örnekler, 10 μ L ilgili antikor ve 50 μ L streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Bu aşamada, 96 kuyucuklu plate üzerinde boş kuyucuk içine herhangi bir madde eklenmedi. Örneklerin

üzeri kapatıldıktan ve hafifçe çalkalandıktan sonra 37°C’de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bittikten sonra kuyucuklardaki solüsyonlar dököldü. Ardından 30 kat seyreltilmiş olan yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 3 tekrar halinde yıkandı. Kuyucuklarda kalan tüm damlacıklar uzaklaştırıldıktan sonra, tüm kuyucuklara (boş kuyucuklar da dahil) 50’şer μL A ve B kromojen solüsyonları eklendi. Işıktan uzak tutabilmek için 96 kuyucuklu plate alüminyum folyoya sarılarak 37°C’de 10 dakika boyunca inkübe edildi. İşlem tamamlandıktan sonra tüm kuyucuklara (boş kuyucuklar da dahil) 50 μL reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi. Böylece mavi rengin sarıya dönüşümü gerçekleştirildi (Resim 10.) ve spektrofotometrede 450 nm’de ölçüm gerçekleştirildi. Çıkan değerler kaydedildi ve grafik eğrileri oluşturuldu.



Resim 10. Spektrofotometrede 450 nm’de ölçüm öncesi sarı renge dönmüş olan örnekler

Ardından, μg ’daki ilgili protein miktarının hesaplanması için ilgili protein/BCA oranları kendi birimlerine uygun olarak hesaplandı. Bunun sonucunda elde edilen birimler; Histamin için, $\mu\text{g}/\mu\text{g}$; VEGF için, $\text{pg}/\mu\text{g}$; VEGFR-2 için, $\text{ng}/\mu\text{g}$; E₂ için, $\text{pg}/\mu\text{g}$; albümin için ise $\text{mg}/\mu\text{g}$ olarak saptandı.

3.4. Western Blot

Sol ovaryum dokularından izole edilen proteinler, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel) jel elektroforezi ile moleköl ağırlıklarına göre ayrıldı. Ardından jel üzerindeki proteinler bir poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı ve birincil antikolar aktif kaspaz 3, kaspaz 12, CHOP ve beta-aktin ile muamele edildi. Bu proteinler niteliksel olarak analiz edildi.

3.4.1. Over Dokusunun Homejenizasyonu ve Protein İzolasyonu

Ovaryum dokuları, içerisinde buz olan bir kutuya alındı ve temiz bir beher içerisinde serum fizyolojik kullanılarak güzelce temizlendi. Ardından dokulardan fazla suyu uzaklaştırıp tartma işlemi gerçekleştirildi. Doku ağırlığının 5 katı hacimde olacak şekilde RIPA tamponu ve proteaz inhibitör kokteyl karışımı eklendi. Buz üzerinde ufak bir mekanik parçalama gerçekleştirildikten sonra, sonikatör yardımıyla homejenizasyon gerçekleştirildi. Ardından örnekler 16.000 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice alınarak -80°C'ye kaldırıldı.

Tüm örnekler her seferinde jele yüklenmeden önce -80°C'den çıkartıldıktan sonra 13.000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edildi.

3.4.2. İzole Proteinler ile BCA Analizi ve Seyreltmeler

BCA protein analizleri için ABP Biosciences, P011 katalog numaralı kit kullanıldı. Ovaryum dokularından protein izolasyonu gerçekleştirildikten sonra kit protokolüne uygun olacak şekilde BCA analizi gerçekleştirildi.

Bunun için öncelikle, 50 birim A solüsyonu ile 1 birim B solüsyonu karıştırılarak BCA çalışma solüsyonu hazırlandı. Ardından BCA protein standartları ilgili oranlarda seyreltilerek farklı konsantrasyona sahip protein örnekleri elde edildi. 96 kuyucuklu plate içerisinde her bir standarttan ve örnekten ikişer tekrar olacak şekilde 20 µL eklendi. Bunun

üzerine 200 µL BCA çalışma solüsyonu eklendi ve 30 saniye çalkalandı. 96 kuyucuklu plate'in üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından plate soğuduktan sonra spektrofotometrede 562 nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

3.4.3. SDS-PAGE Jel Dökme, Örnek Yükleme ve Yürütme

SDS-PAGE jel elektroforezini gerçekleştirmek için kullanılan alt ve üst jelin içerikleri şöyledir:

Üst Jel (%4):

- 5,4 dH₂O
- 1 ml Akrilamid/Bis
- 0,945 mL 1M Tris, pH:6,8
- 75 µL SDS
- 75 µL APS
- 7,5 µL TEMED

Alt Jel (%12):

- 3 mL dH₂O
- 4 mL Akrilamid/Bis
- 3 mL 1,5M Tris, pH:8,8
- 120 µL SDS
- 50 µL APS
- 6 µL TEMED

Alt jel elektroforez düzeneğindeki cam levhalara döküldükten sonra jelin üzeri 300 µL isopropanol ile kaplanarak jelin yüzeyinin pürüzsüz olması sağlandı. Alt jel donduktan sonra isopropanol filtre kâğıdı kullanılarak uzaklaştırıldı ve alt jelin üzerine üst jel döküldü. Üst jel döküldükten hemen sonra 7 kuyucuklu 1,0 mm'lik tarak üst jele yerleştirilerek jelin donması beklendi (Resim 11). Donma işlemi gerçekleştikten sonra, jel hâla cam levhalar

içerisinde ve tarak takılı iken saklama kabına yerleştirildi ve üzerine yeterli miktarda yürütme tamponu (1X) eklenerek bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Bir gece sonra üst jeldeki taraklar dikkatlice çıkarıldı ve jel, örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirildi (Resim 11.).



Resim 11. Jel döküldükten sonra donma aşaması

-80°C 'den çıkarılan örnekler jele yükleme yapmadan önce 13.000 rpm'de 5 dk 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her örneğin üzerinde 6 μL yükleme boyası eklendi ve 10 saniye vorteks yapılarak 96°C 'de 5 dk, ısı bloğu kullanılarak proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Örnekler denatürasyon sonrası tekrar vorteks ve kısa bir spin (çöktürme) yapıldı ve jele yüklenecek hâle gelmesi sağlandı. İlk ve son kuyucuklara 4 μL protein marker, diğer kuyucuklara ise örnekler grup sırasıyla 40 μg olacak şekilde yüklendi. Elektroforez 90 V'da başlatıldı ve üst jeli geçene kadar (15-20 dk) yürütüldü. Elektroforezin alt jele gelmesiyle 100 V'da ve 1,5-2 saat yürütüldü.

3.4.4. SDS-PAGE Jelin Membrana Transfer Edilmesi, Blotlama

Jelde yürütülerek molekül ağırlığına göre ayrılmış olan proteinlerin PVDF membrana transfer işleminin yapılabilmesi için transfer sandviçi hazırlandı. Öncelikle transfer havuzu içerisine transfer tamponu eklendi. Havuzun içerisinde, transfer sandviçinin siyah yüzü altta

kalacak şekilde yerleştirildi ve sırasıyla üzerine sünger, whatman kâğıdı (filtre kâğıdı), jel, PVDF-nitroselüloz membran (membran, %100 metanolle 5 dk bekletilerek aktifleşmesi sağlandı), whatman kâğıdı ve sünger yerleştirildi ve bu aşamaların her birinde rulo aparatı kullanılarak hava kabarcığı oluşumunun engellenmesi sağlandı. Son olarak da transfer sandviçinin gri yüzü üste gelecek şekilde kapatılarak kilitlendi ve sandviğin siyah yüzü transfer kasedinin siyah yüzüne gelecek şekilde yerleştirildi. Kaset tank içerisine yerleştirilirken “+” ve “-” yönlerine dikkat edildi. Tankın içerisine transfer solüsyonu ve buz aküsü eklendi, +4°C’de, 70V’da, 2 saat transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.4.5. Membranın Bloklanması, Primer ve Sekonder Antikor ile Muamele Edilmesi ve Görüntülenmesi

Proteinlerin PVDF membrana transfer işlemi tamamlandıktan sonra, membran özel western blot kabına alındı ve üzerine taze hazırlanmış 10 mL blocking solüsyonu eklenerek, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Blocking solüsyonu üzerine primer antikor (aktif kaspaz 3 (1:500); kaspaz 12 (1:1000); CHOP (1:1000) ve beta-aktin (1:500)) eklenerek, çalkalayıcı üzerinde 1 gece +4°C’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında membran, yıkama tamponu (wash buffer, TBST) ile 5’er dk boyunca 6 defa çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Membran üzerine tekrar taze 10 mL blocking solüsyonu ile ilgili primer antikora göre anti-mouse IgG, HRP-linked sekonder antikor (1:5000) veya anti-rabbit IgG, HRP-linked sekonder antikor (1:5000) eklendi. Çalkalayıcı tabla üzerinde, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası membran, yıkama tamponu ile 5’er dk boyunca 6 defa çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Yıkama sonrası membran üzerine ECL solüsyonundan (1:1) 1 mL eklenerek 10-15 dk beklendi ve western blot görüntüleme cihazında görüntü alındı. Görüntüleme sonrasında housekeeping protein olarak kullanılan beta aktin görüntüsü almak için membran, stripping buffer ile 30 dk, oda sıcaklığında inkübe edildi ve yıkama tamponu ile yıkama işlemi tekrar edilip, block solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat blokladı. Block solüsyonu üzerine Beta aktin antikor eklenerek, 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Inkübasyon sonrası membran tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandı ve tekrar block solüsyonu eklenip, üzerine sekonder anti-mouse IgG, HRP-linked antikor (1:5000) (Cell Signaling, 7076S, Netherlands) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Son

olarak yıkama tamponu ile yıkama yapıldı ve membran üzerine ECL solüsyonu eklenerek görüntü alındı.

3.5. İstatistiksel Analiz

Veri analizi için IBM SPSS Statistics Version 22 (Sürüm tarihi:2014, Chicago, ABD) kullanıldı. Örneklerin normal dağılım gösterip göstermediğini saptamak için; kullanılan örnek sayısı 30 ve fazlası ise Kolmogorov Smirnov testi; kullanılan örnek sayısı 30 ve altı ise Shapiro Wilk testi uygulandı. Parametrik (normal) dağılım gösteren değerlere One Way ANOVA testi ile normal dağılım göstermeyen non-parametrik değerlere Kruskal-Wallis testleri uygulandı. Bonferroni düzeltmesi uygulandıktan sonra, elde edilen p değerleri dikkate alınarak gruplar arası karşılaştırmalarda $p < 0,05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edildi. One Way ANOVA ile analiz edilen parametrik verilerin varyanslarının homojenitesi, Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılık varyansları homojen olan parametrik veriler ($p > 0,05$) Tukey post hoc; varyansları homojen olmayan parametrik veriler ise ($p < 0,05$) Tamhane testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hayvan Ağırlık Değişimleri ve Ovaryum Ağırlıkları Bulguları

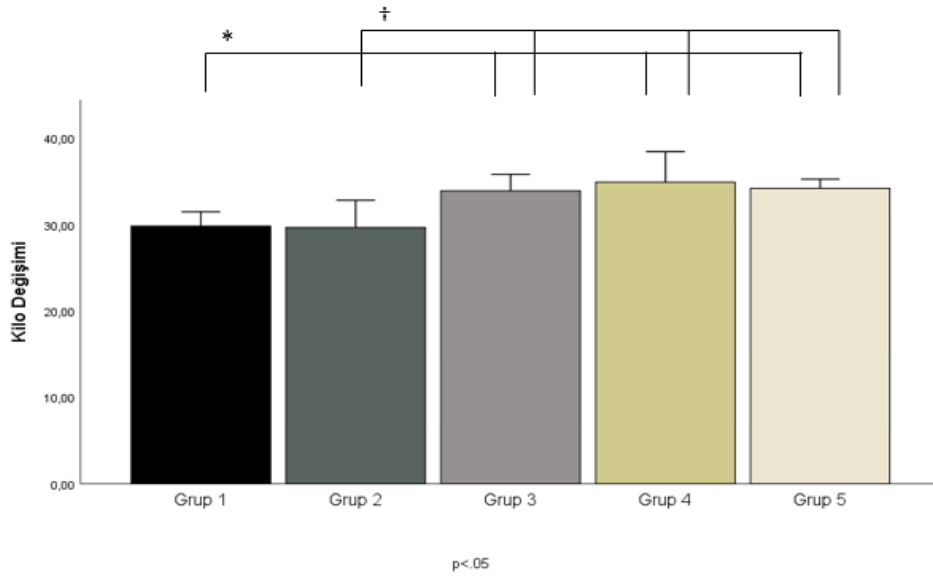
4.1.1. Hayvan Ağırlık Değişimleri

Hayvan deneyleri süresince, beklenmeyen bir hayvan kaybı yaşanmadı. Bu süreç içerisinde tüm sıçanların, hem deney başlangıcında ve hem de deneylerin sonunda olmak üzere vücut ağırlıkları ölçüldü. Gruplara ait sıçanların, ağırlık değişimlerinin ortalamasına ve standart sapma değerlerine ait betimsel istatistikler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Gruplara ait sıçan ağırlık değişimlerinin ortalama ve standart sapma değerleri, n=7

GRUPLAR	ORTALAMA $\pm$ STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	29,82 $\pm$ 1,33 g
OHSS Sham Grubu	29,68 $\pm$ 2,52 g
OHSS Grubu	33,90 $\pm$ 1,54 g
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	34,92 $\pm$ 2,83 g
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	34,20 $\pm$ 0,84 g

Deneyin başlangıcı ile sonunda meydana ağırlık değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını değerlendirmek için öncelikle normalite dağılımı test edildi. Verilerin normal dağılım gösterdiği saptandıktan sonra One Way ANOVA testi ile incelenmesi gerçekleştirildi. Ağırlık değişimi ortalama puanlarının gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görüldü. Varyansların homojenliğinin incelendiği Levene Testinin anlamlı çıkmaması nedeniyle varyans homojenliğinin sağlandığı söylenebilmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Tukey post hoc testine göre sonuçlar Şekil 12'de gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 12. Gruplara ait sıçan ağırlık değişimlerinin karşılaştırılması. Grup 1 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5; Grup 2 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5 arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

4.1.2. Ovaryum Ağırlıkları

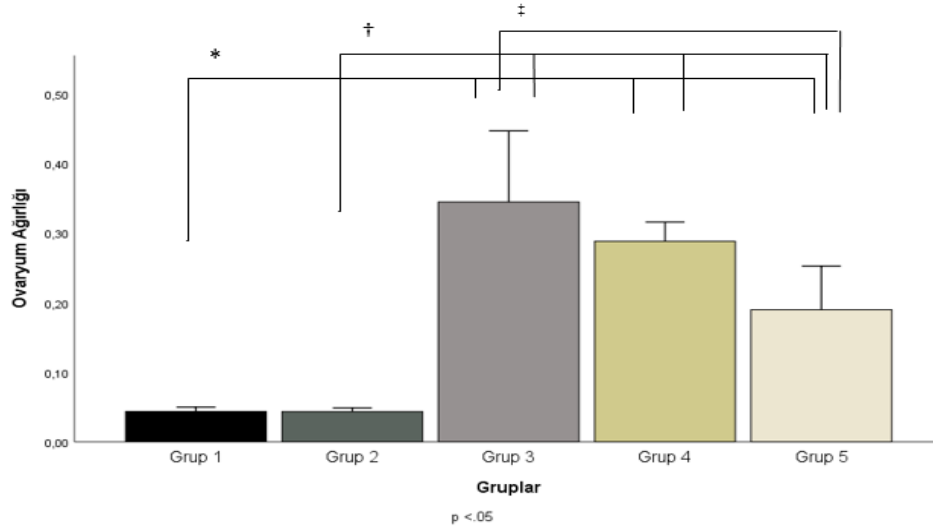
Deneyin son gününde sıçanlar sakrifiye edildikten sonra çıkarılan ovaryum dokuları tartılarak ölçüldü. Gruplara ait sıçanların, ovaryum ağırlıklarının ortalamasına ve standart sapma değerlerine ait betimsel istatistikler Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Gruplara ait sıçan ovaryum ağırlıklarının ortalama ve standart sapma değerleri, $n=7$

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,04 ±0,007 g
OHSS Sham Grubu	0,04 ±0,005 g
OHSS Grubu	0,34 ±0,097 g
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,29 ±0,026 g
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,19 ±0,050 g

Ovaryum ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını değerlendirmek için öncelikle normalite dağılımı test edildi. Verilerin normal dağılım göstermediği saptandıktan sonra Kruskal-Wallis testi ile incelenmesi gerçekleştirildi. Hangi

gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla her bir grup için Mann-Whitney U testi uygulandı ve Bonferroni düzeltmesi ile yorumlandı. Sonuçlar Şekil 13'te gösterildiği gibi çıkmıştır.



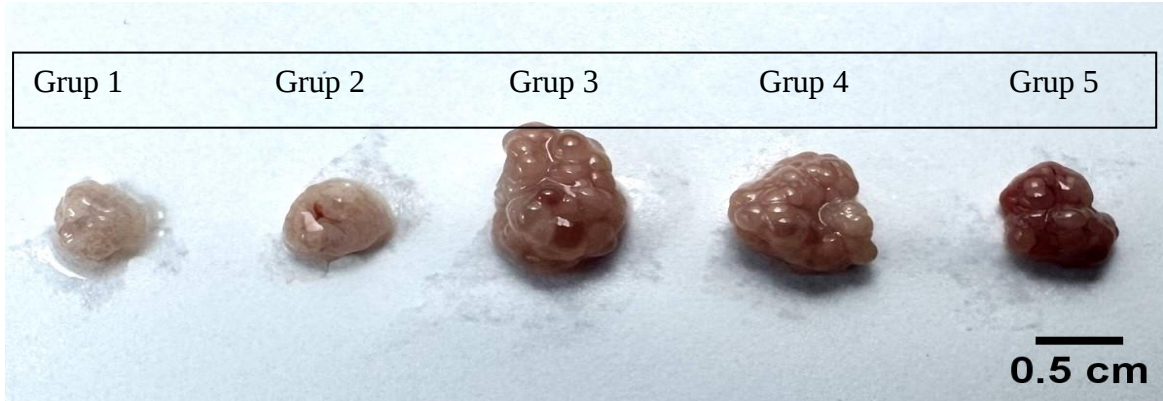
Şekil 13. Gruplara ait sıçan over ağırlıklarının karşılaştırılması. Grup 1 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5; Grup 2 ve Grup 3, Grup 4, Grup 5; Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0,05$).

4.2. Makroskobik Bulgular

Deney sonucunda gözlemlenen ve elde edilen makroskobik bulgular;

1. Grup 1 ve Grup 2' de peritoneal lavaj için 2 mL steril salin peritoneal kaviteye verildikten sonra yaklaşık 2 mL steril salin peritondan toplanırken, OHSS grubunda bu miktar 3,5 mL oldu. Bu durum OHSS deney modelinin başarılı olarak oluşturulduğu ve üçüncül boşluklara sıvı salınımı olduğunu doğrulamaktadır. 1 mg/kg indometazin verilen grupta bu miktar yaklaşık 3 mL iken, 5 mg/kg indometazin verilen grupta ise yaklaşık 2,5 mL sıvı peritondan toplandı. Bu durum ise OHSS sıçan deney modelinde, indometazinin vasküler geçirgenliği ve üçüncül boşluklara sıvı kaçışını azalttığını göstermektedir.

2. Ovaryum büyüklüğü Grup 3'te en büyük iken, Grup 1 ve Grup 2'de en küçük durumdadır. İndometazin gruplarında ise 5 mg/kg indometazin verilen Grup 5'te, 1 mg/kg indometazin verilen Grup 4'e kıyasla daha küçük gözlemlendi (Resim 1).
3. Grup 3'te ovaryum daha vaskülerize durumda iken Grup 1 ve Grup 2'de vaskülogenez artışı saptandı. Grup 4 ve Grup 5'te ise Grup 3'e kıyasla azalmış bir vaskülogenez gözlemlendi (Resim 12).



Resim 12. Gruplara ait sağ overlerin makroskobik görünümü

4.3. Mikroskobik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen – Eozin Boyamasına Ait Bulgular

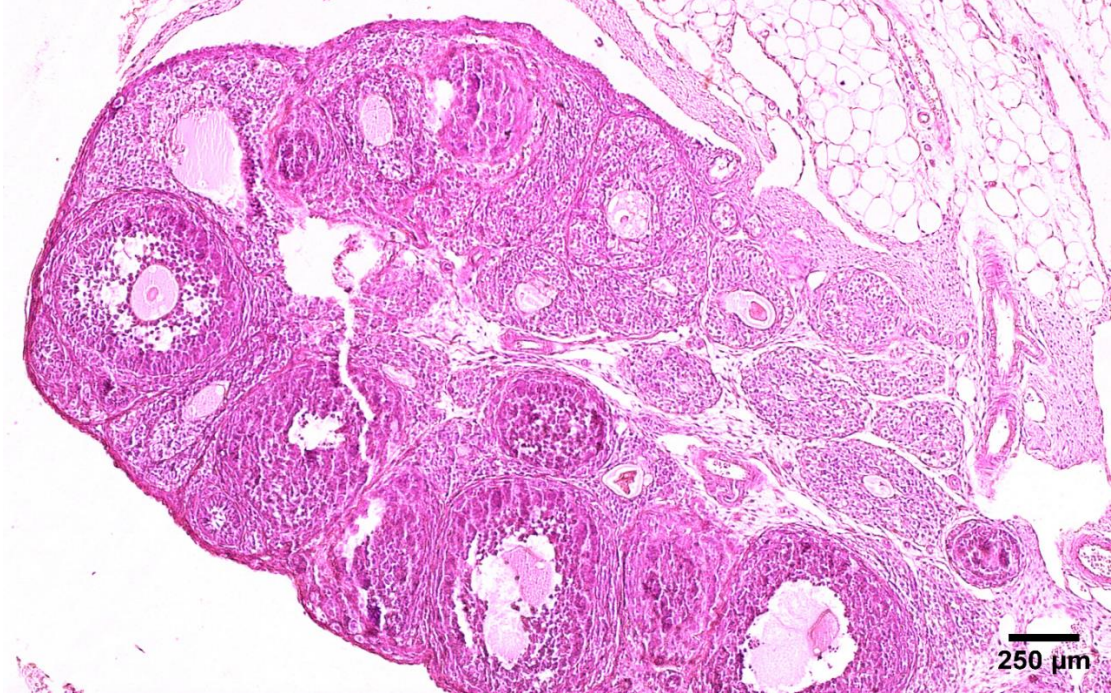
Kontrol grubuna ait doku preparatlarında ovaryumun yüzeyinde tek katlı yassı/kübik epitelden oluşan germinal epitel tabakası belirgin olarak karşımıza çıktı. Germinal epitelin altında ise; düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea gözlemlendi. Tunika albuginea'nın altında; ovaryum dokusunun korteks ve medulla kısımlarından oluşan tabakalanması gözlemlendi. Korteks kısmında; gelişim aşamasının çeşitli aşamalarında olan foliküller (primordiyal, primer, antral, Graff folikülleri), korpus luteum ve korpus albicans yapıları bulunmaktaydı. Medulla bölgesinde ise; gevşek bağ dokusu içerisinde çok miktarda kan damarları, sinirler ve lenf damarları yer almaktaydı. Tüm bu özellikleri ile kontrol grubunda yer alan sıçanların ovaryumlarının normal bir ovaryum histolojisine sahip olduğunu söylemek mümkündür (Resim 13).

Sham grubuna ait ovaryum doku preparatlarında da olağan bir görüntü karşımıza çıktı. Yine en dışta saran tek katlı yassı/kübik epitelden oluşan germinal epitel tabakası ve altında yer alan tunika albuginea tabakası gözlemlendi. Ovaryumun korteks ve medullası rahat bir şekilde ayırt edilebilmekteydi. Korteks kısmında; gelişim aşamasının çeşitli aşamalarında olan foliküller, korpus luteum ve korpus albicans yapıları bulunmaktaydı. Medulla bölgesinde ise; gevşek bağ dokusu içerisinde çok miktarda kan damarları, sinirler ve lenf damarları yer almaktaydı (Resim 14).

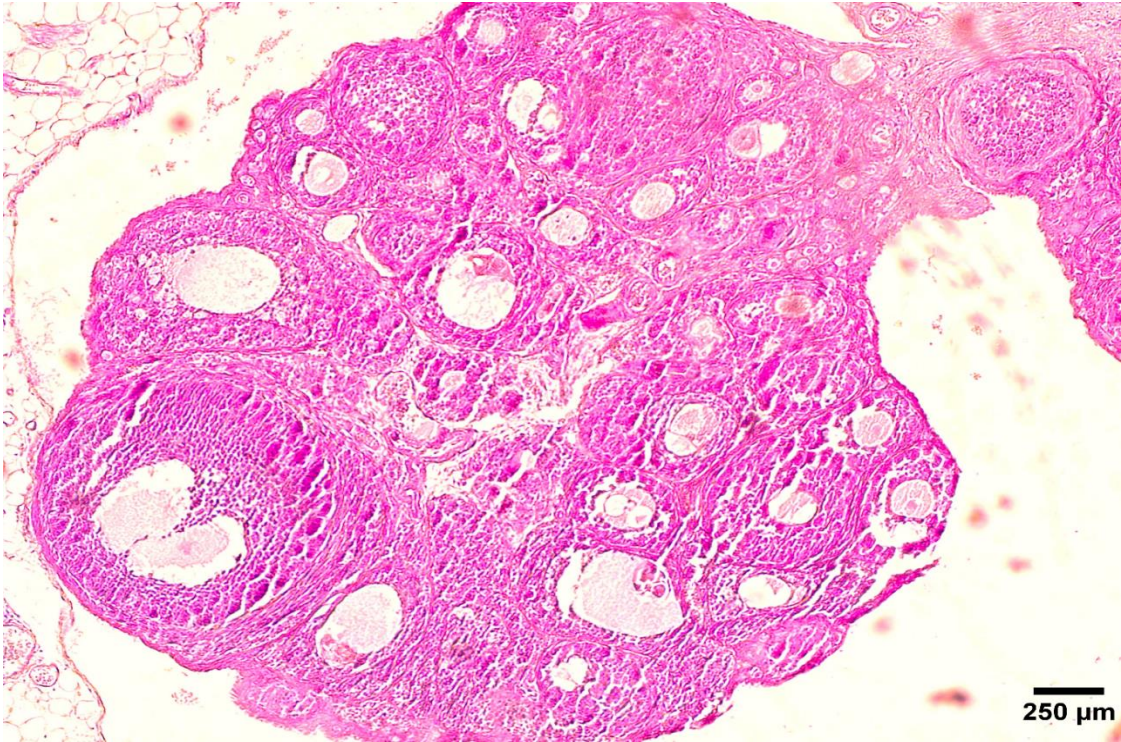
OHSS grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde; ovaryum dokusunu en dışta saran germinal epitel ve altında yer alan tunikina albuginea tabakası gözlemlendi. Bu grupta da ovaryum kesitlerinin korteks alanında farklı gelişim aşamalarında olan ovaryum folliküllerine (primordiyal, primer, antral, Graff folliküller) rastlandı. OHSS grubunda; korpus luteum ve kistik folikül yapılarının sayıca belirgin bir şekilde kontrol ve sham gruplarına göre artmış olduğu belirlendi. Bu bulgu makroskopik görünümde de desteklenmekteydi. Bu yapılar neredeyse bütün bir ovaryum dokusunu kapsayacak kadar büyük bir oluşuma sahipti. Bu nedenle bu gruba ait ovaryum dokularında medulla bölgesi, kontrol ve sham gruplarına kıyasla toplam ovaryum hacminde daha az yer kaplamaktaydı. Korteks ve medulla bölgelerinde hemorajik bölgele odakları saptandı (Resim 15).

OHSS+1 mg/kg indometazin grubuna ait kesitlerde; ovaryum dokusunu dıştan çevreleyen germinal epitel ile altındaki düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea yapısı gözlemlendi. Diğer gruplarda olduğu şekilde, dokunun korteks kısmında gelişiminin değişik aşamalarında olan folliküllere rastlandı. Bu grupta OHSS grubunda çok sayıda görülen korpus luteum ve kistik folikül yapıları daha azdı. Medulla bölgesi OHSS grubuna kıyasla; genel dokunun daha geniş bir alanını kaplamaktaydı. Hemorajik bölgeler bu grupta da karşımıza çıktı (Resim 16).

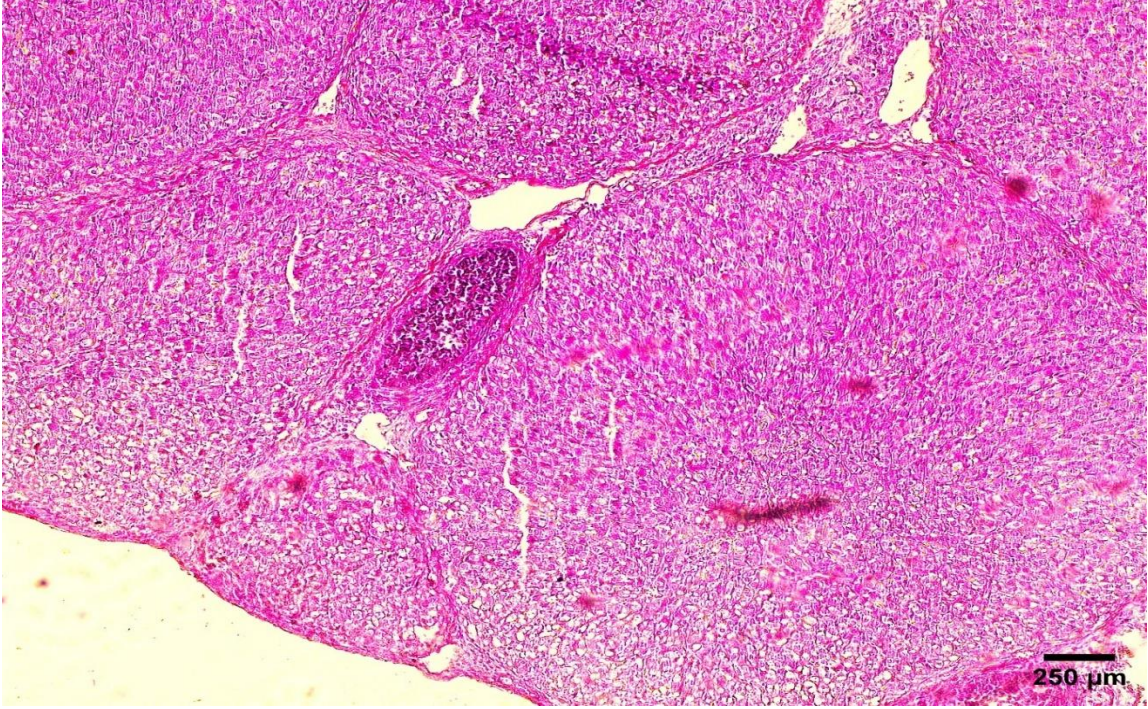
OHSS+5 mg/kg indometazin grubuna ait olan kesitlerde ise; yine germinal epitel ve tunika albuginea yapısı gözlemlendi. Diğer gruplarda olduğu şekilde, dokunun korteks kısmında gelişiminin değişik aşamalarında olan folliküllere rastlandı. Bu grupta da OHSS grubunda çok sayıda görülen korpus luteum ve kistik folikül yapıları daha azdı. Medulla bölgesi OHSS grubuna kıyasla; genel dokunun daha geniş bir alanını kaplamaktaydı. Hemorajik bölgeler bu grupta da karşımıza çıktı (Resim 17).



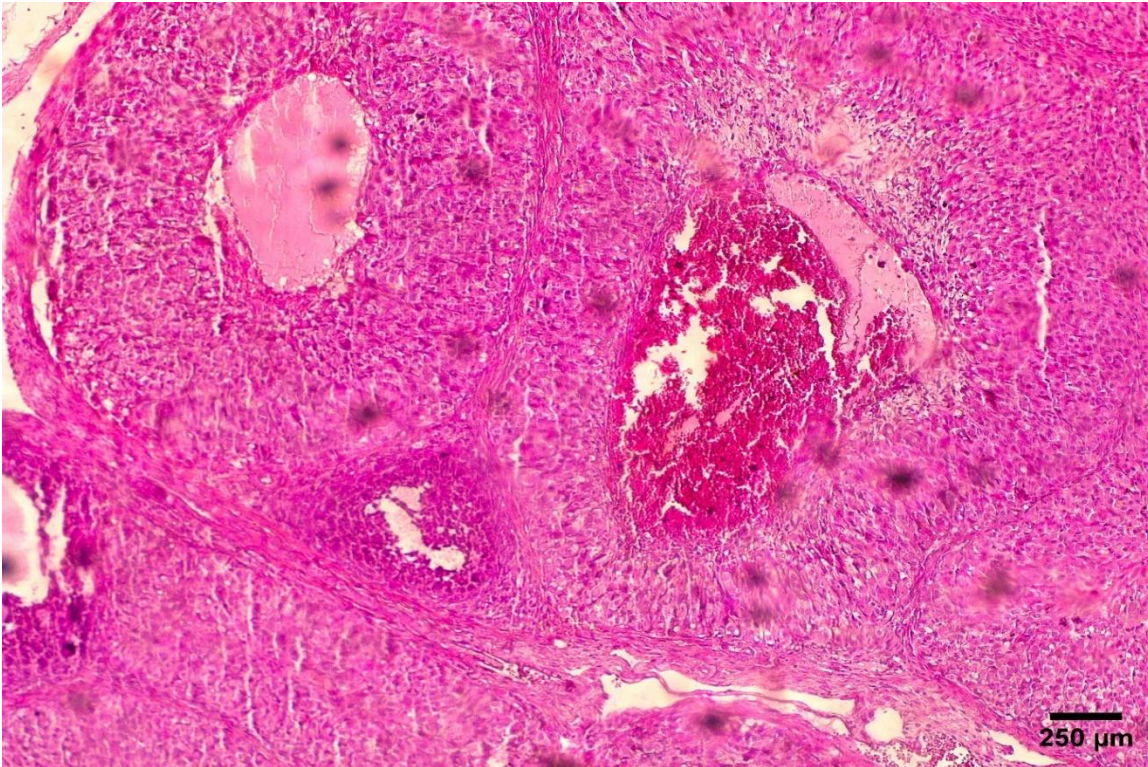
Resim 13. Grup 1 (Kontrol) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)



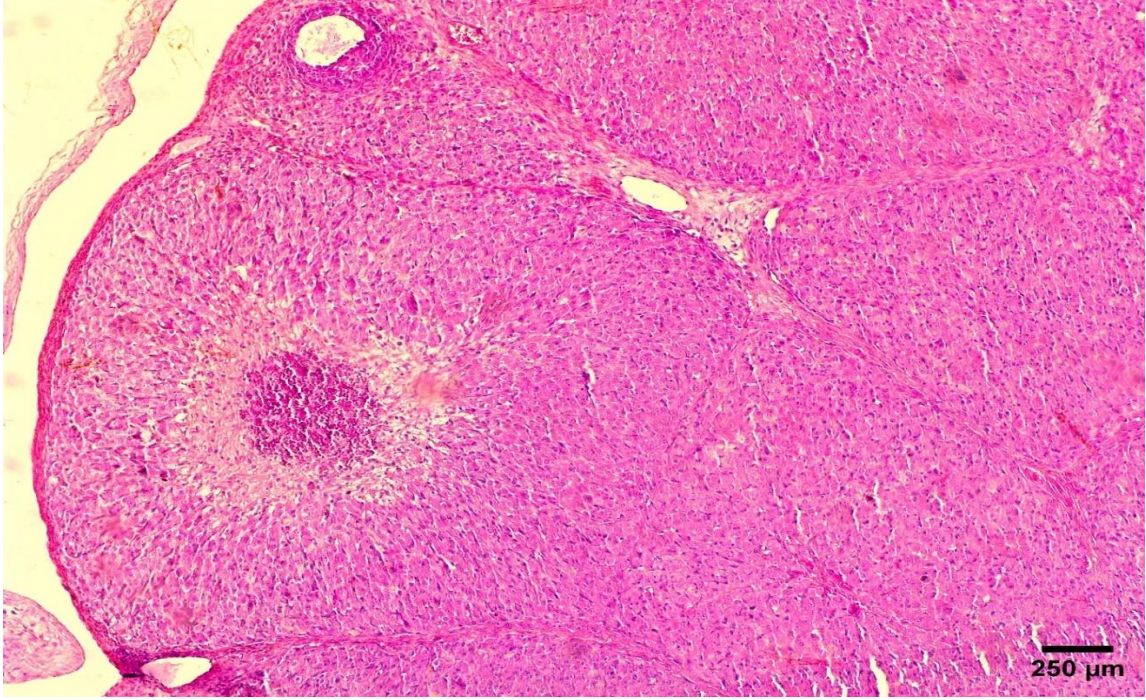
Resim 14. Grup 2 (Sham) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)



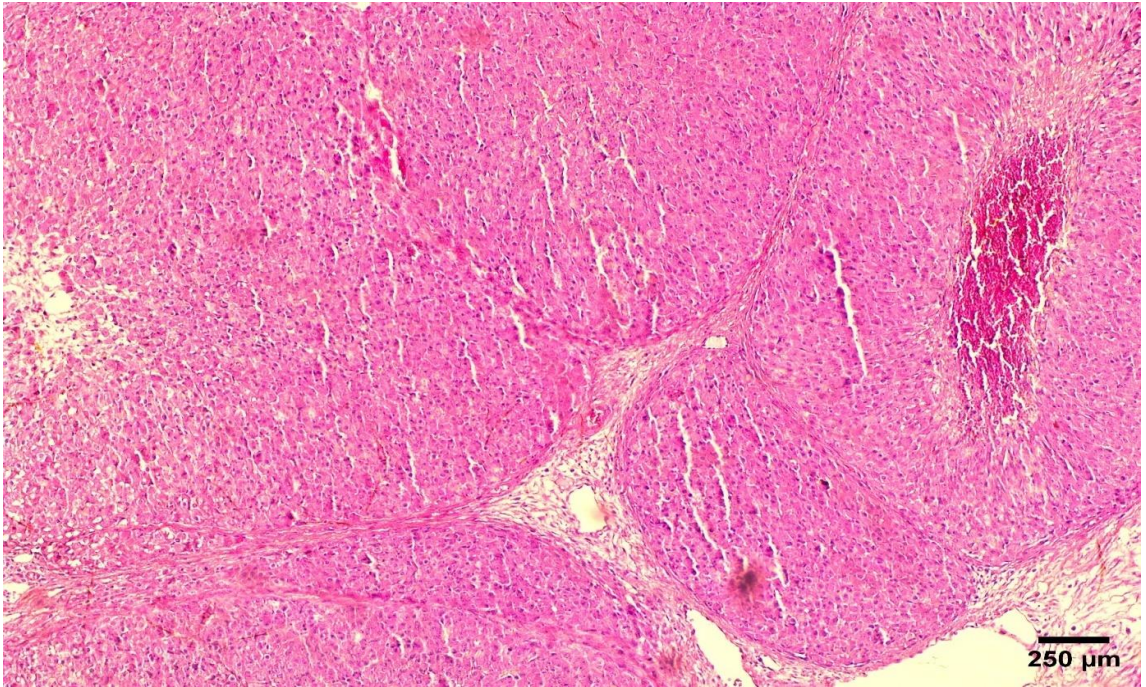
Resim 15. Grup 3 (OHSS) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)



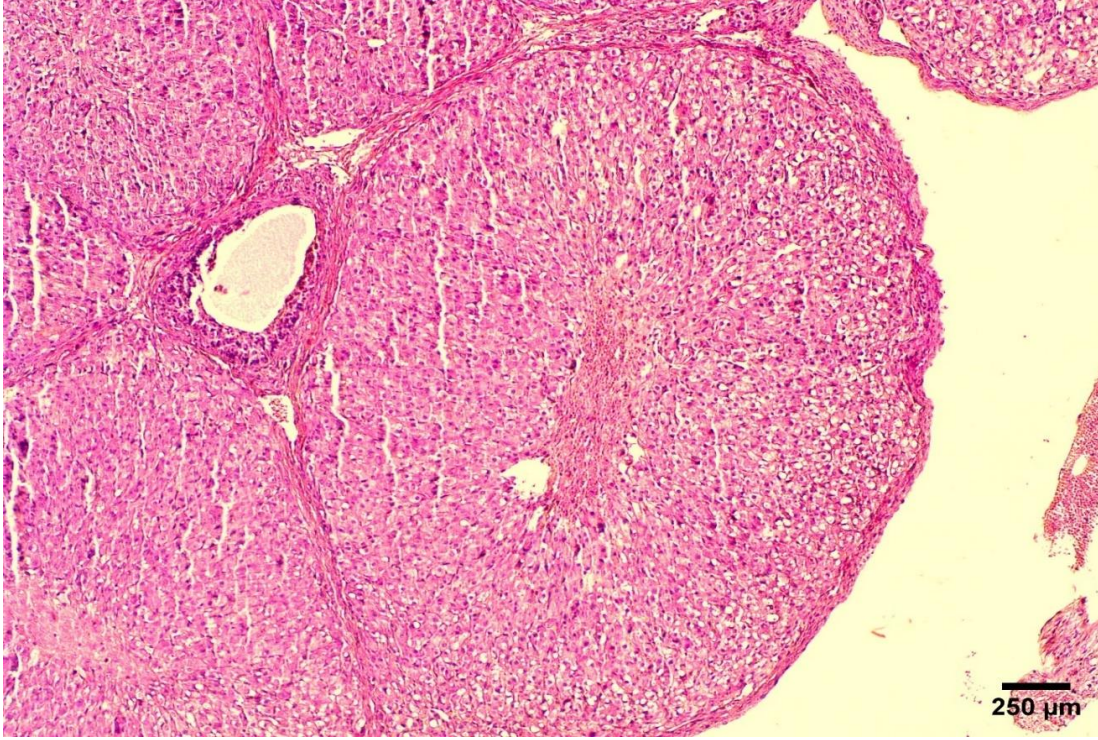
Resim 16. Grup 3 (OHSS) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatlarındaki hemorajik bölge odakları (H&E - 10X)



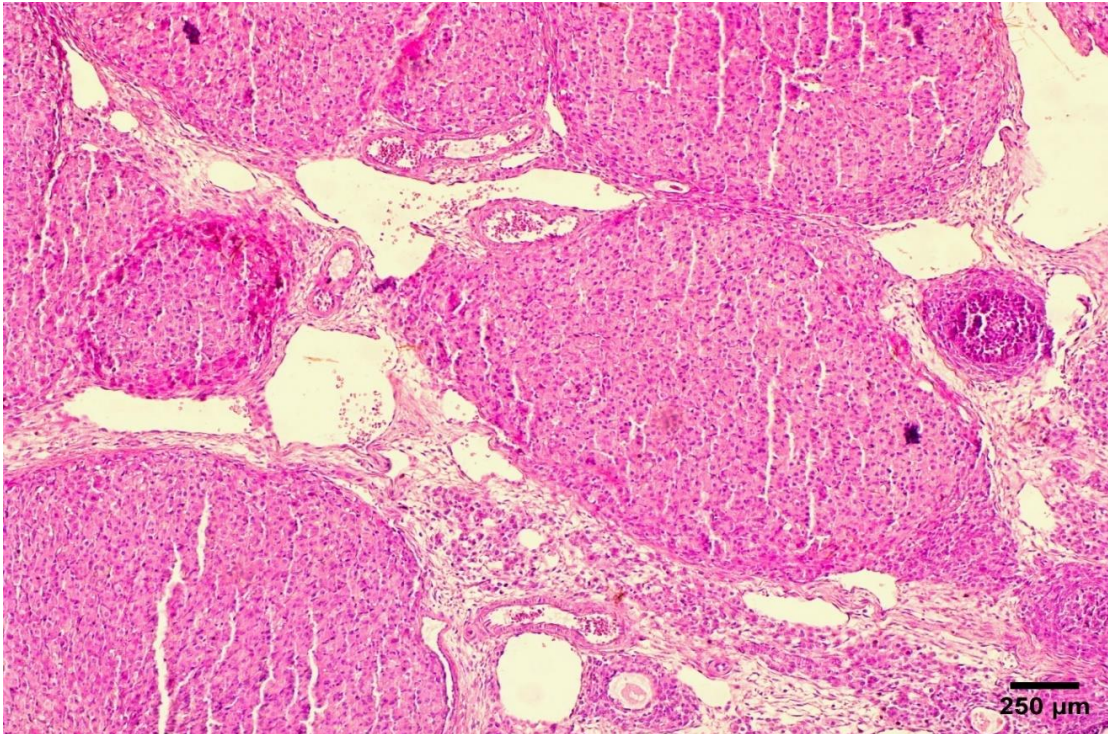
Resim 17. Grup 4 (OHSS+1 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)



Resim 18. Grup 4 (OHSS+1 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatlarındaki hemorajik bölge odakları (H&E - 10X)



Resim 19. Grup 5 (OHSS+5 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları (H&E - 10X)

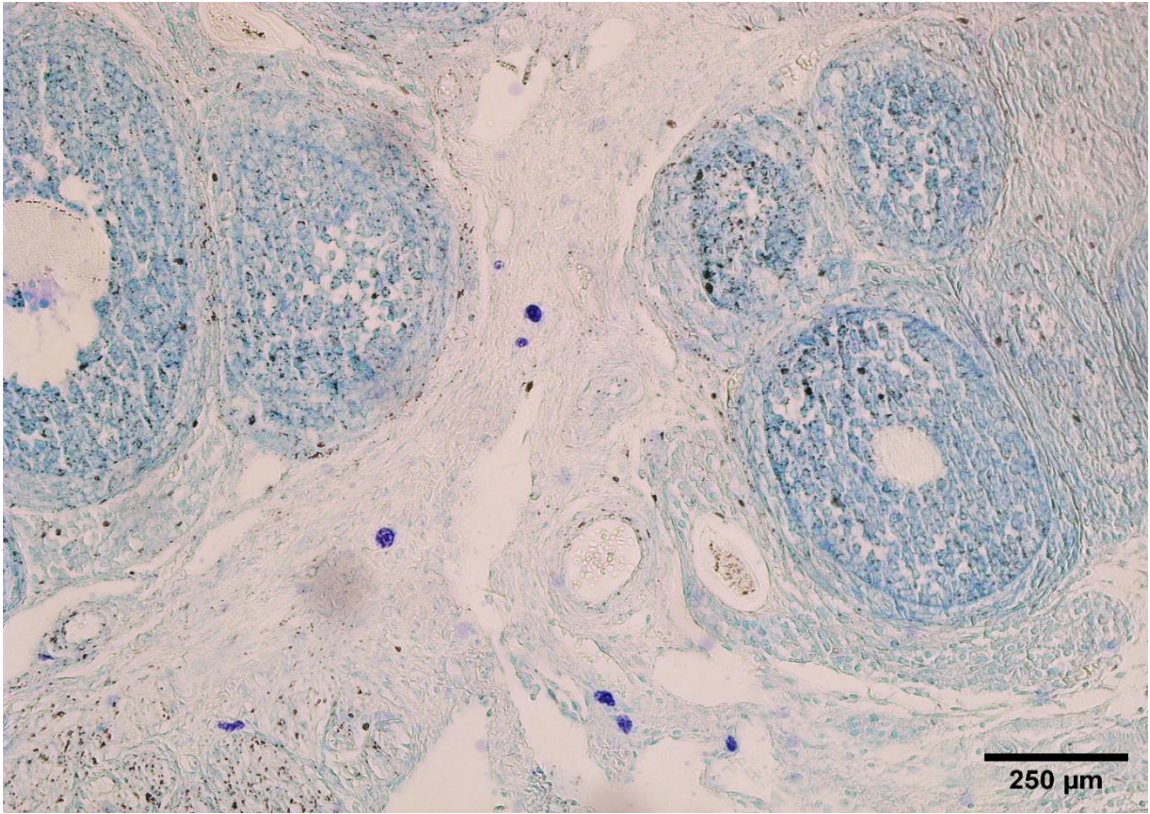


Resim 20. Grup 5 (OHSS+5 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatlarındaki hemorajik bölge odakları (H&E - 10X)

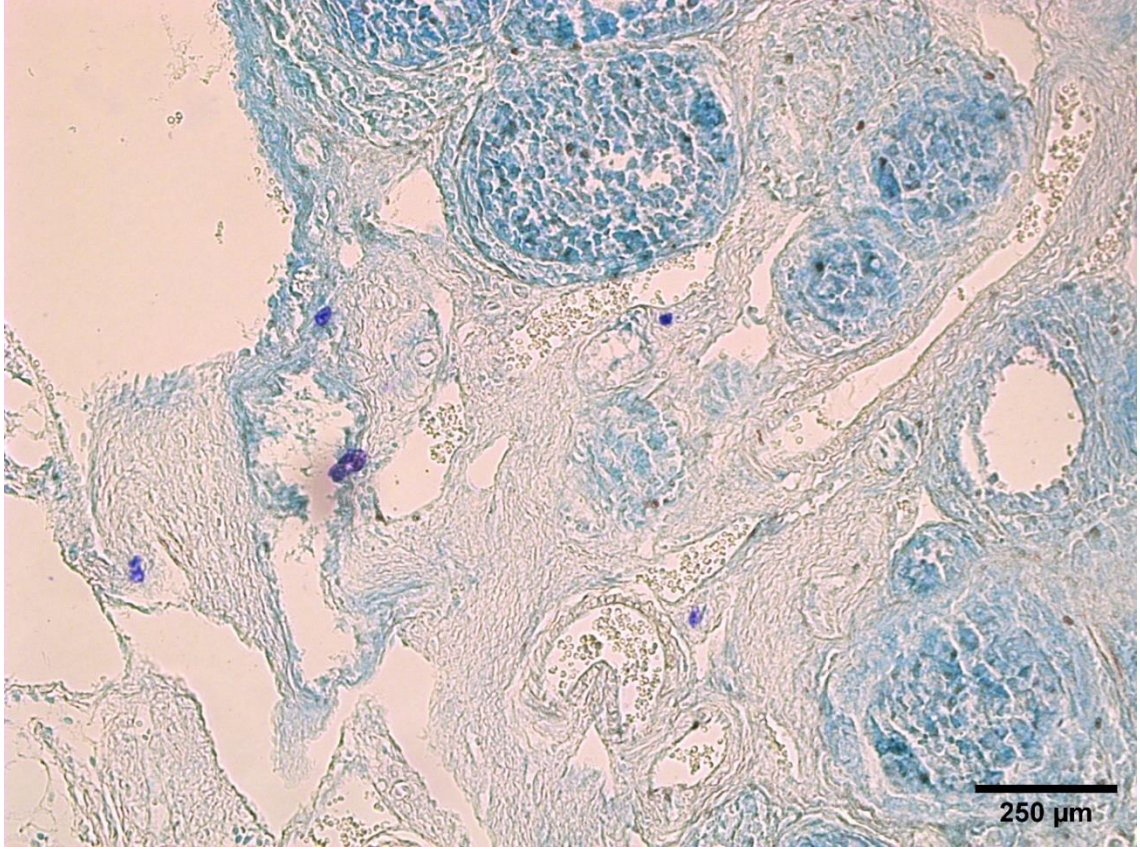
4.3.2. Toluidin Mavisi Boyamasına Ait Bulgular

Toluidin mavisi ile kesit boyaması yapılarak dokudaki mast hücrelerinin durumu hakkında bilgi sahibi olunması amaçlandı.

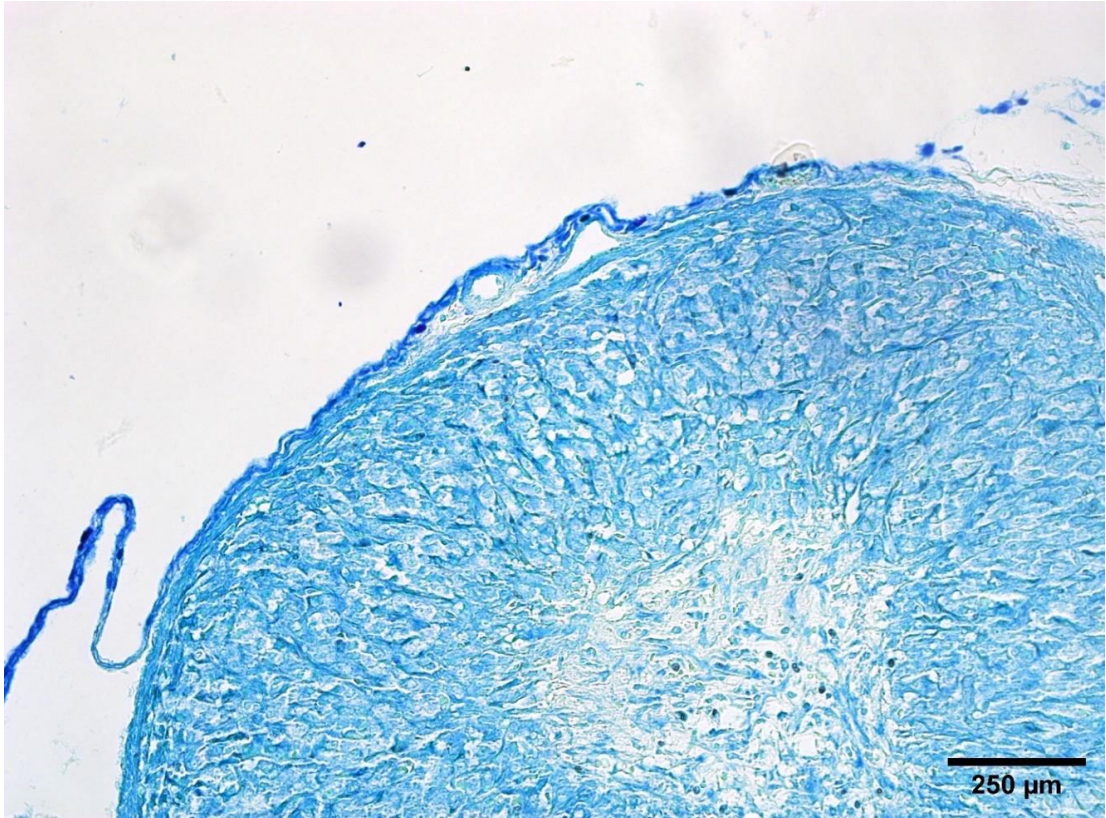
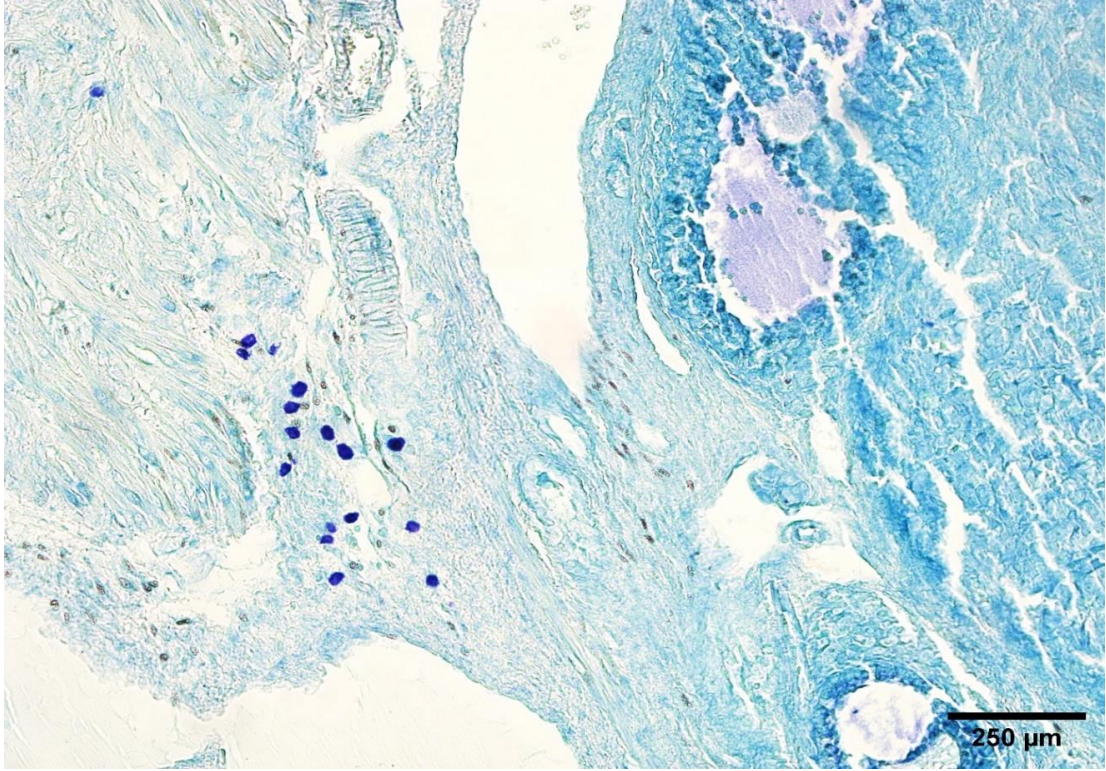
Kontrol ve Sham gruplarında mast hücreleri interstisyel alanda ve medulla bölgesinde yoğunlaşmış durumda iken, OHSS, OHSS+1 mg/kg indometazin ve OHSS+5 mg/kg indometazin gruplarında mast hücreleri germinal epitelin altındaki tunika albuginea tabakasında yerleşim gösterdi. Buna ek olarak Kontrol ve Sham gruplarında mast hücreleri daha koyu granüllü olarak boyanmışken OHSS, OHSS+1 mg/kg indometazin ve OHSS+5 mg/kg indometazin gruplarında daha soluk boyalı olarak gözlemlendi.



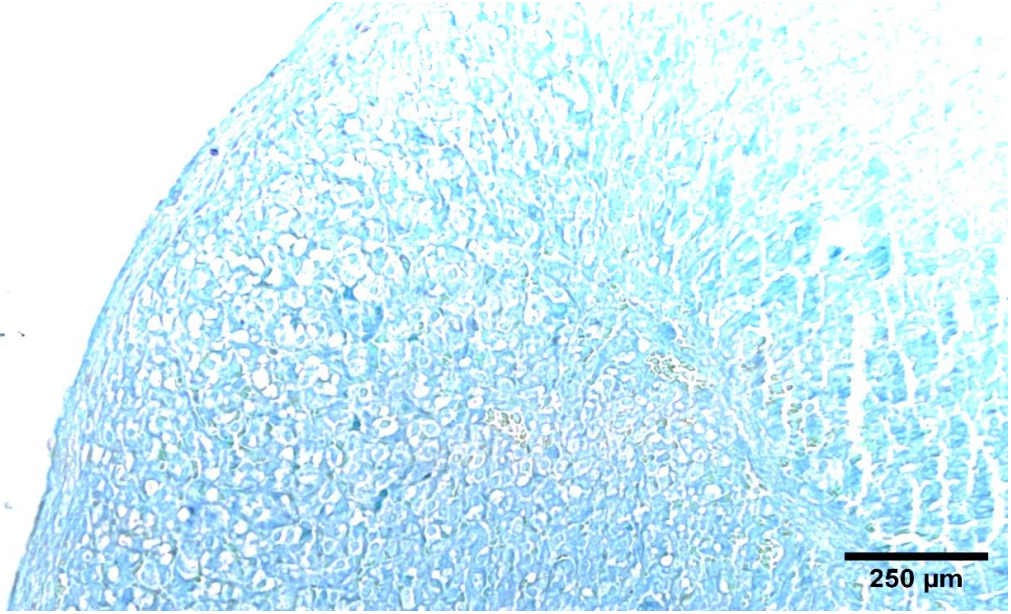
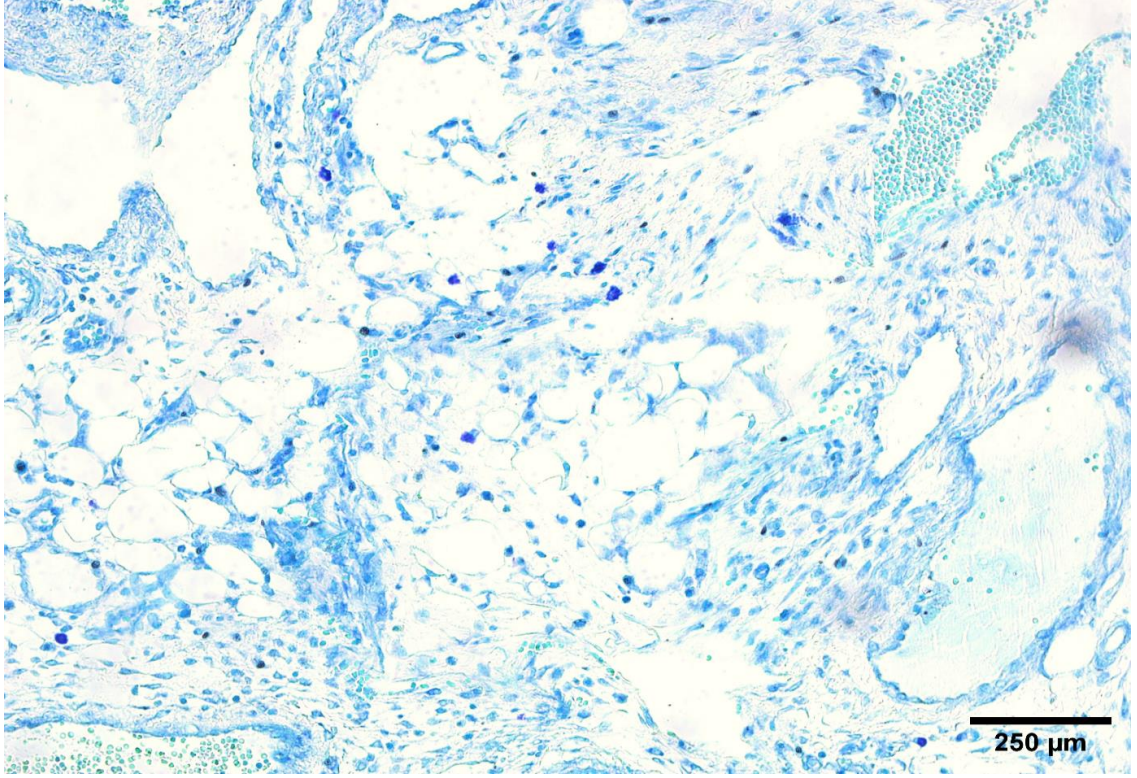
Resim 21. Grup 1 (Kontrol) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X)



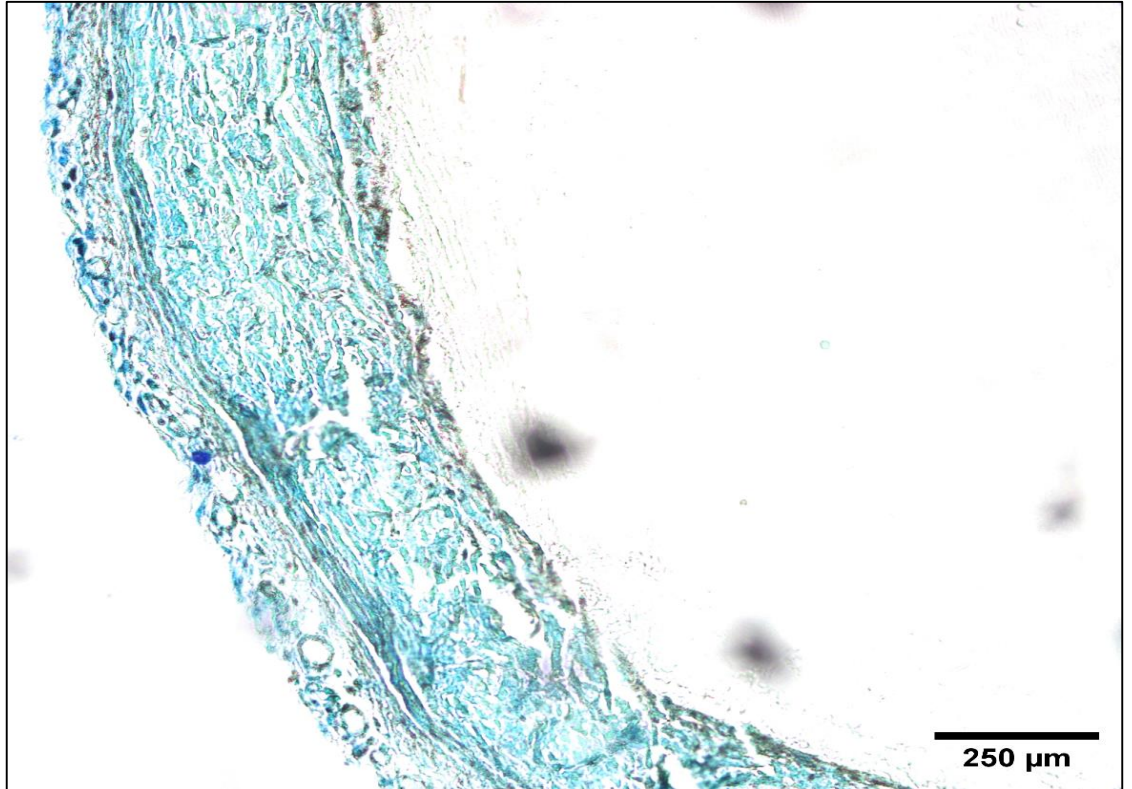
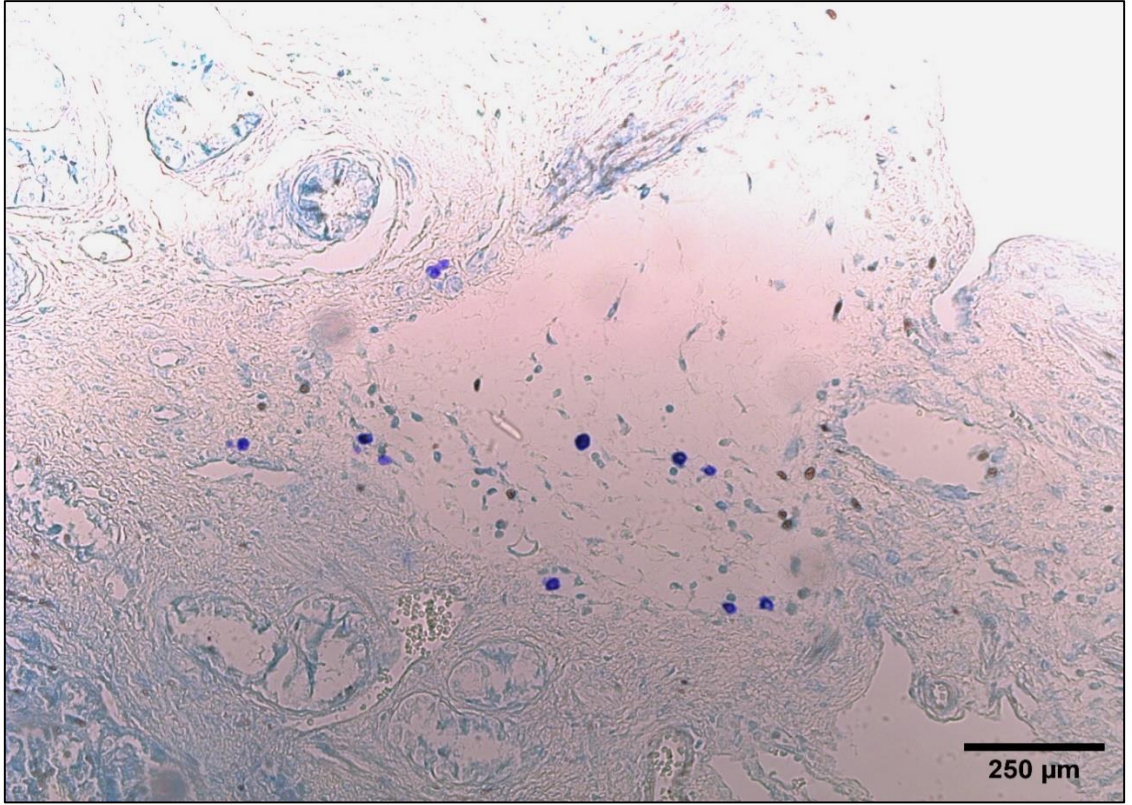
Resim 22. Grup 2 (Sham) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X)



Resim 23. Grup 3 (OHSS) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X)



Resim 24. Grup 4 (OHSS+1 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X)



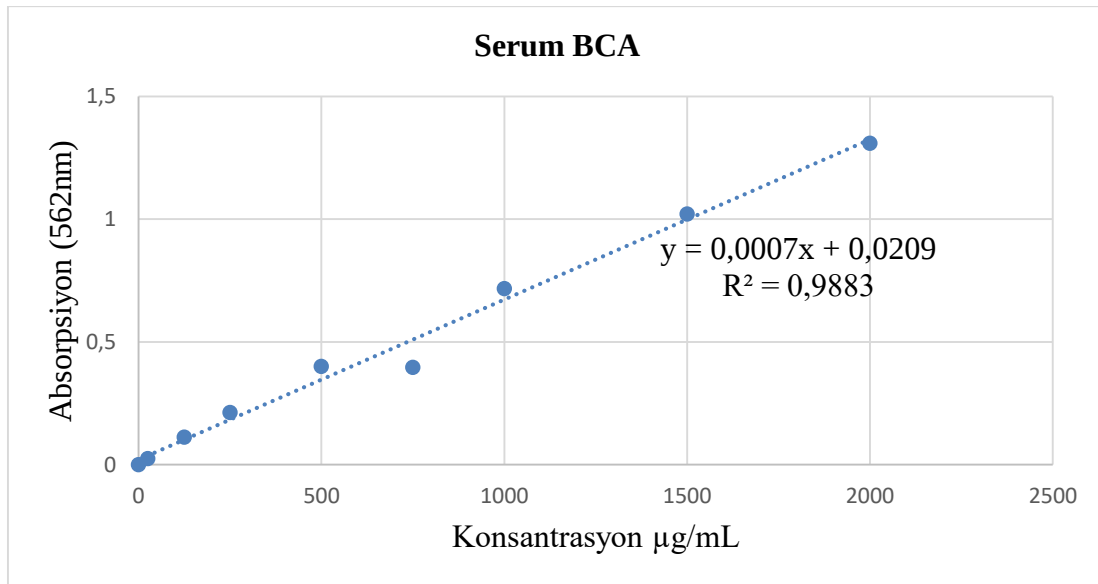
Resim 25. Grup 5 (OHSS+5 mg/kg indometazin) grubunda yer alan sıçanların ovaryum doku preparatları ve mast hücre yerleşimleri (Toluidin Mavisi - 20X)

4.4. ELİSA Deneylerine Ait Bulgular

4.4.1. BCA Deneyleri (Serum, Doku ve Periton Sıvısı)

4.4.1.1. Serum BCA Deneyleri

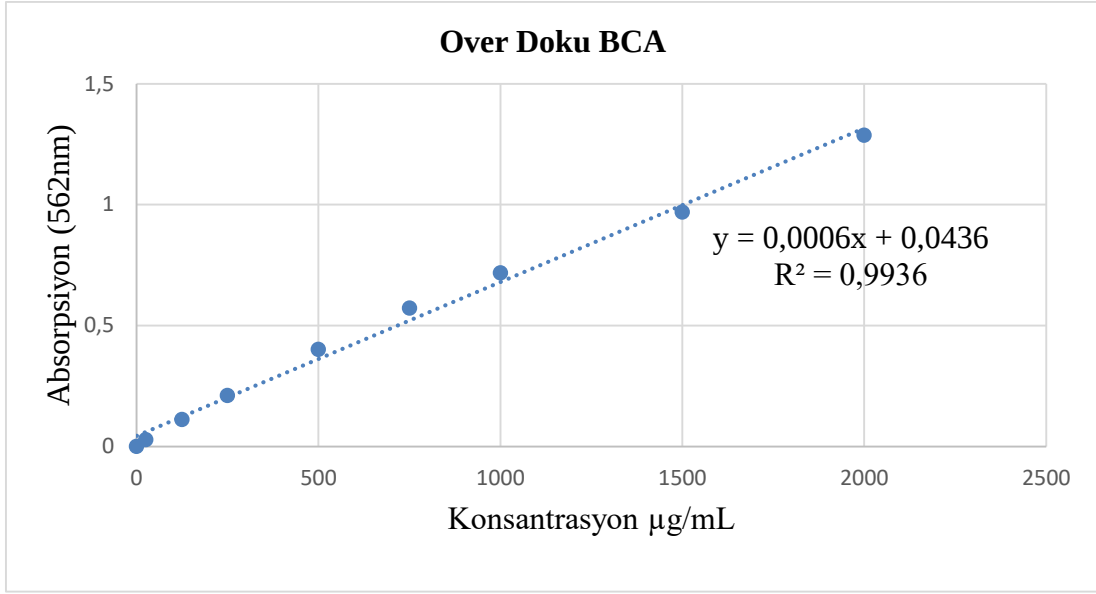
Kan serumunda gerçekleştirilen BCA deneyleri ile serumda bulunan protein miktarının saptanması amaçlandı. Bu amaçla yapılan deneyler sonucunda hazırlanan grafik Şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 14. Serumda bulunan protein miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik

4.4.1.2. Doku BCA Deneyleri

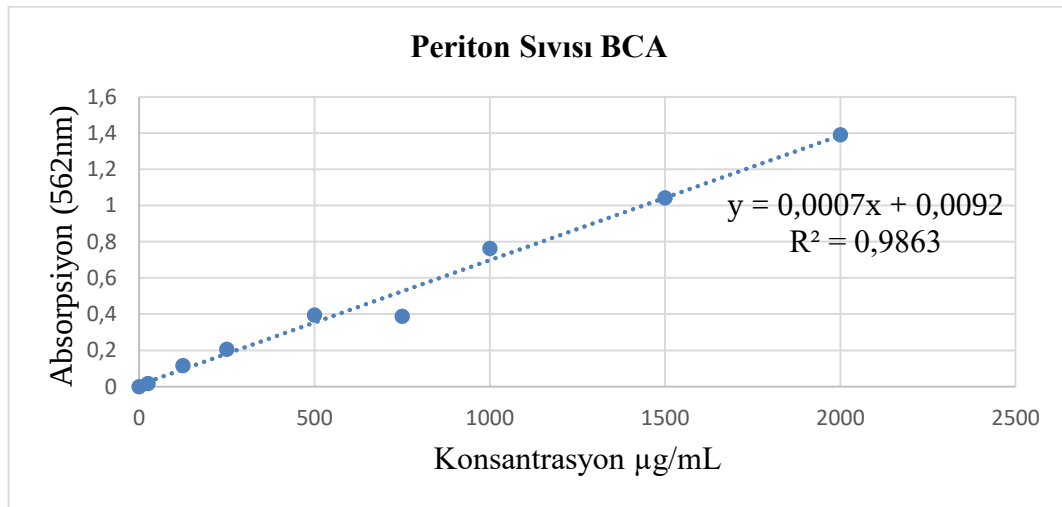
Sol ovaryum dokuları ile gerçekleştirilen BCA deneyleri ile over dokusunda bulunan protein miktarının saptanması amaçlandı. Bu amaçla yapılan deneyler sonucunda hazırlanan grafik Şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 15. Dokuda bulunan protein miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik

4.4.1.3. Periton Sıvısı BCA Deneyleri

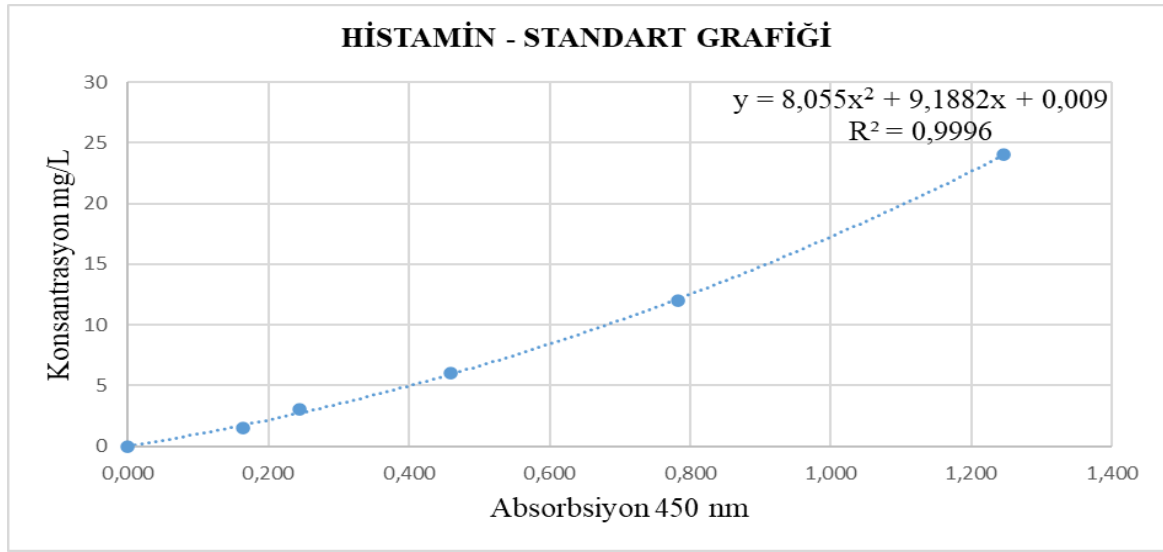
Peritoneal lavaj ile toplanmış olan periton sıvıları ile gerçekleştirilen BCA deneyleri ile periton sıvılarında bulunan protein miktarının saptanması amaçlandı. Bu amaçla yapılan deneyler sonucunda hazırlanan grafik Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. Periton sıvısında bulunan protein miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik

4.4.2. Serum Histamin Değerleri

Kan serumunda bulunan histamin değerini saptamak için gerçekleştirilen ELİSA deneyinde, serumda bulunan histamin miktarı tespiti için hazırlanan grafik Şekil 17’de gösterilmiştir.



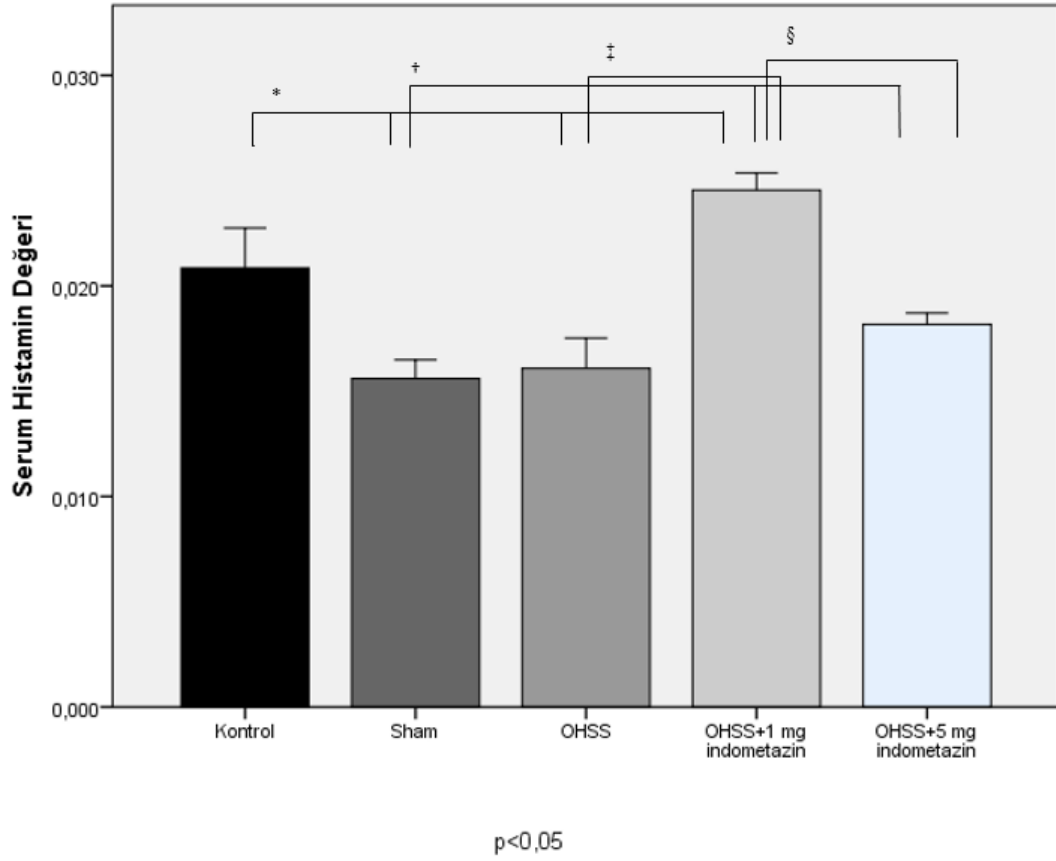
Şekil 17. Serumda bulunan Histamin miktarının tayin edilmesinde kullanılacak olan formülün saptanması için elde edilen grafik

Serum histamin değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Gruplara ait birim başına serum histamin değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,021±0,003 µg/µg
OHSS Sham Grubu	0,016±0,001 µg/µg
OHSS Grubu	0,016±0,002 µg/µg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,025±0,001 µg/µg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,018±0,001 µg/µg

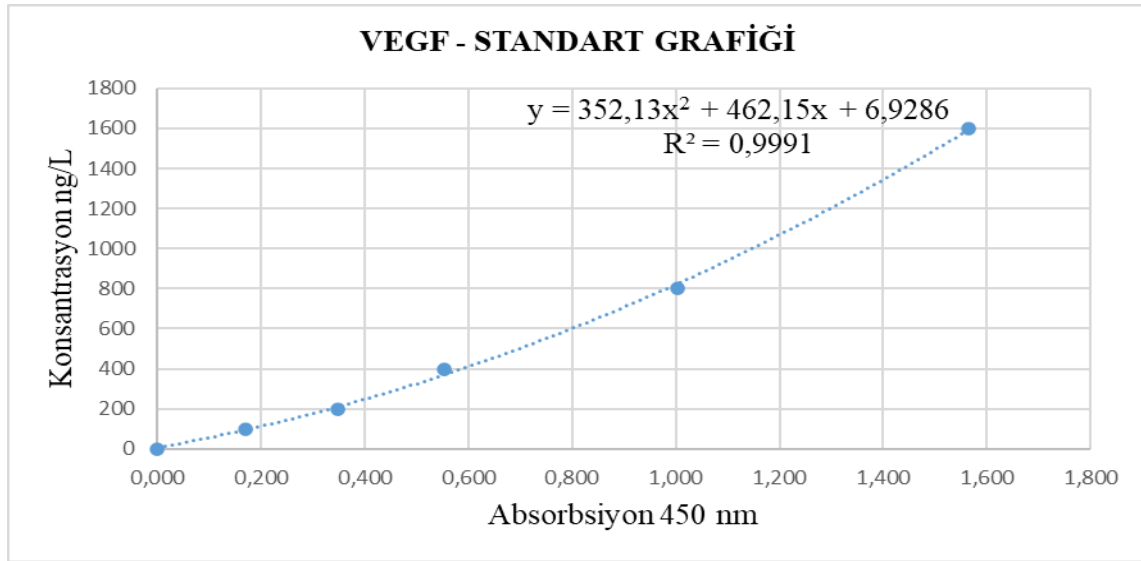
Histamin serum verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve bir grubun ortalamasının normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Buna göre; grupların serum Histamin değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Mann-Whitney U testi sonucunda Grup 1 ile Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 arasında; Grup 2 ile Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 4 arasında ve Grup 4 ile Grup 5 arasında anlamlı fark bulunmuştur. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 18’de gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 18. Serum Histamin/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 arasında; Grup 2 ile Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 4 arasında ve Grup 4 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).

4.4.3. Serum VEGF Değerleri

Kan serumunda bulunan VEGF değerini saptamak için gerçekleştirilen ELİSA deneyinde, serumda bulunan VEGF miktarını tespit etmek için hazırlanan grafik Şekil 19’da gösterilmiştir.



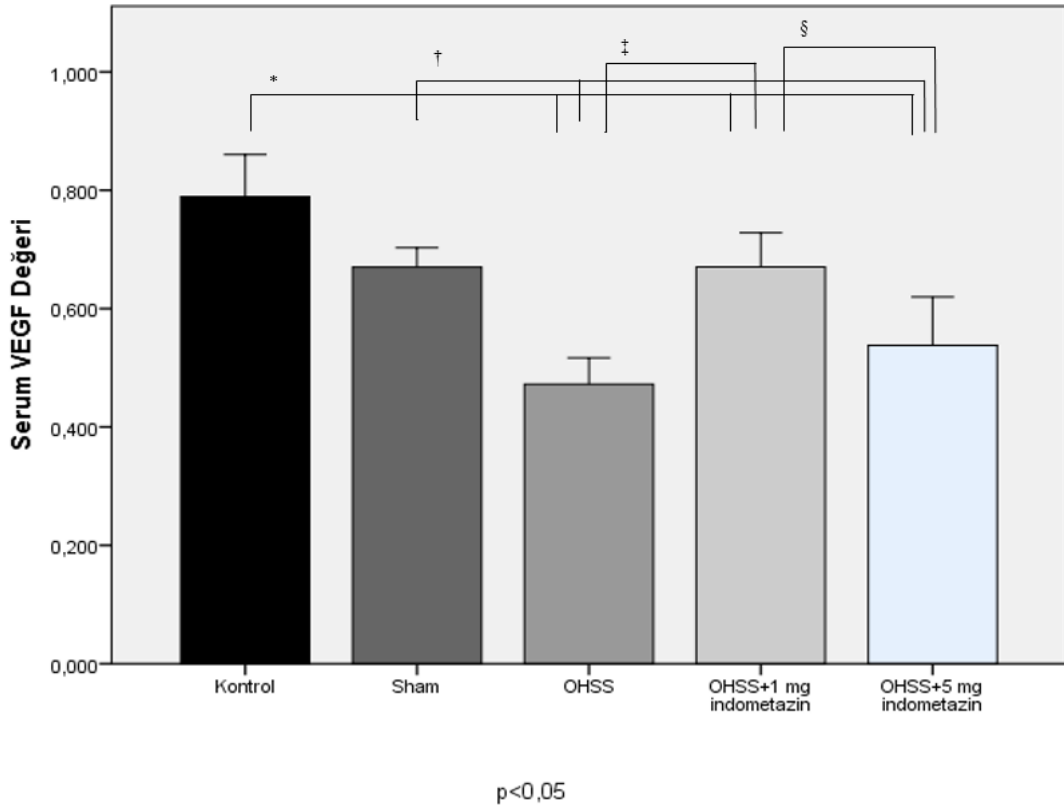
Şekil 19. Serumda bulunan VEGF miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik

Serum VEGF değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Gruplara ait birim başına düşen serum VEGF değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,776±0,097 pg/μg
OHSS Sham Grubu	0,671±0,057 pg/μg
OHSS Grubu	0,472±0,077 pg/μg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,670±0,091 pg/μg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,538±0,129 pg/μg

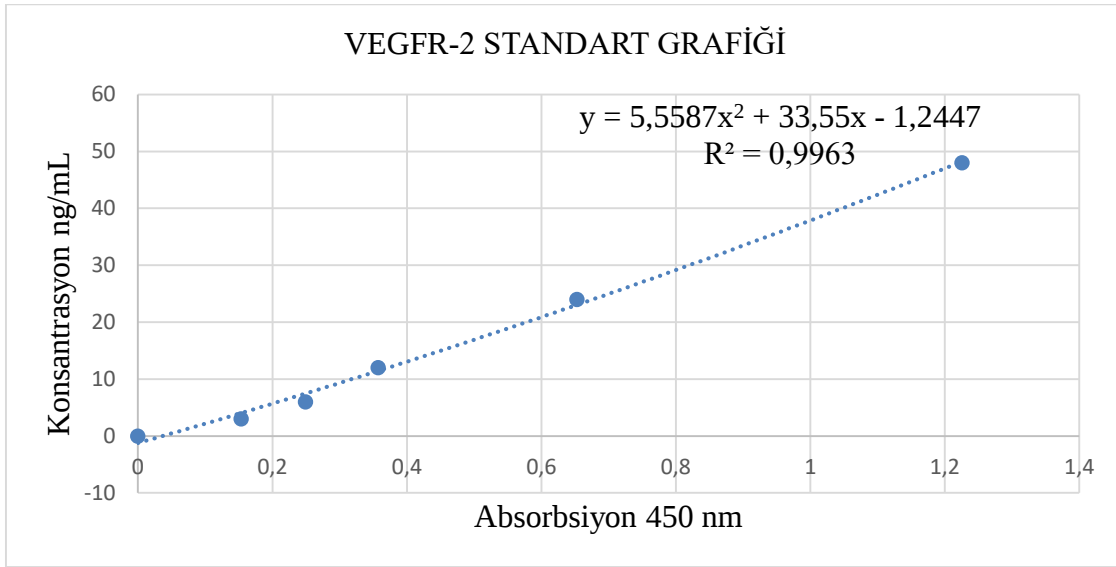
VEGF serum verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve iki grubun ortalamasının normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Buna göre; grupların serum VEGF değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Mann-Whitney U testi sonucunda Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 4 arasında; Grup 4 ile Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 20’de gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 20. Serum VEGF/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 4 arasında; Grup 4 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).

4.4.4. Serum ve Doku VEGFR-2 Değerleri

Kan serumunda ve dokuda bulunan VEGFR-2 değerini saptamak için gerçekleştirilen ELİSA deneylerinde, serumda ve dokuda bulunan VEGFR-2 miktarını göstermek için hazırlanan grafik Şekil 21’de gösterilmiştir.



Şekil 21. VEGFR-2 miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik

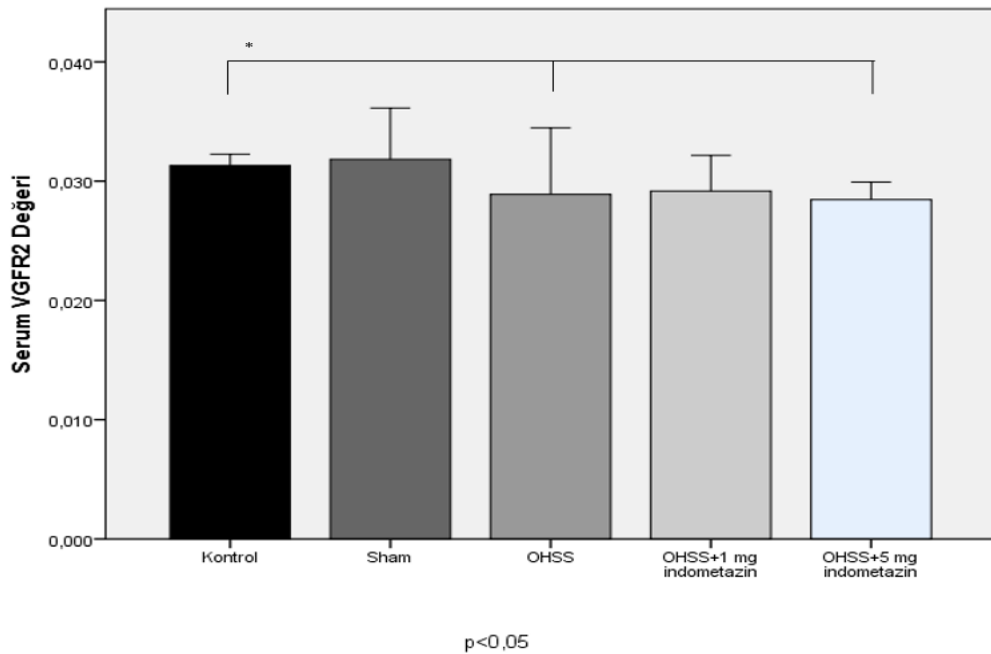
4.4.4.1. Serum VEGFR-2 Değerleri

Grupların serum VEGFR-2 değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Gruplara ait birim başına düşen serum VEGFR-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,031±0,001 ng/μg
OHSS Sham Grubu	0,032±0,006 ng/μg
OHSS Grubu	0,029±0,010 ng/μg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,029±0,003 ng/μg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,028±0,002 ng/μg

VEGFR 2 serum verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve bir grubun ortalamasının normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Buna göre; grupların serum VEGFR 2 değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Mann-Whitney U testi sonucunda Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 22’de gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 22. Serum VEGFR-2/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).

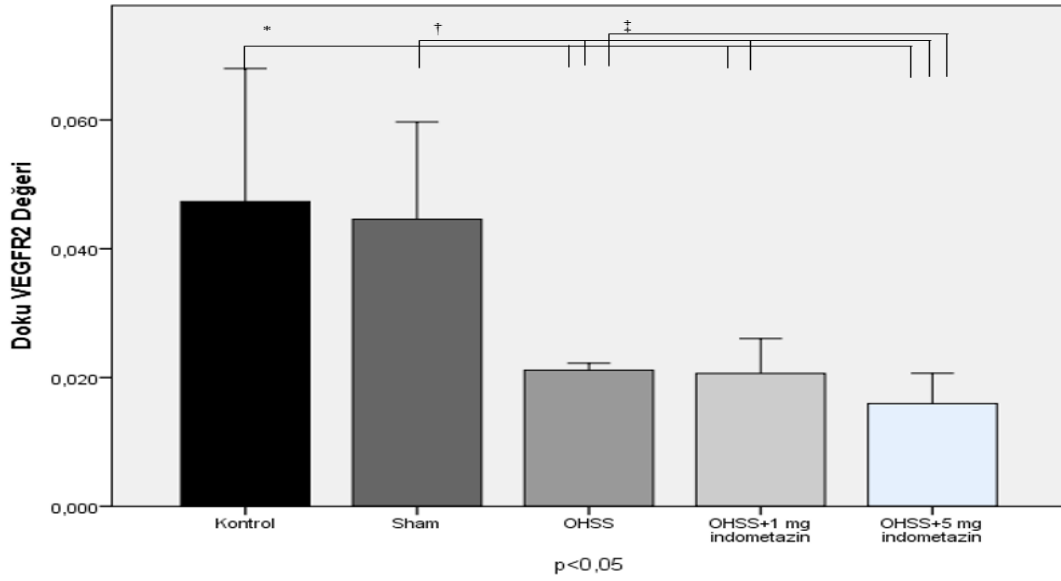
4.4.4.2. Doku VEGFR-2 Değerleri

Grupların doku VEGFR-2 değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Gruplara ait birim başına düşen doku VEGFR-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,047±0,020 ng/μg
OHSS Sham Grubu	0,045±0,014 ng/μg
OHSS Grubu	0,021±0,001 ng/μg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,021±0,005 ng/μg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,016±0,005 ng/μg

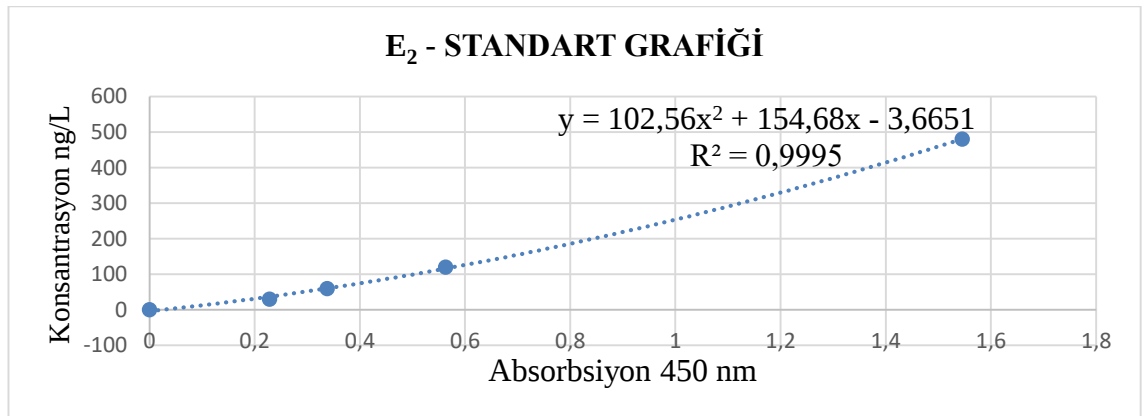
VEGFR 2 doku verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve üç grubun ortalamasının normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Buna göre; grupların doku VEGFR 2 değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Mann-Whitney U testi sonucunda Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 23’te gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 23. Doku VEGFR-2/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 3 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$).

4.4.5. Serum ve Doku E₂ Değerleri

Kan serumunda ve dokuda bulunan E₂ değerini saptamak için gerçekleştirilen ELİSA deneylerinde, serumda ve dokuda bulunan E₂ miktarını göstermek için hazırlanan grafik Şekil 24’te gösterilmiştir.



Şekil 24. E₂ miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik

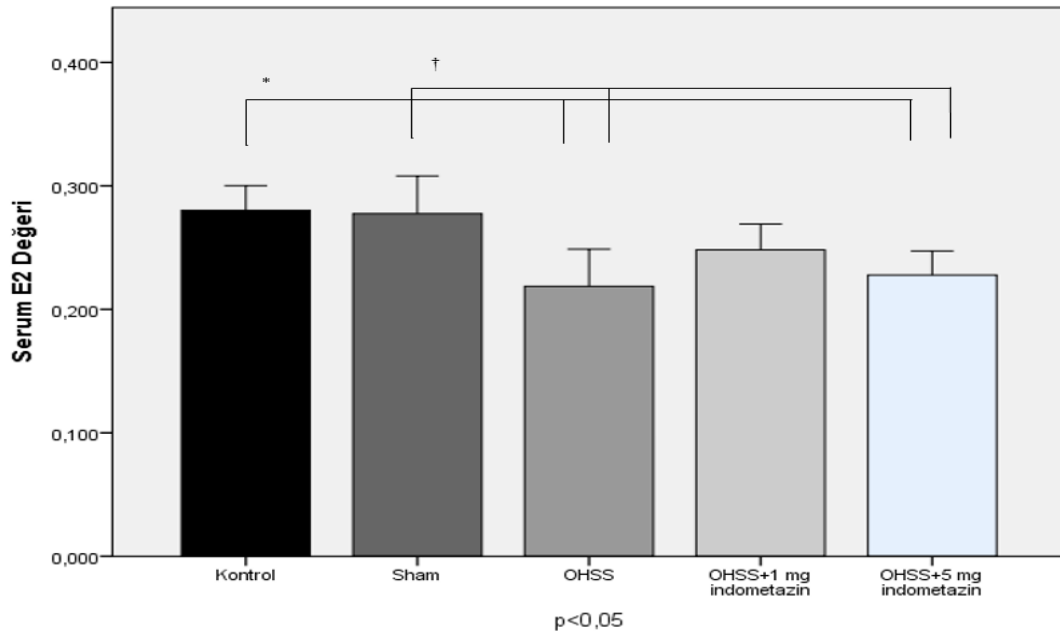
4.4.5.1. Serum E₂ Değerleri

Grupların serum E₂ değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Gruplara ait birim başına düşen serum E₂ değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,280±0,028 pg/μg
OHSS Sham Grubu	0,278±0,043 pg/μg
OHSS Grubu	0,219±0,036 pg/μg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,248±0,029 pg/μg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,228±0,027 pg/μg

E₂ serum verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve grupların normal dağılım gösterdiği tespit edildi ($p>0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı tek yönlü ANOVA testi ile incelendi. Buna göre; grupların serum E₂ değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Tukey testi sonucunda Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında; Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 25'te gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 25. Serum E₂/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

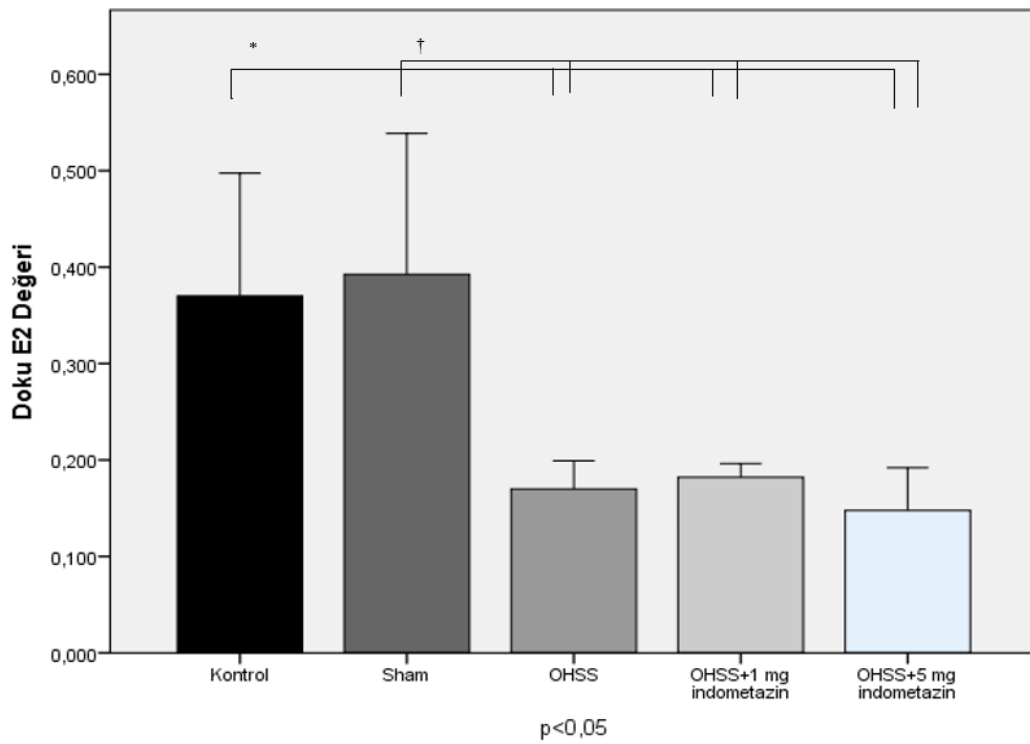
4.4.5.2. Doku E₂ Değerleri

Grupların doku E₂ değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Gruplara ait birim başına düşen doku E₂ değerlerinin ortalama ve standart sapma değerler

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,370±0,121 pg/μg
OHSS Sham Grubu	0,393±0,139 pg/μg
OHSS Grubu	0,170±0,028 pg/μg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,182±0,014 pg/μg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,148±0,042 pg/μg

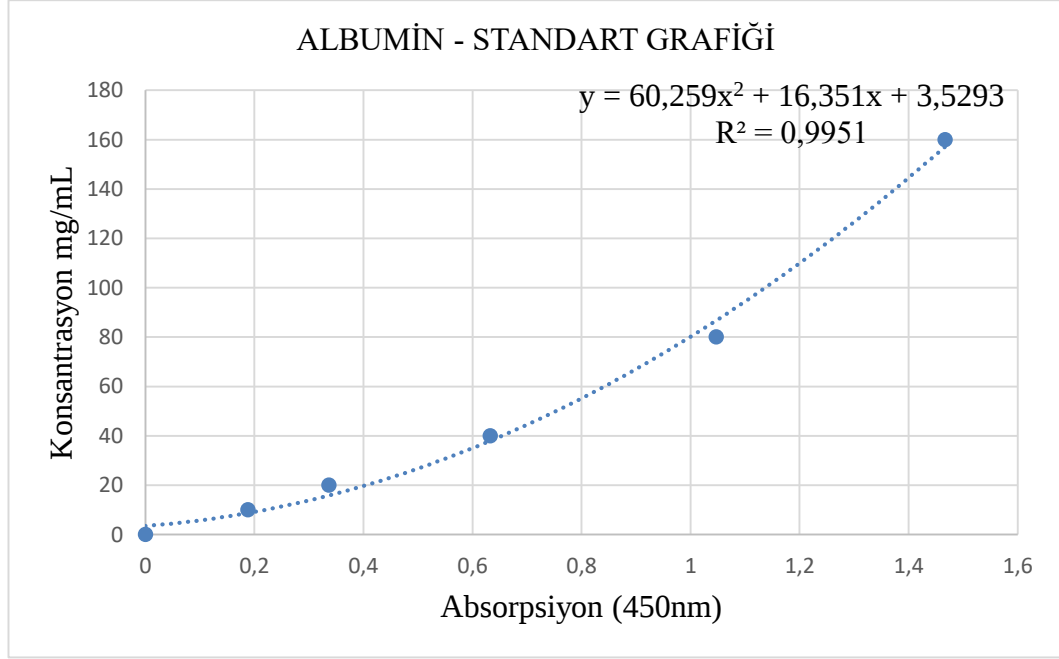
E₂ doku verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve üç grubun normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Buna göre; grupların doku E₂ değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Mann Whitney U testi sonucunda Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 26’da gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 26. Doku E₂/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).

4.4.6. Periton Sıvısı ve Doku Albumin Değerleri

Periton sıvısında ve dokuda bulunan birim başına düşen albumin miktarını saptamak için gerçekleştirilen ELİSA deneyleri sonucunda bulunan değerler Şekil 27’de gösterilmiştir.



Şekil 27. Albumin miktarının saptanmasında kullanılacak olan formülün saptanmasında kullanılan grafik

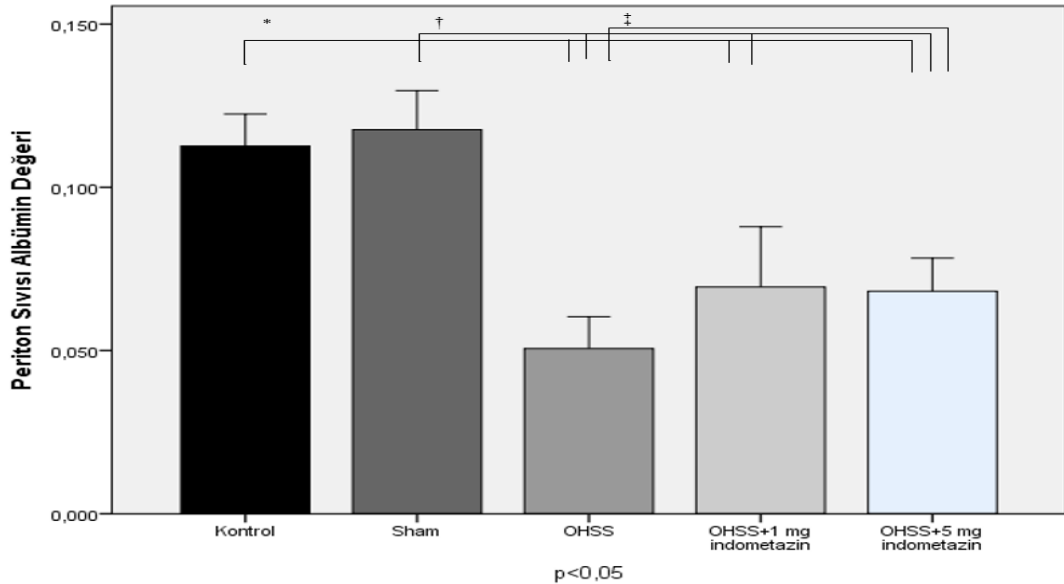
4.4.6.1. Periton Sıvısı Albumin Değerleri

Grupların periton sıvısı albümin değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. Gruplara ait birim başına düşen periton sıvısı albümin değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sıfır Kontrol Grubu	0,113±0,012 mg/μg
OHSS Sham Grubu	0,118±0,014 mg/μg
OHSS Grubu	0,051±0,014 mg/μg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,069±0,026 mg/μg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,068±0,014 mg/μg

Albümin periton verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve iki grubun normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Buna göre; grupların albümin periton değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Hangi gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek amacıyla yapılan Mann Whitney U testi sonucunda Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında; Grup 3 ile Grup 5 arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 28’de gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 28. Periton sıvısı Albumin/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik.

Grup 1 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 2 ile Grup 3, Grup 4 ve Grup 5; Grup 3 ile Grup 5 arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).

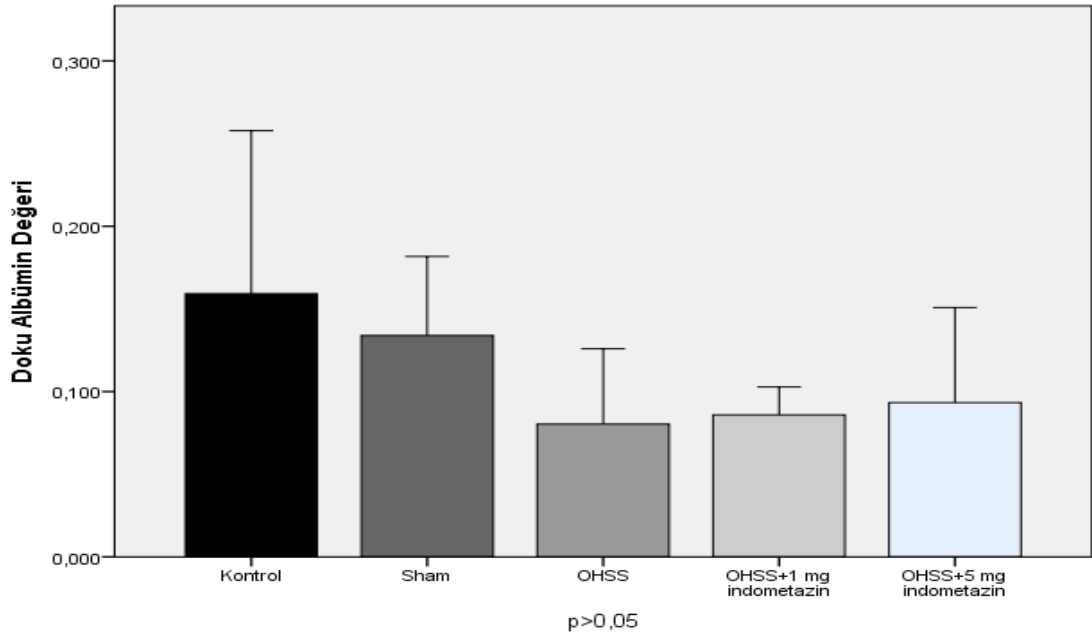
4.4.6.2. Doku Albumin Değerleri

Grupların doku albumin değerlerinin ortalamalarına ait betimsel istatistikler Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Gruplara ait birim başına düşen doku albumin değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
Sfır Kontrol Grubu	0,159±0,094 mg/μg
OHSS Sham Grubu	0,134±0,046 mg/μg
OHSS Grubu	0,080±0,043 mg/μg
OHSS + 1mg/kg İndometazin Grubu	0,086±0,016 mg/μg
OHSS + 5mg/kg İndometazin Grubu	0,093±0,055 mg/μg

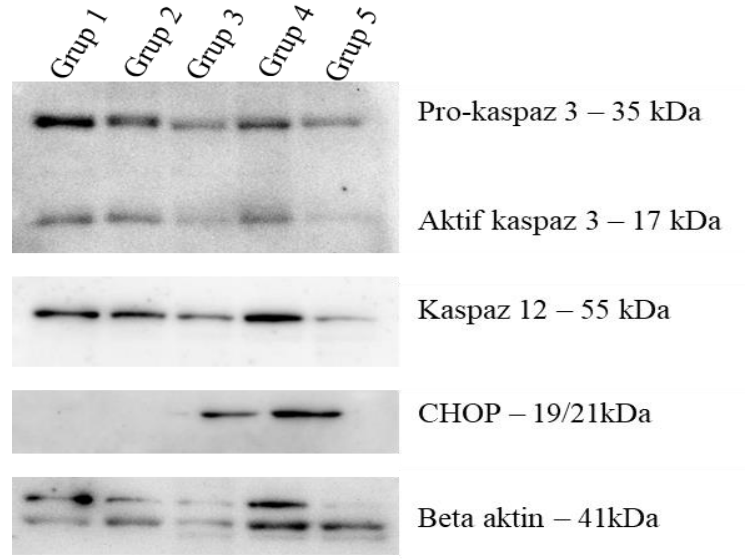
Albümin doku verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi ve iki grubun normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Bu nedenle test ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığı Kruskal-Wallis H testi ile incelendi. Buna göre; grupların albümin doku değerlerinin ortalamalarının, gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği görülmektedir. Gruplar arası karşılaştırma ile ilgili sonuçlar Şekil 29'da gösterildiği gibi çıkmıştır.



Şekil 29. Doku Albumin/BCA değerlerinin gruplar arası dağılımını gösteren grafik. Gruplar arası anlamlı farklılık tespit edilemedi.

4.5. Western Blot Deneylerine Ait Bulgular

Western blot deneylerinde aktif kaspaz 3, kaspaz 12, CHOP ve beta-aktin protein ekspresyonu belirlendi. Resim 26, elde edilen örnek bantların niteliksel temsil görüntülerini göstermektedir.



Resim 26. Gruplara ait farklı proteinlerin ifadelenme derecelerinin temsil görüntüleri

Pro-kaspaz 3 proteini tüm gruplarda ifadelenirken, yoğunlukları artan sırayla; Grup 3, Grup 5, Grup 4 Grup 2 ve Grup 1 şeklindedir.

Aktif kaspaz 3 proteini tüm gruplarda ifadelenirken, yoğunlukları artan sırayla; Grup 5, Grup 3, Grup 2, Grup 1 ve Grup 4 şeklindedir.

Kaspaz 12 proteini tüm gruplarda ifadelenirken, yoğunlukları artan sırayla; Grup 5, Grup 3, Grup 2, Grup 1 ve Grup 4 şeklindedir.

CHOP proteini Grup 4 ve Grup 5'te ifade edilirken; Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te ifade saptanmadı. Grup 5'te ifadelenmenin Grup 4'e kıyasla daha yüksek olduğu söylenebilir.

5. TARTIŞMA

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Yardımcı Üreme Teknolojileri İzleme Komitesi (ICMART) tarafından, bir yıl veya daha uzun süre boyunca düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememe durumu olarak tanımlanan bir üreme sistemi bozukluğudur (Zegers-Hochschild, Adamson, de Mouzon, Ishihara, Mansour, Nygren, Sullivan ve Vanderpoel, 2009). Bu sorun, dünya genelinde 186 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (Inhorn ve Patrizio, 2015).

Hem erkek hem de kadın kaynaklı olabilen infertilite, bazen her iki tarafın katkısıyla da ortaya çıkabilir. Erkek infertilitesinin temel nedenleri arasında azospermi ve koital infertilite bulunur. Bunlar, varikosel, testis yetmezliği, genital enfeksiyonlar, hormonal dengesizlikler, yaşlanma, obezite, sigara ve alkol tüketimi, çevresel maruziyetler ve oksidatif stres gibi faktörlerle ilişkilendirilmiştir (Mamuna ve Menaz, 2017). Kadınlarda ise infertilite; polikistik over sendromu (PCOS), endometriozis, hormonal bozukluklar, yaşlanma, genetik problemler, obezite, yaşam tarzı alışkanlıkları ve çevresel toksinlere maruz kalma gibi durumlarla bağlantılıdır (Hart, 2016; Ziv-Gal ve Flaws, 2016). Ayrıca, hem erkeklerde hem de kadınlarda açıklanamayan (idiopatik) nedenler de infertiliteye yol açabilir.

Yardımcı Üreme Teknolojileri (YÜT), infertiliteye bağlı olarak gebelik elde edemeyen bireyler için etkili bir çözüm sunmaktadır (Adamson, de Mouzon, Chambers, Zegers-Hochschild, Mansour, Ishihara, Banker ve Dyer, 2018). Günümüzde YÜT yöntemlerine başvuru oranı dünya genelinde artış göstermektedir (Farquhar ve Marjoribanks, 2018). YÜT kapsamında birçok farklı uygulama bulunmakla birlikte, en sık tercih edilen yöntemler intrauterin inseminasyon (IUI), in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemleridir (Nardelli, Stafinski, Motan, Klein ve Menon, 2014).

IVF ile embriyo transferi prosedürü; ilaç veya enjeksiyonlarla ovaryumun hormonal olarak uyarılarak oositlerin olgunlaştırılması, ultrason eşliğinde ya da laparoskopi yardımıyla olgunlaşmış oositlerin toplanması, laboratuvar ortamında oosit ve spermin

birleştirilmesiyle döllemenin sağlanması ve son olarak döllemiş embriyoların uterusu transfer edilmesi şeklindedir (Eugster ve Vingerhoets, 1999).

IVF, infertilite tedavisi için etkili bir yöntem olmasına rağmen bazı riskler barındırmaktadır. Bunlar; çoğul gebelik, prematüre doğum ve düşük doğum ağırlığı, oositlerin elde edilmesi sırasında yapılan hormonal uyarıma bağlı olarak ortaya çıkan Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS)'dir (Eugster ve Vingerhoets, 1999; Pelinck, Hoek, Simons ve Heineman, 2002).

OHSS, genellikle infertilite tedavilerinin bir yan etkisi olarak ortaya çıkmaktadır. Nadiren de doğal ovaryan döngü sırasında görülebilen bir durumdur.

OHSS, büyük ölçüde büyümüş ovaryumlar, çok sayıda ovaryan kist ve kapiller geçirgenliğin artması sonucu damar içinden üçüncül boşluklara sıvı kaçıışı ile karakterizedir. Bu sıvı birikimi genellikle karın boşluğunda gerçekleşirken, ağır vakalarda plevral veya perikardiyal alanlara da yayılabilir (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Güçyetmez ve Ayyıldız, 2013). OHSS vakalarında, ovaryumlar sıvı dolu foliküllerle doludur ve hacim olarak büyümüştür.

OHSS'nin patofizyolojisi tüm yönleri ile henüz aydınlatılamamış durumdadır. Temel mekanizma içerisinde rol aldığı düşünülen etkenin; oosit olgunlaşmasını tetiklemek için uygulanan hCG'nin granuloza hücrelerinde masif lüteinizasyona sebep olması ve granuloza hücreleri tarafından VEGF salgılanması olduğu düşünülmektedir. VEGF, etkili vazoaktif bir glikoproteindir ve vasküler geçirgenlikle birlikte anjiyogenezi de artırarak OHSS'nin patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır (Roberts ve Palade, 1995) ve yapılan çalışmalar ile şiddetli OHSS durumlarının, daha yüksek VEGF seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Çetin, Göktolga ve Çetin, 2017; Levin, Rosen, Cassidenti, Yee, Meldrum, Wisot ve Pedram, 1998; Namavar Jahromi, Parsanezhad, Shomali, Bakhshai, Alborzi, Moin Vaziri ve Anvar, 2018; Pellicer, Albert, Mercader, Bonilla-Musoles, Remohi ve Simon, 1999).

VEGF molekülü biyolojik aktivitesini, endotelial hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanarak gösterir (Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman ve Schuh, 1995). VEGF için tanımlanan spesifik endotelial hücre membran reseptörleri; VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) ve VEGFR-3'tür (Shibuya, 2011). Bu reseptörlerden Flk-1/KDR reseptörü, vasküler geçirgenlikte, anjiyogeneze ve

vaskülogenezde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle bu reseptörü hedefleyen anti-kanser tıropatik yaklaşımların sayısı oldukça fazladır.

VEGF ve OHSS arasındaki ilişkinin özeti; hCG uygulamasına yanıt olarak OHSS gelişen kadınlarda, granüloza-lutein hücreleri ve endotel hücreleri tarafından VEGF üretilmektedir. Buna bağılı olarak, granüloza lutein hücrelerinde VEGF ve Flk-1/KDR reseptörünün mRNA ekspresyonu önemli ölçüde artış göstermektedir. VEGF daha sonra foliküler sıvıya salınarak hem otokrin hem de parakrin bir şekilde vasküler geçirgenliğin en üst seviyeye ulaşmasına sebep olmaktadır (Gomez, Soares, Busso, Garcia-Velasco, Simon ve Pellicer, 2010; Scotti, Abramovich, Pascuali, Irusta, Meresman, Tesone ve Parborell, 2014).

OHSS gelişimi ve/veya şiddeti üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak etkili olabileceğı önerilen diğeri bir faktör ise histamindir. Histaminler, hemen hemen bütün dokularda bulunur ve çoğunlukla mast hücre granüllerinde ve bazofiller ile eozinofillerde üretilir/depolanır. Histaminler, inflamasyon veya aşırı duyarlılık reaksiyonlarının gelişmesi durumuna, vazodilatasyon, ödem, artmış vasküler geçirgenlik ve düz kas kasılması da dahil olmak üzere pek çok cevap oluşturulmasını sağlar (Benly, 2015). Elimizde mevcut olan ilişkili bir bilgi de; ovaryumlardaki mast hücre sayısı ovarian siklus aşamasına bağılı olarak farklılık gösterdiğiidir. Yani ovaryumdaki mast hücre sayısı, hormon seviyelerine bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Bu durum ovaryum dokusundaki histamin miktarının OHSS ile ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Ancak histaminin OHSS gelişimindeki rolü, çelişkili verilerin mevcut olması sebebiyle henüz kesinlik kazanmamıştır.

Günümüzde OHSS'yi tamamen ortadan kaldırabilecek henüz bir yöntem mevcut değildir (Namavar Jahromi, Parsanezhad, Shomali, Bakhshai, Alborzi, Moin Vaziri ve Anvar, 2018). OHSS gelişimini önlemek için uygulanabilecek yöntemler iki sınıfta toplanabilir (Humaidan, Quartarolo ve Papanikolaou, 2010). Birincil önleme yöntemleri; hormon dozlarını ve tedavi süresini azaltmayı, GnRH antagonist protokollerinin kullanılmasını, luteal faz desteğı için hCG enjeksiyonlarından kaçınılmasını, in vitro maturasyonun uygulanmasını ve insülin direncinin ovarian işlev bozukluklarındaki etkisi nedeniyle metformin gibi insülinle ilişkili ilaçların kullanılmasını içermektedir. İkincil önleme yöntemleri arasında ise, serum östrodiol (E₂) seviyeleri normale dönene veya önemli ölçüde azalıncaya kadar gonadotropin stimülasyonunun durdurulması ve hCG

uygulanmasının ertelenmesini içeren yavaşlatma (coasting) yöntemi, hCG'nin düşük dozlarda uygulanması, oosit ve embriyoların kriyoprezervasyon yöntemiyle dondurulması ve E₂ seviyeleri düzeldiğinde tedaviye devam edilmesi yer almaktadır. Ayrıca, ovulasyonu tetiklemek için gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri (GnRHa) ve rekombinant LH gibi alternatif ajanların kullanılması, hCG döngüsünün iptali gibi yöntemler, erken OHSS gelişimini önlemek için etkili ikincil önlemler arasında sayılabilir (Aboulghar, 2009; Humaidan, Quartarolo ve Papanikolaou, 2010; Manno, Tomei, Marchesan ve Adamo, 2005; Namavar Jahromi, Parsanezhad, Shomali, Bakhshai, Alborzi, Moin Vaziri ve Anvar, 2018).

OHSS tedavi yöntemleri semptomatik ve deneyseldir. Hastanın klinik tablosu ve ilgili risk faktörleri göz önüne alınarak, hekimin deneyimi ve gözlemlerine dayanarak seçilmekte ve uygulanmaktadır (Al-Shawaf ve Grudzinskas, 2003). Bu yöntemler ise daha çok hastada ortaya çıkan sorunları ortadan kaldırmaya yönelik gözlemsel süreçlere ve geçici sonuçlara dayanmaktadır. Ayrıca hastanın bireysel tedavisi, OHSS'nin şiddetine ve herhangi bir ikincil komplikasyon varlığına göre değişiklik gösterebilmektedir. Bunların yanı sıra, siklusu baskılamanın dışında uygulanan yöntemlerin hiçbiri tamamen verimli değildir (Delvigne ve Rozenberg). Siklus baskılama ise İVF başarısındaki düşüş ve zaman kaybı açısından verim düşüklüğü ile sonuçlanmaktadır.

NSAID, antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilere sahip bir ilaç grubudur (Phillips ve Currier, 2004). NSAID'lerin ana etki mekanizması, hücre zarı üzerinde yer alan Cox-1 ve Cox-2 enzimlerinin inhibisyonu üzerinedir. Bu enzimler, araşidonik asidin tromboksanlara, prostaglandinlere (PG) ve prostasiklinlere dönüştürülmesinde rol oynar (Vane, 1971). Prostaglandinler pro-inflamatuvar moleküllerdir ve fizyolojik ve/veya patolojik olarak ortaya çıkan anjiyojenezde ve vazodilatasyonda görev alır (Form ve Auerbach, 1983; Gately, 2000; Ghlichloo ve Gerriets, 2020; Harada, Nagy, Sullivan, Thomas, Endo, Rodan ve Rodan, 1994). İndometazin bu ilaç grubuna dahil olan bir ilaçtır ve benzer etkilere sahiptir (Nalamacho ve Wortmann, 2014).

Bu tez çalışması ile, indometazinin OHSS üzerindeki etkilerini biyokimyasal, yapısal ve moleküler seviyelerde ayrıntılı olarak araştırmayı ve literatürdeki mevcut çelişkili bilgilere açıklık getirmeyi amaçlandı. Ayrıca yakın dönemde OHSS'nin patofizyolojisinde etkili olabileceğine dair bulgular sunulan ER stres mekanizması üzerinde indometazin kaynaklı değişiklikleri saptamayı ve OHSS ile ER stres arasında doğrudan bir bağlantı

kurmayı amaçlandı. Ayrıca literatürdeki çelişkili sonuçlardan biri olan histaminin OHSS üzerindeki etkilerini araştırarak açıklık getirmeyi ve indometazinin OHSS semptomlarında meydana getirebileceği potansiyel değişiklikler sonrasında histamin içeriğinde değişiklik olup olmayacağını saptamayı hedeflendi. Tüm bunlara ek olarak, yaptığımız araştırma ile farklı dozlarda uygulanan indometazinin etkileri kıyaslanmış ve etkili olan dozun belirlenmesine katkı sağlanmasını amaçlandı.

İlk OHSS hayvan modeli, 1969 yılında Polishuk and Shenker tarafından yetişkin tavşanlar ile oluşturuldu (Polishuk ve Shenker, 1969). Ardından pek çok araştırmacı tarafından bu yöntem kullanılmaya devam edildi. Ancak 1980 yılında Lindenbaum ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yetişkin sıçanlarda OHSS deney modeli oluşturulmasında başarılı olunamamıştır (Lindenbaum, Sela, Itzkovitz, Beach ve Brandeis, 1980). Bu nedenle OHSS deney modeli oluşturma protokollerinde immatür hayvanlar kullanılmaya başlanmıştır. Bunun sebebi; immatür hayvanların henüz geçmiş sikluslar nedeniyle oluşmuş olan korpus luteumdan etkilenmemiş olması ve OHSS deney modelinin oluşturulabilmesini etkileyebilecek olan ovaryum siklusunun genç yaştaki sıçanlarda henüz başlamamış olmasıdır. Ayrıca immatür hayvanların fizyolojisine dair geniş bir bilgi ağı mevcut olmasıdır (Ujioka, Matsuura, Kawano ve Okamura, 1997). Bu çalışmada da OHSS deney modelini oluşturmak için 22 günlük immatür sıçanlar tercih edildi. Deney hayvanlarında OHSS hastalık modelini oluşturmak için 4 ardışık gün boyunca çok sayıda folikül oluşumunu uyarmak için 10 IU PMSG subkutan olarak enjekte edildi. Ardından, 5. gün süperovulasyonu tetiklemek için 30 IU hCG subkutan olarak enjekte edildi. Deneyin 7. gününde sıçanlar kurban edildi.

OHSS kaynaklı olarak ortaya çıkan vasküler geçirgenliği test etmek için evans blue boyası kullanılabilir. Evans blue boyası vital bir boyadır. Çalışma prensibi ise serumda bulunan albümine bağlanmasına dayanmaktadır. Eğer vasküler geçirgenlik artmışsa, üçüncül boşluklara sızmış olan evans blue boyası sebebiyle ilgili bölgelerde mavi renkli sıvı gözlemlenmektedir. Ardından bu sıvı toplanarak renk yoğunluğu için spektrofotometrede 620 nm’de ölçülür ve vasküler geçirgenlik miktarı belirlenir. Yaptığımız ön çalışmada, evans blue boyası ile vasküler geçirgenliği ölçtük. Bu yöntemle vasküler geçirgenlik ölçülebiliyor olsa da vasküler geçirgenliğin neredeyse hiç gözlemlenmediği kontrol ve sham gruplarında ovaryum dokularının evans blue boyası nedeni ile mavi renkli kaldıkları gözlemlendi. Bu durum yapılacak olan ileri deneyler için potansiyel bir problem

teşkil edebileceği için bu yöntem uygulanmaktan vazgeçildi. Bunun yerine, evans blue boyama protokolü ile benzer işleyiş gösterecek olan periton sıvısından peritoneal lavaj yapılması ve ardından bu sıvının ELİSA kiti kullanılarak spektrofotometrede ölçülmesi gerçekleştirildi.

OHSS, klinik olarak, vasküler geçirgenlikteki artış sebebiyle intravasküler alandan üçüncül boşluğa sıvı kaçıışı gözlemlenmektedir. Ayrıca ovaryumlarda çoklu kistik folikül oluşumu ve buna bağlı olarak ovaryumların hacimce ve ağırlıkça artması ile karakterize bir sendromdur (Palomba, Costanzi, Nelson, Caserta ve Humaidan, 2023). Yapmış olduğumuz çalışmanın makroskobik bulguları, bu bilgileri doğrular niteliktedir. Çalışmamızın makroskobik bulgularında; 2 mL serum fizyolojik peritoneal kaviteye verildikten ve peritoneal lavaj yapıldıktan sonra, peritoneal kaviteden toplanan sıvı hacimlerinde farklılık olduğu saptandı. Grup 1 ve Grup 2’de toplanan hacim yaklaşık 2 mL, OHSS deney modeli oluşturulmuş olan Grup 3’te yaklaşık 3,5 mL, 1 mg/kg indometazin verilen Grup 4’te yaklaşık 3 mL, 5 mg/kg indometazin verilen Grup 5’te ise yaklaşık 2,5 mL oldu. Bu bulgular, OHSS deney modelinin başarılı olarak oluşturulduğu ve üçüncül boşluklara sıvı salınımı olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca indometazin verilen gruplarda toplanan sıvı hacminde görülen azalma indometazinin vasküler geçirgenliği ve üçüncül boşluklara sıvı kaçışını azalttığını göstermektedir. Diğer bir makroskobik bulgumuz ise, ovaryum hacimleri üzerine oldu. Grup 3’ün over dokuları en büyük iken, Grup 1 ve Grup 2’de en küçük durumdadır. İndometazin uygulanmış olan gruplarında ise; 5 mg/kg indometazin verilen Grup 5’te, 1 mg/kg indometazin verilen Grup 4’e kıyasla daha küçük over dokusu gözlemlenmiştir. Ayrıca, overlerin makroskobik görüntüsünde OHSS deney modeli oluşturulmuş olan gruplarda belirgin bir vaskülerizasyon ve kistik folikül yapıları gözlemlendi. Tüm bu makroskobik bulgular, OHSS deney modelinin başarılı olarak oluşturulduğunu ve indometazin’in OHSS üzerinde makroskobik düzeyde tedavi edici yönde pozitif etkileri olduğunu göstermektedir. Ovaryum hacminde meydana gelen artışın yanı sıra, deneylerin sonunda ölçülen over ağırlıkları da benzer sonuçları vererek klinik tabloyu doğrular niteliktedir. Over ağırlıkları açısından, kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık görülmez iken, OHSS deney modeli oluşturulan gruplarda kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı over ağırlık artışı gözlemlendi. Bu bulgularımız mikroskobik gözlemlerle de desteklenmiştir. Rutin boyama yapılmış olan preparatlarda, kontrol ve sham grubuna ait

olan ovaryum dokuları olağan bir histolojiye sahipken, OHSS deney modeli oluşturulan gruplarda patofizyolojik değişimler karşımıza çıktı. Bunların başında; OHSS oluşturulan gruplarda karşımıza çıkan çok sayıdaki kistik folikül yapıları ve hiperstimulasyona cevaben ortaya çıkmış artmış miktarda korpus luteum yapıları oldu. Bu gruplarda kistik folikül yapılar neredeyse tüm ovaryum dokusunu kapsayacak kadar büyük gözlemlendiler ve korteks ile medulla bölgelerinde hemorajik bölge odakları saptandı. Bu bulgularımız hem OHSS patofizyolojisi ile hem de klinik seyri ile uyushmaktadır. Ayrıca bu bulgular, yapılmış olan OHSS çalışmalarını destekler niteliktedir (Pala, Atılgan, Özkan, Kavak, İlhan, Akpolat ve Sapmaz, 2015; Pascuali, Scotti, Oubiña, de Zúñiga, Gomez Peña, Pomilio, Saravia, Tesone, Abramovich ve Parborell, 2020; Scotti, Irusta, Abramovich, Tesone ve Parborell, 2011; Scotti, Abramovich, Pascuali, Irusta, Meresman, Tesone ve Parborell, 2014). İndometazin uygulanmış olan gruplarda doz artışı ile birlikte kistik foliküllerin çaplarında küçülmeler olduğu gözlemlendi. Tüm bu bulgular, indometazinin, doz artışı ile paralel olarak olumlu şekilde, OHSS'nin makroskobik ve mikroskobik semptomları üzerinde etkileri olduğunu göstermektedir.

OHSS hastalarında vasküler geçirgenlikte meydana gelen artış ile birlikte vücutta ödem oluşumu ve kilo artışı da gözlemlenmektedir (Ateş, Dilbaz, Ergani ve Atabay, 2023; Pala, Atılgan, Özkan, Kavak, İlhan, Akpolat ve Sapmaz, 2015; Pascuali, Scotti, Oubiña, de Zúñiga, Gomez Peña, Pomilio, Saravia, Tesone, Abramovich ve Parborell, 2020). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, sıçanların ağırlık artış değişimleri bu veriler ile uyumlu olarak tespit edildi. Sıçan ağırlık artışları açısından, kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık görülmez iken, OHSS deney modeli oluşturulmuş olan gruplarda kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ağırlık artışı gözlemlendi. Bu bulgularımız hem OHSS patofizyolojisi ile hem de klinik seyri ile uyushmaktadır.

İnflamatuar sinyaller, mast hücrelerinin inflamasyon bölgesine toplanmasına ve çoğalmasına sebep olabilmektedir (Knox, 1974). OHSS gelişmesi durumunda inflamasyon sinyallerinde ve belirteçlerinde artış meydana gelmektedir. Bu nedenle yaptığımız bu çalışmada, mast hücrelerinin OHSS'de değişimlerini incelediğimizde, kontrol ve sham gruplarında mast hücrelerini medulla bölgesinde yoğunlaşmış olarak gördük. Ayrıca bu gruplarda mast hücrelerinin granülleri küçüktü. Bu nedenle mast hücreleri de küçük çapta gözlemlendi. OHSS deney modeli oluşturulmuş olan deney gruplarında ise mast hücreleri

yoğunlukla germinal epitel ve tunika albuginea bölgelerinde yerleşim gösterdi. Ayrıca mast hücrelerinin granülleri daha büyük gözlemlendi. Bu nedenle mast hücrelerinin çapları da daha büyüktü. Bu gruplarda granüller koyu boyalı olarak karşımıza çıktı. Bu bulgular, OHSS durumunda mast hücrelerinin hem yerleşim bölgesinde hem de içerdikleri granül yoğunluğunda farklılık gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Mast hücreleri çeşitli uyarılar sonucunda aktive olduklarında, hücre içi granüllerini salgılayarak mevcut konumlarında değişiklik gerçekleştirebilirler (Bayramgürler ve Demirsoy, 2013). Ayrıca doku hasarı durumlarında, mast hücreleri hasarlı bölgeye göç ederek doku onarımına yardımcı olmaktadır. Bu işlem için, fibroblastları uyarır ve kollojen sentezini artırır. Böylelikle fibrozis durumu karşımıza çıkar (Bostancieri, Duran ve Yüncü, 2020). OHSS gelişimi sonucunda fibrozisin tetiklenmesi, pek çok moleküler yolak aktivasyonu sonucunda, potansiyel olarak değerlendirilmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada mast hücrelerinde meydana gelen değişiklikler neticesinde over doku fibrozisinin başlamış olabileceğini düşünmekteyiz. Bu durumun kesinlik kazandırılabilmesi adına, fibrozis belirteçleri ile gerçekleştirilecek olan analizler faydalı olacaktır. OHSS’de mast hücrelerinin katkısı ile ilgili literatürde çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada mast hücrelerinin OHSS’de etkili olduğunu göstermektedir.

1974 yılında yapılan bir çalışma ile sistemik histamin blokojı uygulanmasının OHSS gelişiminin engellenmesinde etkili olabileceği yönünde sonuçlar bildirilmiştir (Gilfillan ve Beaven, 2011; Knox, 1974). Fakat literatürde bu sonucun tam tersini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Erlik, Friedman, Ben-David ve Paldi, 1979). Çalışmamızda OHSS’de mast hücrelerinin gruplar arasındaki farklılıklarının, mast hücrelerinin içermiş olduğu histamin granüllerinin degranülasyonu ile paralellik gösterip göstermediğini saptamak için ek deney gerçekleştirdik. Bunun için, serumdan histamin degranülasyon değeri ölçümü gerçekleştirildi. Kontrol ve sham grupları arasında histamin degranülasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık saptanmadı. Ancak OHSS grubunda histamin degranülasyonu, kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıktı. Elde edilen bu sonuç, mast hücrelerinde meydana gelen değişikliklerle korelasyon göstermemektedir. Ancak mast hücre aktivasyonu ile degranülasyonu arasındaki ilişki oldukça karmaşıktır. Literatürde mevcut olan bazı çalışmalar, mast hücre aktivasyonu ile degranülasyonu arasındaki ters ilişkiyi ispatlamaktadır (He ve Xie, 2004; Gordon ve Galli, 1991; Bot, van der Velden, Bouwman, Kröner, Kuiper, Quax ve de Vries, 2020).

Bizim bulgumuz da mast hücre aktivasyonu ile degranülasyonu arasındaki ters ilişkiye dair veri sunmaktadır. Mast hücre aktivasyonunu belirlemek için histamin degranülasyonunun yanı sıra serumdan triptaz seviyesinin de kontrol edilmesinde faydalı olacağını düşünmekteyiz. Bunların yanı sıra, düşük doz indometazin uygulanan grupta histamin degranülasyonu daha yüksek saptandı. Yüksek doz indometazin uygulanmış olan grupta ise düşük doz indometazin uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşüş saptandı. Bu durum indometazinin doz ile ters ilişki göstererek histamin degranülasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. Literatürde mevcut olan bazı çalışmalarda, indomethazin'in mast hücre degranülasyonunu ve histamin salınımını azalttığı göstermekte iken (Behera, Mohanty, Ramani, Rath ve Pradhan, 2012; Okayama, Yoshida, Uchiyama, Takagi, Yoshikawa 2009), bazı çalışmalar ise indomethazin'in mast hücre aktivasyonunu artırarak histamin salınımını uyardığını göstermektedir (Maruyama, Goto, Hiramoto, Tanaka ve Ooi, 2022; Yokoyama, Hiramoto, Koyama ve Ooi, 2014). Bu durum çalışılan doku ve kullanılan ilaç dozu sebepleriyle farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda serum ve doku E₂ seviyelerinde, OHSS grubunda kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptandı. Yapmış olduğumuz makroskobik, mikroskobik ve fizyolojik araştırmalar OHSS deney modelinin başarılı olarak oluşturulduğunu destekler nitelikteyken, E₂ seviyesindeki düşüklük mevcut bazı çalışmalar ile çelişki göstermektedir (Gunnala, Melnick, Irani, Reichman, Schattman, Davis ve Rosenwaks., 2017; Sun, Ma, Li, Hu, Wang, Zhang, Dai, ve Sun, 2021; Ben Hameid, Al-Sindi, Allow, Nafie, Alahmad, ve Faisal, 2019; Chen, Sun, Xia, Sui, Zhou, Huang, Zhou, Shao, Shen, Sun, Liang ve Yao, 2016). Ancak yüksek E₂ seviyeleri tek başına OHSS için iyi bir belirleyici değildir (Fiedler ve Ezcurra, 2012). OHSS'nin overde bulunan korpus luteum ve kistik folikül miktarında meydana gelen artışlarla da birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Fiedler ve Ezcurra, 2012). Çalışmamızda elde ettiğimiz düşük E₂ seviyesi bulgularının sebebi olarak; OHSS durumunda aromataz aktivitesinde meydana gelen bozulmalar kaynaklı östrojen dönüşümünün azalması olabileceğini düşünmekteyiz (Li, Yuan, Hunt, Chen, Si ve Li, 2023). Bu bozulmanın foliküler sıvıdaki Growth Differentiation Factor-8 (GDF-8) yani myostatin seviyelerindeki artıştan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Fang, Yan, Wang, Guo, Li, Jia, Han, Liu, Cheng ve Sun, 2021). Bu nedenle E₂ seviyesinin konfirmasyonu için foliküler sıvıdaki myostatin seviyelerinde meydana gelebilecek olan değişikliklerin de kontrol edilmesinin faydalı olacağına

inanmaktayız. E₂ seviyesinin düşük çıkmasında etkili olabileceğini düşündüğümüz diğer faktörler ise; erken luteinizasyon gerçekleşmesi ile östrojen üretiminden progesteron üretimine kayma yaşanması (Lawrenz, Bixio, Coughlan, Andersen, Melado, Kalra, Savjani, Fatemi ve Kumar, 2020), hipotalamus-hipofiz-over eksenindeki geri besleme mekanizması ile yüksek over yanıtına rağmen düşük E₂ seviyelerinin gözlemlenmesi ve OHSS deney modeli oluşturulurken kullanılan hormon miktarları ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Daha yüksek dozlarda hormon kullanımı ile daha şiddetli OHSS tetiklenebileceğini ve bu durumda E₂ seviyelerinde yükselme meydana gelebileceğini düşünmekteyiz.

OHSS durumunda yüksek serum E₂ seviyesi, granüloza hücrelerinden VEGF salınımını tetiklemektedir (Wang, Li, Ye, Zhang, Li, ve Wang, 2018; Zhuo, Li, Zheng, Fan, Ma, Chen, Zhao, Liu, Tang, Cheng ve Feng, 2018). VEGF, OHSS patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, serum VEGF değerleri ELİSA testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olan ancak bilinen patofizyoloji ile uyumsuz olan sonuçlar bulundu. Bu durumun VEGF değerlerine sadece serum örnekleri üzerinden bakmış olmamızla ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Folikül sıvılarının da VEGF konsantrasyonu açısından değerlendirilmesinin mevcut bilgilerimize katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. OHSS'nin ilerleyen aşamalarında VEGF, serumdan üçüncül boşluklara geçiş yapabilir. Bu durum, serumda VEGF seviyelerinin düşük görünmesine neden olabilir. Peritoneal sıvıdan yapılacak olan VEGF seviyesi ölçümünün bu noktada faydalı olacağını düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra foliküler sıvıdaki VEGF miktarının tayini de gerçekleştirilerek, üç aşamalı VEGF seviyesi belirlenmesinin daha sağlıklı sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz. Ayrıca Serum E₂ seviyelerinin düşük olması sebebiyle VEGF salınımının tetiklenmesinin düşük kalmış olabileceğini düşünmekteyiz. Serum E₂ seviyelerinde tespit ettiğimiz gibi, VEGF değerindeki sonuçlar için de OHSS şiddetinin de etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Hem serum hem de doku örneklerinden bakmış olduğumuz VEGFR-2 miktarı sonuçlarına göre; serumda kontrol ve sham grubu ile OHSS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptandı. Bu durum serum örneklerinde elde ettiğimiz VEGF seviyesi ile uyumlu bir sonuç göstermektedir. Ayrıca ilaç uygulanmış olan gruplardaki düşüş daha belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde saptandı. Bunun ardından over dokusunda bakılan VEGFR-2 seviyelerinde ise, kontrol ve sham grubu ile OHSS grubu arasında, serum verilerine kıyasla daha belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş

saptandı. Bu düşüş indometazin uygulanmış olan gruplarda da istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı. VEGFR-2 seviyesinde ortaya çıkan bu düşüşün, VEGF'in çözünür VEGFR-2'ye (sVEGFR-2) bağlanması sonucu VEGF seviyesinin düşmüş ve toplam VEGFR-2 seviyesinin düşmüş olması ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda VEGF seviyesinde karşımıza çıkan geri besleme mekanizmasının VEGFR-2 için de etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Periton sıvısında ELİSA yöntemi ile analiz ettiğimiz albümin miktarı, kontrol ve sham gruplarına kıyasla OHSS deney modeli oluşturulmuş gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sergiledi. Over dokusundaki albümin miktarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Periton sıvısındaki albümin miktarı tayinini vasküler geçirgenliği test edebilmek için evans blue boyamasına alternatif bir yöntem olarak düşünmüştük. Ancak ELİSA verilerine göre periton sıvısındaki albümin miktarı hipotezimizle ters düşecek şekilde düşük saptandı. OHSS'de artan vasküler geçirgenlik ile üçüncül boşluklara sıvı kaçıışı meydana gelir. Ancak bu sıvı proteinden fakirdir. Bu nedenle periton boşluğundaki sıvı hacmi artarken albumin miktarı bu hacmi orantılı olarak karşılayamayabilir. Ayrıca üçüncül boşluklara sızmış olan mevcut albüminler sürekli olarak periton sıvısında bulunmayıp lenfatik sistem aracılığıyla tekrar dolaşıma geri dönerler. Tüm bunlar periton sıvısında albumin seviyesini düşük tutabilir. Ayrıca vasküler geçirgenliğin derecesi ile ilgili albümin seviyesinden daha doğru bir bilgi alabilmek için, serum albümin seviyeleri ile periton sıvısındaki albümin seviyelerinin oranının kıyaslanmasının etkili olacağını düşünmekteyiz.

Prokaspaz 3 ve aktif kaspaz 3, hücrelerde apoptoz (programlı hücre ölümü) süreçlerinde önemli rol oynayan enzimlerdir. OHSS sırasında artan vasküler geçirgenlik ve inflamasyon, over dokusunda oksidatif stres ve hücre hasara yol açabilir. Bu durumda OHSS'nin şiddeti arttıkça, aktif kaspaz-3 seviyelerinin artması beklenir. İndometazin, bir nonsteroidal antiinflatuar ilaç (NSAID) olarak COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe eder. Bu inhibisyon prostaglandin üretimini azaltır ve inflamasyonu baskılar. Prostaglandinlerin inflamasyon ve hücre ölüm süreçlerinde rol oynaması nedeniyle, indometazin apoptoz mekanizmalarını etkileyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca inflamasyonun baskılanması hücre stres faktörlerini azaltarak kaspaz-3 aktivitesinin azalmasına yol açabilir. Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz western blot deneylerinden elde edilen verilere baktığımızda; OHSS grubundaki prokaspaz 3 ve aktif kaspaz 3 ekspresyonlarının kontrol ve

sham grubu ile kıyaslandığında düşük olduğu saptandı. Bu durum yüksek doz indometazin uygulanan grupta daha belirgin olarak karşımıza çıktı. Bu, indometazinin OHSS üzerinde olumlu etkilerinin apoptozda meydana gelen düşüşle de gösterilebileceğine işaret etmektedir. OHSS durumunda kaspaz 3 seviyelerinin daha düşük çıkmasının sebebi olarak, başlatıcı kaspazların henüz efektör kaspaz aktivasyonunu tam olarak gerçekleştirmemiş olduğu düşünülebilir. Buna ek olarak santral dogma hesaba katıldığında, kaspaz seviyesinin sadece protein seviyesinde değil mRNA seviyesinde de ölçmenin daha net veri sumacağını düşünmekteyiz.

Kaspaz 12, ER strese özgü apoptotik bir proteazdır ve ER zarında yerleşim gösterir. Uzun süreli ER stres mevcudiyeti, kaspaz 12'nin aktif hale gelmesine yol açar. Yüksek doz indometazin uygulanmış olan gruptaki kaspaz 12 seviyesindeki düşüş, indometazinin ER stres üzerinde baskılayıcı bir rolü olabileceğini ya da indometazin kaynaklı patofizyolojinin iyileşmesi ile dokuda mevcut ER stres seviyesinin düşmüş olabileceğini düşündürmektedir. Bunun daha net bir şekilde ayırt edilmesi için ER stres durumunda aktive olan katlanmamış protein cevabının belirteçleri kontrol edilmesi faydalı olacaktır.

CHOP (C/EBP Homologous Protein), ER strese yanıt olarak aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. ER strese yanıt olarak aktif hale gelen katlanmamış protein cevabının artması durumunda CHOP ekspresyonu artar ve apoptoz indüklenir. Çalışmamızda indometazin uygulanmış olan gruplarda CHOP aktivasyonunun artmış olduğu saptandı. Bu durum ER stres aracılı apoptozun indometazin uygulanan gruplarda karşımıza çıktığını göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) sırasında uygulanan işlemler sonucunda görülen ve ciddi klinik etkilerle seyreden Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS), patogenezi tam olarak anlaşılamamış bir durumdur. OHSS'ye yönelik spesifik bir tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte, bu sendromun bilinen etkileri arasında ovaryumların büyümesi, vasküler yapılarda artış ve korpus luteum ile kistik folikül düzeylerinin artması yer almaktadır.

İndometazin, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler) sınıfına ait olan bir ilaçtır. Bu ilaç, inflamasyon, ağrı ve ateşi azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Etki mekanizması, prostaglandinlerin üretimini inhibe ederek inflamasyonu düşürmesi şeklindedir. İndometazin'in OHSS deney modeli oluşturulmuş sıçanlarda kullanımına dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmanın indometazin kullanımı açısından literatürde öncü bir araştırma niteliği taşıdığını düşünmekteyiz.

Yapmış olduğumuz çalışmada OHSS gruplarında, patofizyolojisi ile uyumlu olarak, ovaryumun hacimce genişlemiş, korpus luteum ve kistik folikül yapılarının sayıca artmış, vaskülarizasyonun artmış ve üçüncül boşluklara sıvı kaçıışı olduğu gözlemlendi. Bu etkilerin indometazin uygulanan gruplarda dozun arttırılması ile birlikte azaldığı gözlemlendi. Bu nedenle indometazinin OHSS üzerinde tedavi edici etkilerinin olduğunu düşünmekteyiz.

OHSS patofizyolojisine dair mevcut olan literatür bilgisi oldukça sınırlıdır ve çelişkili sonuçlar içermektedir. Bu çalışma ile OHSS patofizyolojisinde mast hücrelerinin de rolü olabileceği saptandı. İndometazin'in ise mast hücre sayısında düşüşe ve yerleşiminde değişikliğe sebep olarak OHSS semptomlarını iyileştirici etkisinin olduğu saptandı. Mast hücresinin OHSS'deki rolüne ait elde edilen verilerin matematiksel hesaplarla, sayı değişimi açısından değerlendirilmesine imkân sağlayacak yüzey belirteçleri ile flow-sitometri yöntemlerinin kullanılması ile analiz edilmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca mast hücre aktivasyonunun değerlendirilmesi için, serumdan triptaz aktivitesinin de kontrol edilmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Buna ek olarak, literatürde mevcut olan ve OHSS ile ilişkilendirilmiş VEGF ve E₂ seviyesine ait olan veriler ile bu çalışmada bulduğumuz veriler düşünüldüğünde; farklı zaman dilimlerinde, farklı yapılardan (serum, plazma, periton sıvısı, foliküler sıvı ve over doku) alınacak olan örneklerin VEGF ve E₂ seviyesine dair analiz edilmesinin OHSS patafizyolojisine büyük katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. E₂ seviyesindeki düşüş sebebini daha iyi anlayabilmek için, progesteron ile GDF8 seviyesinin ve aromataz aktivitesinin kontrolü faydalı olacaktır.

OHSS deney modeli oluşturmak için kullanılan hormon dozlarının arttırılması ile şiddetli OHSS'nin tetiklenmesi sağlanabilir. Böylelikle klinik tabloda etkili olduğu saptanan verilerin deney hayvanları modelinde de ortaya çıkarılması sağlanacaktır.

Ayrıca, OHSS'de indometazin'in uygulanmasının diğer organlar üzerindeki etkilerinin de araştırılması ile bu bileşiğin kullanımının yaygınlaştırılmasına ve daha geniş bir uygulama potansiyeline katkı sunabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Aboulghar, M. (2009). Symposium: Update on prediction prevention and management of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, 19, 33–42.
- Adamson, G. D., de Mouzon, J., Chambers, G. M., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker, M., ve Dyer, S. (2018). International committee for monitoring assisted reproductive technology: World report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertility and Sterility*, 110, 1067–1080.
- Al-Shawaf, T., ve Grudzinskas, J. G. (2003). Prevention and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 17(2), 249–261.
- Ardoin, S. P., ve Sundy, J. S. (2006). Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Opinion on Rheumatology*, 18, 221-26.
- Arıncı, K., ve Elhan, A. (1997). *Anatomi* (2. Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Ateş, Ç., Dilbaz, B., Ergani, S. Y., ve Atabay, F. (2023). Aflibercept suppresses ovarian hyperstimulation syndrome: an experimental study in rats. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 69(11), e20230789.
- Baumgarten, M., Polanski, L., Campbell, B., ve Raine-Fenning, N. (2013). Do dopamine agonists prevent or reduce the severity of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing assisted reproduction? A systematic review and meta-analysis. *Human Fertility (Cambridge)*, 16, 168-174.
- Bayramgürler, D., ve Demirsoy, E. (2013). Mast hücreleri ve aktivasyonu. *Turkderm*, 47(1), 37-40. <https://doi.org/10.4274/turkderm.47.s6>
- Behera, J., Mohanty, B., Ramani, Y., Rath, B., & Pradhan, S. (2012). Effect of aqueous extract of aegle marmelos unripe fruit on inflammatory bowel disease. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(5), 614. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.100389>

- Ben Hameid, A. S., Al-Sindi, T. A., Allow, A. K., Nafie, E. M., Alahmad, B. E., ve Faisal, G. G. (2019). Substantial Effect of Fenugreek Seeds Aqueous Extract on Serum Estradiol Level in Ovarian Hyperstimulation Syndrome Rat Model. *Oman medical journal*, 34(3), 238–243. <https://doi.org/10.5001/omj.2019.45>
- Benly, P. (2015). Role of histamine in acute inflammation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(6), 373-376.
- Bloor, M., ve Paech, M. (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the initiation of lactation. *Anesthesia and Analgesia*, 116(5), 1063–1075.
- Borenstein, R., Elhalah, U., Lunenfeld, B., ve Schwartz, Z. S. (1989). Severe ovarian hyperstimulation syndrome: A reevaluated therapeutic approach. *Fertility and Sterility*, 51(5), 791–795.
- Bostancieri, N., Duran, İ., ve Yüncü, M. (2020). Deneysel kriporşidizmde elektron mikroskopik inceleme ve mast hücre-fibrozis ilişkisi. *Bozok Tıp Dergisi*. <https://doi.org/10.16919/bozoktip.783053>
- Bot, I., van der Velden, D., Bouwman, M., Kröner, M. J., Kuiper, J., Quax, P. H., ve de Vries, M. R. (2020). Local mast cell activation promotes neovascularization. *Cells*, 9(3), 701.
- Busso, C. E., Garcia-Velasco, J., Gomez, R., Alvarez, C., Simon, C., ve Pellicer, A. (2008). Ovarian hyperstimulation syndrome. In B. Rizk, J. A. Garcia-Velasco, H. N. Sallam, & A. Makrigiannakis (Eds.), *Infertility and Assisted Reproduction* (pp. 243-257). New York: Cambridge University Press.
- Cenksoy, C., Cenksoy, P. O., Erdem, O., Sancak, B., ve Gursoy, R. (2014). A potential novel strategy: Inhibition of vasopressin-induced VEGF secretion by relcovaptan for decreasing the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in the hyperstimulated rat model. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 174, 86–90.
- Chatterjee, C. (2017). Evaluation of anti-inflammatory and immunosuppressive activities of indomethacin in experimental animal models. *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(4), 197-200.

- Chen, D., Burmeister, L., Goldschlag, D., ve Rosenwaks, Z. (2003). Ovarian hyperstimulation syndrome: Strategies for prevention. *Reproductive Biomedicine Online*, 7, 43–49.
- Chen, L., Sun, H. X., Xia, Y. B., Sui, L. C., Zhou, J., Huang, X., Zhou, J. W., Shao, Y., Shen, T., Sun, Q., Liang, Y., ve Yao, B. (2016). Electroacupuncture decreases the progression of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Reproductive biomedicine online*, 32(5), 538-544.
- Courbiere, B., Oborski, V., Braunstein, D., Desparoir, A., Noizet, A., ve Gamorre, M. (2011). Obstetric outcome of women with in vitro fertilization pregnancies hospitalized for ovarian hyperstimulation syndrome: A case-control study. *Fertility and Sterility*, 95(1), 629-632.
- Çetin, C., Göktolga, Ü., ve Çetin, T. (2017). Her yönüyle ovarian hiperstimülasyon sendromu. *Türkiye Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Dergisi (TJRMS)*, 1(1), 59-65.
- Çilgin, H. (2019). Can a cyclooxygenase inhibitor be an option for treatment of ovarian hyperstimulation syndrome? *Drug Design Development and Therapy*, 13, 1099–1105.
- Dawood, M. Y. (2006). Primary dysmenorrhea: Advances in pathogenesis and management. *Obstetrics and Gynecology*, 108(2), 428-41.
- Delvigne, A. (2009). Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Epidemiology of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(1), 8-13.
- Delvigne, A., ve Rozenberg, S. (2002). Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): A review. *Human Reproduction Update*, 8(5), 59-77.
- Elchalal, U., ve Schenker, J. G. (1997). The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome--views and ideas. *Human Reproduction*, 12(6), 1129–1137.
- Engin-Ustun, Y., Yılmaz, S., Timur, H., Ustun, Y., Moraloglu, O., Debeer, R., ve Yılmaz, N. (2013). Comparison of bevacizumab and cabergoline in the treatment of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Gynecological Endocrinology*, 29(9), 851–854.

- Erlik, Y., Friedman, M., Ben-David, E., ve Paldi, E. (1979). Histamine levels in ovarian hyperstimulation syndrome. *Obstetrics & Gynecology*, 53(5), 580-582.
- Eugster, A., ve Vingerhoets, A. J. J. M. (1999). Psychological aspects of in vitro fertilization: A review. *Social Science & Medicine*, 48(5), 575-589. [https://doi.org/10.1016/S0277-9536\(98\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0277-9536(98)00450-5).
- Faller, A., ve Shuenke, M. (2004). *The human body: An introduction to structure and fuction*. Stuttgart: Thieme.
- Fang, L., Yan, Y., Wang, S., Guo, Y., Li, Y., Jia, Q., Han, W., Liu, B., Cheng, J., ve Sun, Y. (2021). High ovarian gdf-8 levels contribute to elevated estradiol production in ovarian hyperstimulation syndrome by stimulating aromatase expression. *International Journal of Biological Sciences*, 17(9), 2338-2347. <https://doi.org/10.7150/ijbs.60332>
- Farquhar, C., ve Marjoribanks, J. (2018). Assisted reproductive technology: An overview of Cochrane Reviews. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 8(8), CD010537. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010537.pub5>.
- Fiedler, K., ve Ezcurra, D. (2012). Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (ohss): the need for individualized not standardized treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-32>
- Form, D. M., ve Auerbach, R. (1983). PGE2 and angiogenesis. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 172, 214–218.
- Fulton, A. M. (1984). In vivo effects of indomethacin on the growth of murine mammary tumors. *Cancer Research*, 44(6), 2416–2420.
- Gately, S. (2000). The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Review*, 19, 19–27.
- Ghlichloo, I., ve Gerriets, V. (2020). *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Gilfillan, A. M., ve Beaven, M. A. (2011). Regulation of mast cell responses in health and disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 31(6), 475-530.

- Gomez, R., Soares, S. R., Busso, C., Garcia-Velasco, J. A., Simon, C., ve Pellicer, A. (2010). Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(6), 448–457.
- Gordon, J., ve Galli, S. J. (1991). Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (tnf-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the fc epsilon ri. a mechanism for the sustained action of mast cell-derived tnf-alpha during ige-dependent biological responses.. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(1), 103-107. <https://doi.org/10.1084/jem.174.1.103>
- Gunnala, V., Melnick, A., Irani, M., Reichman, D., Schattman, G., Davis, O., ve Rosenwaks, Z. (2017). Sliding scale HCG trigger yields equivalent pregnancy outcomes and reduces ovarian hyperstimulation syndrome: analysis of 10,427 IVF-ICSI cycles. *PLoS One*, 12(4), e0176019.
- Güçyetmez, B., ve Çimet Ayyıldız, A. (2013). Bir tedavi yaklaşımının istenmeyen komplikasyonu: Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS). *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi*, 11, 47-53.
- Harada, S., Nagy, J. A., Sullivan, K. A., Thomas, K. A., Endo, N., Rodan, G. A., ve Rodan, S. B. (1994). Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 93(6), 2490–2496.
- Hart, R. J. (2016). Physiological aspects of female fertility: Role of the environment, modern lifestyle, and genetics. *Physiological Reviews*, 96(3), 873–909.
- He, S. H., ve Xie, H. (2004). Modulation of tryptase secretion from human colon mast cells by histamine. *World Journal of Gastroenterology*, 10(3), 323.
- Hebel, R., ve Stromberg, M. W. (1976). *Anatomy of the laboratory rat*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Helleberg, L. (1981). Clinical pharmacokinetics of indomethacin. *Clinical Pharmacokinetics*, 6(4), 245–258.
- Humaidan, P., Quartarolo, J., ve Papanikolaou, E. G. (2010). Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: Guidance for the clinician. *Fertility and Sterility*, 94(2), 389–400.

- Inhorn, M. C., ve Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies, and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411–426.
- Ishikawa, K., Ohba, T., Tanaka, N., Iqbal, M., Okamura, Y., ve Okamura, H. (2003). Organ-specific production control of vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome-model rats. *Endocrine Journal*, 50(5), 515–525.
- Junqueira, L. C., ve Carneiro, J. (2009). *Temel histoloji* (Çev. Eds. Y. Aytekin ve S. Solakoğlu). Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Katz, Z., Lancet, M., Borenstein, R., ve Chemke, J. (1984). Absence of teratogenicity of indomethacin in ovarian hyperstimulation syndrome. *International Journal of Fertility*, 29(3), 186-188.
- Kendall, R. L., Wang, G., ve Thomas, K. A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor flt-1 and its heterodimerization with KDR. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 226(2), 324–328.
- Knox, G. E. (1974). Antihistamine blockade of the ovarian hyperstimulation syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 118(7), 992–994.
- Krishna, A., Beesley, K., ve Terranova, P. F. (1989). Histamine, mast cells, and ovarian function. *The Journal of Endocrinology*, 120(3), 363–371.
- Lainas, G. T., Kolibianakis, E. M., Sfontouris, I. A., Zorzovilis, I. Z., Petsas, G. K., Tarlatzi, T. B., ve Tarlatzis, B. C. (2012). Outpatient management of severe early OHSS by administration of GnRH antagonist in the luteal phase: An observational cohort study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(69), 1-11.
- Lawrenz, B., Bixio, L. D., Coughlan, C., Andersen, C. Y., Melado, L., Kalra, B., Savjani, G., Fatemi, H. M., ve Kumar, A. (2020). Inhibin a—a promising predictive parameter for determination of final oocyte maturation in ovarian stimulation for ivf/icsi. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00307>
- Levin, E. R., Rosen, G. F., Cassidenti, D. L., Yee, B., Meldrum, D., Wisot, A., ve Pedram, A. (1998). Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 102(11), 1978–1985.

- Li, L., Yuan, X., Hunt, S., Chen, G., Si, L., ve Li, X. (2023). Determinants of severe late ovarian hyperstimulation syndrome in fresh embryo transfer cycles based on integration of decision tree classification and conditional logistic regression. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 50(2). <https://doi.org/10.31083/j.ceog5002036>.
- Lindenbaum, E. S., Sela, P. B., Itzkovitz, J., Beach, D., ve Brandeis, J. (1980). Ovarian hyperstimulation in rats. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 11(1), 57-67.
- Loe, S. M., Sanchez-Ramos, L., ve Kaunitz, A. M. (2005). Assessing the neonatal safety of indomethacin tocolysis: A systematic review with meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*, 106(1), 173–179.
- Mamuna, N., ve Mehnaz, K. (2017). Classification, causes, diagnosis, and treatment of male infertility: A review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 17(2), 89–109.
- Manno, M., Tomei, F., Marchesan, E., ve Adamo, V. (2005). Cabergoline: a safe, easy, cheap, and effective drug for prevention/treatment of ovarian hyperstimulation syndrome? *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 122(1), 127–128.
- Maruyama, K., Goto, K., Hiramoto, K., Tanaka, S., ve Ooi, K. (2022). Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, induces skin dryness via PPAR γ in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 45(1), 77-85.9.
- Mathur, R. S., Akande, V. A., Keay, S. D., Hunt, L. P., ve Jenkins, J. M. (2000). Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 73(1), 901–907.
- Maynard, R. L., ve Downes, N. (2019). *Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research*. London: Elsevier Inc.
- Nalamachu, S., ve Wortmann, R. (2014). Role of indomethacin in acute pain and inflammation management: A review of the literature. *Postgraduate Medicine*, 126(4), 92–97.

- Namavar Jahromi, B., Parsanezhad, M. E., Shomali, Z., Bakhshai, P., Alborzi, M., Moin Vaziri, N., ve Anvar, Z. (2018). Ovarian hyperstimulation syndrome: A narrative review of its pathophysiology, risk factors, prevention, classification, and management. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 43(3), 248–260.
- Nardelli, A. A., Stafinski, T., Motan, T., Klein, K., ve Menon, D. (2014). Assisted reproductive technologies (ARTs): Evaluation of evidence to support public policy development. *Reproductive Health*, 11(1), 1-14.
- Naredi, N., Talwar, P., ve Sandeep, K. (2014). VEGF antagonist for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: Current status. *Medical Journal of Armed Forces India*, 70, 58-63.
- Naz, M., ve Kamal, M. (2017). Classification, causes, diagnosis, and treatment of male infertility: A review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 17(2), 89–109.
- Ocal, P., Sahmay, S., Cetin, M., Irez, T., Guralp, O., ve Cepni, I. (2011). Serum anti-mullerian hormone and antral follicle count as predictive markers of OHSS in ART cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(1), 197-203.
- Okayama, T., Yoshida, N., Uchiyama, K., Takagi, T., & Yoshikawa, T. (2009). Mast cells are involved in the pathogenesis of indomethacin-induced rat enteritis. *Journal of Gastroenterology*, 44(S19), 35-39. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2267-5>
- Oyler, D. R., Parli, S. E., Bernard, A. C., Chang, P. K., Procter, L. D., ve Harned, M. E. (2015). Nonopioid management of acute pain associated with trauma: Focus on pharmacologic options. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 79(3), 475-83.
- Ozawa, Y., Murakami, T., Tamura, M., Terada, Y., Yaegashi, N., ve Okamura, K. A. (2006). A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis xenografts via antiangiogenic activity in severe combined immunodeficiency mice. *Fertility and Sterility*, 86(4), 1146–1151.
- Pai, R., Szabo, I. L., Soreghan, B. A., Atay, S., Kawanaka, H., ve Tarnawski, A. S. (2001). PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 923–928.

- Pakneshan, P., Birsner, A. E., Adini, I., Becker, C. M., ve D'Amato, R. J. (2008). Differential suppression of vascular permeability and corneal angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(9), 3909-3913.
- Pala, S., Atilgan, R., Özkan, Z. S., Kavak, S. B., İlhan, N., Akpolat, N., ve Sapmaz, E. (2015). Effect of varying doses of tamoxifen on ovarian histopathology, serum VEGF, and endothelin 1 levels in ovarian hyperstimulation syndrome: An experimental study. *Drug Design Development and Therapy*, 9, 1761-1766.10.
- Palomba, S., Costanzi, F., Nelson, S. M., Caserta, D., ve Humaidan, P. (2023). Interventions to prevent or reduce the incidence and severity of ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic umbrella review of the best clinical evidence. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1), 67.
- Papanikolaou, E. G., Pozzobon, C., Kolibianakis, E. M., Camus, M., Tournaye, H., Fatemi, H. M., Steirteghem, A. V., ve Devroey, P. (2006). Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, 85(1), 12–20.
- Pascuali, N., Scotti, L., Oubiña, G., de Zúñiga, I., Gomez Peña, M., Pomilio, C., Saravia, F., Tesone, M., Abramovich, D ve Parborell, F. (2020). Platelet-derived growth factor B restores vascular barrier integrity and diminishes permeability in ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular Human Reproduction*, 26(8), 585-600.
- Pau, E., Alonso-Muriel, I., Gómez, R., Novella, E., Ruiz, A., García-Velasco, J. A., Simon, C., ve Pellicer, A. (2006). Plasma levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 may determine the onset of early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction*, 21(6), 1453–1460.
- Pelinck, M. J., Hoek, A., Simons, A. H. M., ve Heineman, M. J. (2002). Efficacy of natural cycle IVF: A review of the literature. *Human Reproduction Update*, 8(2), 129–139. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.2.129>

- Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohi, J., ve Simon, C. (1999). The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: In vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertility and Sterility*, 71(3), 482-489. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00506-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00506-5).
- Phillips, W. J., ve Currier, B. L. (2004). Analgesic pharmacology: II. Specific analgesics. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 12(4), 221-233.
- Polishuk, W. Z., ve Schenker, J. G. (1969). Ovarian overstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 20(3), 443-450.
- Pride, S. M., Yuen, B. H., Moon, Y. S., ve Leung, P. C. (1986). Relationship of gonadotropin-releasing hormone, danazol, and prostaglandin blockade to ovarian enlargement and ascites formation of the ovarian hyperstimulation syndrome in the rabbit. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 154(5), 1155–1160.
- Quintana, R., Kopcow, L., Marconi, G., Young, E., Yovanovich, C., ve Paz, D. A. (2008). Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1511–1516.
- Rizk, B. (2009). Genetics of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(1), 14-27.
- Roberts, W. G., ve Palade, G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, 108(6), 2369–2379.
- Rodewald, M., Herr, D., Duncan, W. C., Fraser, H. M., Hack, G., Konrad, R., Gagsteiger, F., Kreienberg, R., ve Wulff, C. (2009). Molecular mechanisms of ovarian hyperstimulation syndrome: Paracrine reduction of endothelial claudin 5 by hCG in vitro is associated with increased endothelial permeability. *Human Reproduction*, 24(5), 1191–1199.
- Roeckl, W., Hecht, D., Sztajer, H., Waltenberger, J., Yayon, A., ve Weich, H. A. (1998). Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptor 1 and 2. *Experimental Cell Research*, 241(1), 161-170.

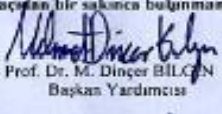
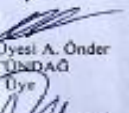
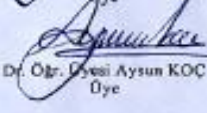
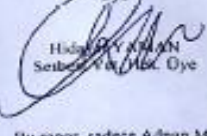
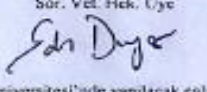
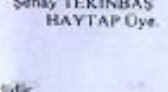
- Rollene, N. L., Amols, M. H., Hudson, S. B., ve Coddington, C. C. (2009). Treatment of ovarian hyperstimulation syndrome using a dopamine agonist and gonadotropin releasing hormone antagonist: A case series. *Fertility and Sterility*, 92(3), 1169.e15-1169.e17.
- Ross, M. H., ve Pawlina, W. (2006). *Histoloji: Konu anlatımı ve atlas* (Çev. Ed. B. Baykal). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Rowett, H.G.Q. (1952). *Dissection guides: III The rat (With notes on the mouse)*. New York: John Murray.
- Schenker, J. G., ve Polishuk, W. Z. (1976). The role of prostaglandins in ovarian hyperstimulation syndrome. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 6(2), 47–52.
- Scotti, L., Abramovich, D., Pascuali, N., Irusta, G., Meresman, G., Tesone, M., ve Parborell, F. (2014). Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 392–401.
- Scotti, L., Irusta, G., Abramovich, D., Tesone, M., ve Parborell, F. (2011). Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist affects corpus luteum vascular stability and development and induces luteal apoptosis in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, 335(2), 116-125.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., ve Schuh, A. C. (1995). Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62–66.
- Shekelle, P. G., Newberry, S. J., FitzGerald, J. D., Motala, A., O'Hanlon, C. E., Tariq, A., Okunogbe, A., Han, D., ve Shanman, R. (2017). Management of Gout: A systematic review in support of an American College of Physicians Clinical Practice Guideline. *Annals of Internal Medicine*, 166(1), 37-51.
- Shibuya, M. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: A crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes & Cancer*, 2(12), 1097–1105.

- Soave, I., ve Marci, R. (2014). Ovarian stimulation in patients in risk of OHSS. *Minerva Ginecologica*, 66(1), 65-78.
- Sun, B., Ma, Y., Li, L., Hu, L., Wang, F., Zhang, Y., Dai, S., ve Sun, Y. (2021). Factors associated with ovarian hyperstimulation syndrome (ohss) severity in women with polycystic ovary syndrome undergoing ivf/icsi. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.615957>
- Takahashi, N., Harada, M., Hirota, Y., Zhao, L., Yoshino, O., Urata, Y., Izumi, G., Takamura, M., Hirata, T., Koga, K., Wada-Hiraike, O., Fujii, T., ve Osuga, Y. (2016). A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 428, 161-169.
- Tarnawski, A. S., ve Jones, M. K. (2003). Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: Molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Molecular Medicine*, 81(10), 627–636.
- Tong, X. M., Zhang, S. Y., Song, T., Xu, W. H., Lin, X. N., Shu, J., ve Liu, L. (2008). Effects of gonadotropin-releasing hormone antagonists on the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Chinese Medical Journal*, 121(23), 2434–2439.
- Tummon, I., Gavrilova-Jordan, L., Allemand, M.C., ve Session, D. (2005). Polycystic ovaries and ovarian hyperstimulation syndrome: A systematic review. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 84(6), 11-16.
- Ujioka, T., Matsuura, K., Kawano, T., ve Okamura, H. (1997). Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats. *Human Reproduction*, 12(8), 1629–1634.
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, 213(25), 232-235.
- Wang, C., Li, J., Ye, S., Zhang, Y., Li, P., ve Wang, T. (2018). Oestrogen inhibits vegf expression and angiogenesis in triple-negative breast cancer by activating gper-1. *Journal of Cancer*, 9(20), 3802-3811. <https://doi.org/10.7150/jca.29233>
- Whelan, J. G., ve Vlahos, N. F. (2000). The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 73(8), 83–96.

- Woodruff, T. K., D'Agostino, J., Schwartz, N. B., ve Mayo, K. E. (1988). Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science*, 239(4845), 1296-1299.
- Yokoyama, S., Hiramoto, K., Koyama, M., ve Ooi, K. (2014). Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Experimental Dermatology*, 23(9), 659-663. <https://doi.org/10.1111/exd.12499>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., ve Vanderpoel, S. (2009). International committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520–1524.
- Zhao, Z. Z., Nyholt, D. R., Thomas, S., Treloar, S. A., ve Mongomer, G. W. (2008). Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 14, 531–538.
- Zhuo, Y., Li, X., Zheng, Q., Fan, X., Ma, W., Chen, J., Zhao, X., Liu, X., Tang, F., Cheng, K. ve Feng, W. (2018). Estrogen enhances tumor growth and angiogenesis indirectly via mediation of bone marrow-derived cells as well as directly through stimulation of tumor and endothelial cells. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6631>
- Ziv-Gal, A., ve Flaws, J. A. (2016). Evidence for bisphenol A-induced female infertility: A review (2007–2016). *Fertility and Sterility*, 106(4), 827-856.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı

	T.C. AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (AYDIN ADÜ-HADYEK)	
Aydın, 18/08/2022		
Oturum	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2022 Yılı VI. Oturum	
Sayı	: 64583101/2022/62	
Proje Başlığı	: Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) Oluşturulan Sıçanlarda, Indometazin'in Ovaryum Üzerindeki Yapısal, Biyokimyasal ve Moleküler Düzeydeki Etkileri	
Proje Yürütücüsü	: Alpistan GÖKÇİMEN	
Proje Ekibi	: Esra GÖKMEN YILMAZ	
Hayvan Çalışması	Bu çalışmanın hiçbir bölümünde: - İnsan embriyosu ve fıtusu kullanılması - İnsan embriyosu ve fıtusu dokularının kullanılması - Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması İnsanlarda araştırma - İnsan olmayan primatların kullanılması - Transgenik hayvanların kullanılması - Hayvanlarda genetik modifikasyon öğretilmemiştir.	
Bu çalışmanın yapılmasında etik açısından bir sakınca bulunmamaktadır.		
 Prof. Dr. Mehmet SARTERLER Başkan	 Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Hüman DÜST Üye
(Yıllık İzni) Prof. Dr. İşıl SÖNMEZ Üye	 Prof. Dr. Serkan BAKIRCI Üye	(Yıllık İzni) Dr. Öğr. Üyesi Solmaz KARAARSLAN Üye
 Dr. Öğr. Üyesi A. Önder USTÜNDAG Üye	 Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ Üye	 Öğr. Gör. Dr. Saude Gülce GÜLER ORVAŞIN Sor. Vet. Hek. Üye
 Hidayet YILMAZ Sevda YILMAZ Üye	 Arş. Gör. Eda Duygu İPEK Sor. Vet. Hek. Üye	 Senay TEKİNBAS HAYTAP Üye.
Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.		

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) Oluşturulan Sıçanlarda, İndometazin’in Ovaryum Üzerindeki Yapısal, Biyokimyasal ve Moleküler Düzeydeki Etkileri.” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu araştırmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Esra GÖKMEN YILMAZ

05 / 12 / 2024

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra GÖKMEN YILMAZ
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Burhaniye / 16.11.1989
E-mail : egokmen@ymail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2024
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2016
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2011

BURSLAR ve ÖDÜLLER

Sözlü Bildiri İkincilik Ödülü 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 2017.

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013- Halen	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

- Orak, C., Şirinyıldız, F., Yılmaz, E. G., Cesur, G., & Ek, R. O. (2021). Protective effects of Ficus carica seed oil on ischemia and reperfusion injury in a rat model of acute mesenteric ischemia. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery/Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*, 27(4), 402-409.
- Ağdaş, F., Eryılmaz, A., Yılmaz, E. G., & Ergin, K. (2020). The effects of Sulindac on cell viability, cell cycle and angiogenesis in pharyngeal cancer cells. *ENT Updates*, 10(3), 373-380.
- Çakmak, H., Gökmen, E., Bozkurt, G., Kocatürk, T., & Ergin, K. (2017). Effects of sunitinib and bevacizumab on VEGF and miRNA levels on corneal neovascularization. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 37(2), 191–195. <https://doi.org/10.1080/15569527.2017.1375943>
- Ergin, K., Erdoğan, A. M., Gökmen, E., Armağan, G. D., Olgun, H. N., Aktaş, S. G., & Ozpolat, B. (2016). Investigation of the cell death in pancreatic cancer after silencing of elongation factor 2 alpha by siRNA. *Human Gene Therapy*, Vol: 27, No: 11, A129-A129.
- Ergin, K., Gökmen, E. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress and Pancreatic Cancer. *Meandros Medical And Dental Journal*, 16(1), 20–24.
- Gökmen, E., & Ergin, K. (2015) DNA Methyltransferase Expression and Proliferation Status of Metastatic Breast Cancer Cell Line After Prolonged and Repeated Rapamycin and Melatonin Application. *Meandros Medical And Dental Journal*, 16(2) 50–58.

2. PROJELER

- Pankreas kanserinde elongasyon inisiyasyon faktör 2 alfa eIF2a'nın siRNA small interfering RNA ile susturulması in vitro ve in vivo sonrasında hücre ölümünün araştırılması, TÜBİTAK, 15.12.2014
- Korneal Neovaskülarizasyonda Mikro-RNA'ların rolü ve VEGF ile ilişkisi Yükseköğretim Kurumları Tarafından Desteklenen Bilimsel Araştırma Projesi, 20.04.2017

Farklı Bakteriyosin Seviyelerinin Etlik Piliçlerde Büyüme Performansı, Besin Madde Sindirimi ile İnce Bağırsak Histomorfolojisi ve Sekal Mikroflora Üzerine Etkileri Yükseköğretim Kurumları Tarafından Desteklenen Bilimsel Araştırma Projesi, 10.03.2017

Diyabetik Gebe Farelerin Plasentalarında ve Fetuslarında Endoplazmik Retikulum Stres Belirteçlerinin Araştırılması, 25.11.2015

Embriyonik kök hücrelerde TGF-beta sonrası miR-290 ile epitelyal-mezenkimal geçiş arası ilişkinin saptanması, 18.06.2015

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Şirinyıldız, F., Ek, R. O., Orak, C., Taşlı Yeşilçayır, G., Ergin, K., Gökmen, E., Köseoğlu, S., ve Cesur, G. (2017). Deneysel böbrek iskemi reperfüzyon hasarında omega 3 yağ asitlerinin olası koruyucu etkilerinin araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No: 3552618)

Orak, C., Ek, R. O., Şirinyıldız, F., Taşlı Yeşilçayır, G., Ergin, K., Gökmen, E., Çelikten, S., ve Cesur, G. (2017). TNBS ile indüklenmiş deneysel kolit modelinde tokoferol ve dexpanthenol'un olası koruyucu etkilerinin ayrı ayrı ve birlikte araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No: 3552624)

Ergin K., Erdoğan, M. A., Gökmen Yılmaz, E., Armağan Durmaz, G., Olgun, H. N., Aktaş, S., Şehne, M., Süzek, T., & Özpolat, B. (2016). Investigation of the Cell Death in Pancreatic Cancer After Silencing of Elongation Factor 2 Alpha by siRNA. Changing The Face of Modern Medicine: Stem Cell And Gene Therapy Congress (/Poster) (Yayın No: 6498525)

Dündar, S., Çakmak, H., Ergin, K., Bozkurt, G., Gökmen Yılmaz, E., Kocatürk, T., & Saatci, A. O. (2016). Effects of Sunitinib and Bevacuzimab on VEGFR-2 VGF-A and miRNA Levels on Experimentally Induced Corneal Neovascularization. American Academy of Ophthalmology (/Poster) (Yayın No: 6498556)

Gökmen, E., & Ergin, K. (2014). Expression of DNA Methyltransferase and Proliferation markers in Estrogen Receptor Negative Breast Cancer Cells with prolonged Rapamycin and Melatonin Treatment. I. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 1668216)

B) Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Ağdaş, F., Eryılmaz, A., Ergin, K., ve Gökmen Yılmaz, E. (2017). Sulindak'ın Farinks ve Larinks Kanseri Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Siklusu Üzerindeki Etkileri. 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No: 6498464)

Çakmak, H., Ergin, K., Bozkurt, G., Gökmen, E., ve Kocatürk, T. (2015). Korneal Neovaskülarizasyonda Sunitinib ve Bevacuzimab ın VEGFR 2 VEGF A ve miRNA Düzeylerinde Etkileri. Türk Oftalmoloji Derneği 49. Ulusal Kongresi (Tam Metin Bildiri/Poster) (Yayın No: 2480903)