

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**ORAL KONTRASEPTİF KULLANIMININ RAT OVER
FOLİKÜL RESERVİ VE OVER YÜZEY EPİTELİ DİSPLASTİK
DEĞİŞİKLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Melike BAŞPINAR**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ekrem SAPMAZ**

**ELAĞIĞ
2014**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. M. ŞİMŞEK

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. M. ŞİMŞEK

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim, hoşgörüsünü esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. E. SAPMAZ 'a, anabilim dalı başkanımız sayın Doç. Dr. M. ŞİMŞEK'e ve anabilim dalı öğretim üyelerimiz Y. Doç. Dr. B. Kavak, Y. Doç. Dr. R. ATILGAN, Y. Doç. Dr. S. Özkan, Y. Doç. Dr. A.Akyol'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen Prof Dr. N. İLHAN'a, Y. Doç. Dr. E. ÖNALAN'a, Y. Doç. Dr. T. KULOĞLU'na ve Veysel Çak ile birlikte tüm FÜDAM çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm araştırma görevlisi, hemşire ve personel arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan beni maddi ve manevi olarak hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme
Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bu çalışma, oral kontraseptif ilaç kullanımının rat over rezervi ve yüzey epiteli üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yapıldı.

Çalışma, 35 adet düzenli siklusa sahip, 190–220 gr ağırlığında, 4 aylık, erişkin dişi Wistar Albino cinsi rat, estrus fazında rastgele, prospektif, tek kör olarak 5 gruba ayrıldı. Plasebo tablet ve oral kontraseptif ilaçlar gastrik lavaj yoluyla 3 ay verildi. Grup 1: Kontrol grubu, plasebo tablet, grup 2: Etinil östradiol (EÖ) 1,5mcg/gün+ Drospirenon 150mcg/gün (Yasmin®), Grup 3: EÖ 1,5mcg/gün+ Siproteron asetat 100mcg/gün (diane 35®), Grup 4: EÖ 1,5mcg/gün+ gestoden 3,75mcg/gün (Ginera®), Grup 5: EÖ 1,5mcg/gün+levonorgestrel 7,5mcg/gün (Microgynon®) verildi. 3 ay sonra bilateral ooforektomi yapıldı. Sağ over, over folikül havuzunun (Primordial, primer, sekonder, tersiyer folikül, fibrozis, corpus luteum(KL), KL içi angiogenezis) ve yüzey epitel değişikliğinin (germinal epitelde bozulma) histolojik olarak incelenmesi için ve sol over ise yüzey epitel değişikliklerinin (mir-21 mir-494, mir-191, mir 145) genetik olarak incelenmesi için kullanıldı. İntrakardiak alınan kan örneğinden antimüllerian hormon (AMH) bakıldı. İstatistiksel analiz için Kruskal Wallis Varyans analizi yapıldı $p<0,05$ olan değerler için rezerv testlerinde Bonferroni düzeltmeli Man Whitney U testi, miRNA sonuçlarında t testi yapıldı. $p<0,01$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

Ginera ve Microgynon kontrol grubuna göre over folikül havuzunu anlamlı olarak azalttı. Diane 35’de over folikül havuzu kontrolle benzerken, AMH seviyesi azalmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Yasmin grubunda ise her ikisi de kontrolle benzerdi. Germinal epitel bozukluğu ve miRNA düzeyleri tüm gruplarda anlamlı olarak artmış bulundu. ($p<0.01$, MWU).

Androjenik oral kontraseptiflerin over folikül havuzunu ve rezerv testlerini olumsuz yönde etkilediği ve oral kontraseptif kullanımının germinal epitelde bozulmayı ve mir 145’i artırarak kanser gelişimi önleyici etki yaparken, mir- 21, mir- 191, mir-494’ü artırarak kanser gelişimini uyardığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: AMH, MiRNA, KOK, Over rezervi,

ABSTRACT

The Effect of Oral Contraseptive Usage on Rat Ovarian Follicule Reserve and Ovarian Surface Epitelium

Thirty five female, 4 month old Winstar Albino rats weighing between 190-220 grams were divided randomly prospective, single-blind into 5 groups. Plasebo pills and oral contraseptives were given through gastric lavage for three months as follows Group 1: control group, placebo pills; group 2: Ethynil estradiol (EE) 1,5mcg/day+ Drospirenon 150mcg/day (Yasmin®), Group 3: EE 1,5mcg/gün+ Siproteron asetat 100mcg/day (diane 35®), Group 4: EE 1,5mcg/gün+ gestoden 3,75mcg/day (Ginera®), Group 5: EE 1,5mcg/day+levonorgestrel 7,5mcg/gün (Microgynon®). Three months later bilateral oophorectomy was done. The right ovary was used to examine the ovarian follicule pool (primordial, primery, secondary, tertiary follicule, fibrosis, corpus luteum (CL), angiogenesis in CL) and surface epitelium change (the dejeneration of germinal epitelium) histologically. The left ovaru was usedto examine the surface epitelium change (mir-21 mir-494, mir-191, mir 145) genetically. AMH was measured through intracardiac taken blood sample. Kruskal Wallis variance analyze used to get statistical analysis. $p < 0,05$ values Man Witney U test was done with Bonferroni correction in reserve tests and t test was done in miRNA results. P value $< 0,01$ was considered statistically significant.

Ginera and Microgynon was reduced the ovarian follicule poolwhen compared with the control group while Diane 35 ovary follicule pool were similar with the control group, level of AMH reduced but there was no statistical differece. Yasmin group both were similar with control group. Degeneration of germinal epitelium and miRNA levels were found to be increased in all groups($p < 0,01$ MWU)

The study showed that androgenic oral contraseptives influenced the ovarian follicule pooland the reserve tests in a negative way. Oral contraseptives caused preventing cancer development by degenertion germinal epitelium and increasing mir-145 but stimulating by increasing mir-21, mir-494, mir-191.

Key Words: AMH, MiRNA, COC, Ovarian Reserve, Rat

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Oral Kontraseptifler	2
1.1.1.1. Tarihçe	2
1.1.1.2. Farmakoloji	3
1.1.1.3. Epidemiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Sınıflamalar	4
1.1.1.4. Etkinlik	5
1.1.1.5. Etki Mekanizması	5
1.1.1.6. Kontraendikasyonları	5
1.1.1.7. YanEtkileri	6
1.1.1.8 Kontraseptif Dışı Etkiler	6
1.1.1.9. Kanser Üzerine Etkisi	6
1.1.2. miRNA	7
1.1.3. Ovaryan Foliküller	7
1.1.3.1. Primordiyal Folikül	7
1.1.3.2 Preantral (Primer) Folikül	9
1.1.3.3 Antral Folikül	10
1.1.3.4 Preovulatuvar (Tersiyer) Folikül	10
1.1.3.5 Ovulasyon	11
1.1.3.6 Korpus Luteum	13
1.1.4. Ovaryan Rezerv Testleri	14
1.1.4.1.Bazal Serum FSH	14

1.1.4.2. FSH/LH Oranı	14
1.1.4.3 Bazal Serum E2	14
1.1.4.4 İnhibin-B	15
1.1.4.5 CCCT	15
1.1.4.6. GAST	15
1.1.4.7.EFORT	15
1.1.4.8. Antral Folikül Sayısı	15
1.1.4.9. Over Volumu	16
1.1.4.10. Over Biyopsisi	16
1.1.4.11. AMH	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı	20
2.2. Deneyin Yapılışı	20
2.2.3. Işık Mikroskopik Doku Hazırlanması	20
2.2.4. miRNA İzolasyonu	21
2.2.4.1.Kullanılan Aletler	21
2.2.4.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
2.2.4.3 Total RNA İzolasyonu	22
2.2.4.3.1 Kullanılan Çözeltiler	22
2.2.4.3.2. Deneyin Yapılışı	22
2.2.4.3.3. Spektrofotometrik RNA Ölçümü	23
2.2.4.4. Komplementer DNA Sentezi	23
2.2.4.4.1Kullanılan Çözeltiler	23
2.2.4.4.2. Deneyin Yapılışı	24
2.2.4.4.3 Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA	
Amplifikasyonu	24
2.2.5 Biyokimyasal Analiz Yöntemleri	26
2.2.6. İstatistik Değerlendirme	26
3. BULGULAR	27
3.1AMH Bulguları	27
3.2 Işık Mikroskopi Bulguları	27
3.3 miRNA Bulguları	31

4. TARTIŞMA	33
5. KAYNAKLAR	41
6. ÖZGEÇMİŞ.....	54

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Doğal ve sentetik progestinlerin biyolojik özellikleri	4
Tablo 2. cDNA karışım miktarı	24
Tablo 3. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	24
Tablo 4. RT-PZR' da kullanılan primerler	25
Tablo 5. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	25
Tablo 6. Uygulanan RT-PZR programı	26
Tablo 7. Deneyin bitiminde, sıçanlardan intrakardiyak alınan kan örneklerindeki serum AMH düzeyleri	27
Tablo 8. Ratların overinde ışık mikroskopu ile sayılan gelişen foliküller, corpus luteum ve toplam folikül rezervi	30
Tablo 9. Işık mikroskopide over yüzey epitelinde bozulma, fibrozis ve korpus luteum içi angiogenezde gerileme bulguları.	31
Tablo 10. Tüm grupların miRNA ekspresyonu kat artışı	32

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Erişkin insan overinde folikülogenez aşamaları	13
Şekil 2. Kontrol grubunun overinin ışık mikroskopik kesiti	28
Şekil 3. Ginera grubunun overinin ışık mikroskopik kesiti	28
Şekil 4. Microgynon grubunun overinin ışık mikroskopik kesiti	29
Şekil 5. Diane 35 grubunun overinin ışık mikroskopik kesiti	29
Şekil 6. Yasmin grubunun overinin ışık mikroskopik kesiti	30

KISALTMALAR LİSTESİ

AF	: Antral follikül
AFS	: Antral follikül sayısı
AMH	: Anti-mülleryan hormon
CC	: Klomifen sitrat
CCCT	: Klomifen sitrat challenge test
D3	: Adetin üçüncü günü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E₂	: Östradiol
EFORT	: Ekzojen FSH overyan rezerv test
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FSH	: Folliküler stimülan hormon
GAST	: GnRH agonist stimülasyon test
GCT	: Granüloza hücreli tümör
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
HFI	: Hormon free interval
İVF	: İn vitro fertilizasyon
KOH	: Kontrollü overyan hiperstimülasyon
KOK	: Kombine oral kontraseptif
KL	: Korpus luteum
LH	: Luteinizan hormon
miRNA	: Mikro RNA
OIM	: Oosit inhibitör faktör
OKS	: Oral kontraseptif
PCO	: Polikistik over
PF	: Primer folikül
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PZR	: Real time polimeraz zincir reaksiyonu
SF	: Sekonder folikül
TV USG	: Transvajinal ultrason

1. GİRİŞ

Kombine oral kontraseptifler (KOK) dünya genelinde en sık kullanılan hormonal kontrasepsiyon yöntemidir. KOK'ların kontraseptif etkilerinden en etkilişi hipotalamo hipofizer ovaryan aksın baskılanarak ovulasyonun önlenmesidir. Bununla beraber servikal mukus ve endometrium ve fallop tüpü üzerine sperm migrasyonunu ve implantasyonu engelleyici etkileri de mevcuttur (1). Kontraseptif etkilerinin yanında over kanserini önleyici etkileri bulunmaktadır. Ovulasyon hipotezine göre tekrarlayan ovulasyonun over yüzey epiteline yaptığı mikrotravma neticesinde over kanseri gelişmektedir. KOK, gebelik ve emzirme ile oluşan ovulasyon inhibisyonu over kanserinden korumaktadır. Bir diğer teori hormonal hipotezdir ki, KOK'lardaki progesteronun over yüzey epiteline p53 tumor supressor gen ekspresyonunu indükleyerek apoptozisi indüklediği ve hücre proliferasyonunu engelleyerek over kanseri gelişimini azalttığı hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (2). Memeli overinde embriyolojik gelişimden itibaren mevcut olan folikül havuzundaki oositlerin büyük bir kısmı da (%75-90) ovulasyondan önce programlanmış hücre ölümü ile elimine edilir (3).

Reproduktif dönemin akıbetini belirleyen en önemli faktör olan yaş arttıkça folikül havuzundaki oosit kapasitesi de azalmaktadır. Overdeki primordial foliküllerin havuzu veya over rezervi, kalan oosit kalitesi ve sayısı ile bağlantılı olarak bir kadının üreme potansiyelini tanımlar. Over rezervinin değerlendirilmesi bu nedenlerle büyük önem taşısa da, ultrasonografi (US) ile görüntülenemeyen ve metabolik aktiviteleri çok düşük olan primordial folikülleri sayısal olarak tanımlamak mümkün olmadığından, bugün klinikte kullanılan tüm belirteçler primordial folikül havuzu ile daha uzaktan alakalı olan antral foliküllerin (AF) görüntülenmesi veya metabolik aktivitelerinin değerlendirilmesi esasına dayanır. Over rezervini değerlendirmek amacıyla klinik kullanım alanı bulan belirteçler ,Serum follicle stimulating hormone (FSH), oestradiol (E2),anti-Müllerian hormone (AMH) ve inhibin-B ölçümü, Ultrason ile antral folikül (AFS), ovarian vaskülarite ve ovarian volum ölçümü, ayrıca klomifen sitrat challenge test (CCCT), eksojen FSH ovarian rezerv testi (EFORT), and GnRH-agonist stimülasyon testi (GAST) gibi provokatif testleri içermektedir (4). Ancak KOK ile indüklenen hipofiz over

baskılanmasının antral folikül sayısı ve anti müllerien hormon seviyesi ile yansıtılan over rezerv fonksiyonlarına etkisi henüz açık değildir (5).

Bu çalışmanın amacı KOK ile indüklenmiş hipofiz over aks supresyonu yapılan ratlarda over folikül rezervini histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmeyi ve KOK'ların over yüzey epitelinde karsinogenez üzerine etkisini araştırmaktır.

1.1.Genel Bilgiler

1.1.1.Oral Kontraseptifler

1.1.1.1. Tarihçe

1900'lü yılların başında Avustralya'da Innsbruck Üniversitesi'nde fizyoloji profesörü olarak çalışan Ludwig Haberlandt ağızdan verilen ovaryan özütlerin doğurganlığı önlediğini bildirdi ve bu tecrübesini "hormonal kontrasepsiyon" olarak adlandırdı (6).

1920'lerde Haberlandt ve Viyanalı jinekolog Otfried Otto Fellner hayvanlara steroid özütler verilerek doğurganlığın baskılandığını raporladılar. 1931 yılında Haberlandt hormon replasmanı ile doğurganlığın baskılanabileceğinden bahsediyordu. Infecundin isimli bir ilaç bu amaçla hazırlanmıştı, ancak 1932'de Haberlandt'ın kalp krizinden erken ölümü nedeni ile kullanıma giremedi, böylece doğum kontrol haplarının kullanımı ertelendi (7).

1930'ların sonunda hayvan çalışmalarında yüksek doz progesteronların ovulasyonu inhibe edebildiği ispatlandı. Kimyager Dr. Carl Djerassi 1940'ların sonunda yabancı Meksika yerelması kökü ekstraktından progestin üretti. İlerleyen yıllarda Djerassi ve ekibi patenti alınan ilk oral progestasyonel ajan norethindrone'u sentezledi. Jinekolog olan Min-Chueh Chang, tavşanlara oral verilen norethindron ve norethinodrelin, ovulasyonu %100 inhibe ettiğini gösterdi. Gregory Pincus ve Chang, araştırmalarına bir jinekolog olan John Rock'un da desteğiyle, 1954 yılında ilk sentetik progesteronu elli hastada uyguladılar. Pincus ve Chang, araştırma sonuçlarını 1955 yılında Tokyo'da yapılan uluslararası bir toplantıda sundu. Daha sonra Pincus, Rock'ın desteğini de alarak oral kontraseptif (OKS)'lere Amerika Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay almak için girişimlere başladı. Sonunda Enovid (150 µg mestranol + 9,85 mg norethinodrel), 1957 yılında abortus ve menstrüasyon

bozukluklarının tedavisinde, 1960 yılında da kontraseptif olarak kullanılmak üzere onaylandı. (6-8)

1.1.1.2.Farmakoloji

Östradiol (E2) en potent ve overlerden sentezlene major doğal östrojendir (6). 17. karbona etinil grubu eklenmesiyle oral aktivitesi artırılmıştır. Etil östradiol (EÖ) KOK' larda en sık kullanılan potent oral östrojen formudur. Onun 3-metil esteri olan mestranol'un EÖ'den zayıf etkisinin olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir . Östadiol valerate östradiolun esterlenmiş formudur ve oral alımdan sonra hızlıca östradiole dönüşür (6).

Doğal progesterondan farklı olarak sentetik progesteronlar oral olarak hızlı emilir. Karaciğerde metabolize olarak idrar ile atılır. Büyük bir kısmı KOK'lar için üretilmiş ajanlardır.

Yeni progestinlerden norgestimate, desogestrel, dienogest diğer 19 norprogestinlerden daha selektiftir ve ovulasyon inhibe edici dozlarda neredeyse hiç androjenik etki barındırmamaktadırlar (9). Gestodene, levonorgestrel türevi olup, en potent progesterondur.

Yeni bir progestin türevi olan Drospirenon, diüretik Spironolakton türevi olup, progesteron, mineralokortikoid ve androjen reseptörlerine yüksek afinite gösterir. Progesteron agonisti gibi davranır, fakat mineralokortikoid ve androjen antagonistidir (10).

Hormonal kontraseptiflerde kullanılan ve doğal progestinlerin biyolojik etkileri tablo 1 'de gösterilmiştir (9,10).

Tablo 1: Doğal ve sentetik progestinlerin biyolojik özellikleri

Progestin	Proge stojen ik	Anti- gonadotrop ik	An drojenik	Anti- androjenik	Gluko kortikoid	Anti mineralokor tikoid
Progesterone	+	+	-	±	+	+
Dydrogesterone	+	-	-	±	-	±
Medrogestone	+	+	-	±	-	-
Chlormadinone acetate	+	+	-	+	+	-
Cyproterone acetate	+	+	-	+	+	-
Megestrol acetate	+	+	±	+	+	-
Medroxyproges terone-acetate	+	+	±	-	+	-
Nomegestrol acetate	+	+	-	±	-	-
Promegestone	+	+	-	-	-	-
Trimegestone	+	+	-	±	-	±
Drospirenone	+	+	-	+	-	+
Norethisterone	+	+	+	-	-	-
Lynestrenol	+	+	+	-	-	-
Norethinodrel	±	+	±	-	-	-
Levonorgestrel	+	+	+	-	-	-
Norgestimate	+	+	+	-	-	-
3-Keto- desogestrel	+	+	+	-	-	-
Gestoden	+	+	+	-	+	+

(+) etkili (±) zayıf etkili (-) etkisiz (9,10)

1.1.1.3. Epidemiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Sınıflamalar

- Düşük doz: 50 µg'dan az EÖ içeren ürünler.
- Birinci kuşak: 50 µg'dan fazla EÖ içeren ürünler.
- İkinci kuşak: LNG, norgestimat ve noretindron ailesine ait diğer üyelerden birini ve 20, 30 veya 35 µg EÖ içeren ürünler.

- Üçüncü kuşak: Desogestrel veya gestoden ile 20, 25 veya 30 µg EÖ içeren ürünler.
- Dördüncü kuşak: Drospirenon, dienogest veya nomegestrol asetat içeren ürünler.
- Monofazik: Bunlarda östrojen ve progestin miktarı sabittir. OKS'lerin çoğu monofaziktir. Günde bir hap alınarak 21 günlük kullanımdan sonra 7 gün ara verilir.
- Bifazik: Bunlarda östrojen dozu sabittir; progestin dozu ise ilk 10 günlük haplarda düşük, son 11 günlük haplarda yüksektir.
- Trifazik: Menstrüel döngüye benzer şekilde, değişen oranlarda östrojen ve progestin içermektedir(6).

1.1.1.4. Etkinlik

Düzenli ve eksiksiz kullananlarda, gebeliğin önlenmesinde % 99,9 oranında etkilidir (11). Etkinliğinde rol oynayan ana faktör hasta uyumudur ve yapılan bir çalışmaya göre her bir siklusta kadınların % 47' si 1 veya daha fazla, % 22' si ise 2 veya daha fazla hap alımını unutmuştur (12).

1.1.1.5.Etki mekanizması

Östrojen aracılığıyla gonadotropin sekresyonu baskılanır, böylece ovulasyon inhibe olur. Östrojen, progesteron reseptör konsantrasyonunu artırır, böylece progesteron dozu azaltılır. Progestinler, östrojen ile kombine edildiğinde LH üretimi ve salınımı ve böylece ovulasyon baskılar. Progestinler, endometriumda atrofiye neden olarak implantasyonu engellerler. Progestinler servikal mukusun viskozitesini arttırarak, sperm transportunu engellerler, fallop tüpünün sekresyonu ve peristaltizmi üzerine etkisiyle, ovum ve sperm transportunu engeller(13)

1.1.1.6.Kontraendikasyonları

OKS kullanımı için kesin kontrendikasyonlar aşağıda sıralanmıştır (8,13)

- Tromboflebit, tromboembolik bozukluklar (venöz tromboz açısından kalıtsal bir yatkınlığa işaret edecek, ebeveyn veya çocuklarda tromboembolik hastalık öyküsü)

- Serebrovasküler hastalık ve koroner arter hastalığı öyküsü veya bu sorunlara predispozisyon yaratacak durumlar
- Belirgin derecede karaciğer fonksiyon bozukluğu
- Bilinen veya şüphe edilen meme kanseri
- Tanı konulmamış anormal uterin kanama
- Bilinen veya şüphe edilen gebelik
- Otuz beş yaş üzerinde, günde 15 taneden fazla sigara içmek
- Şiddetli hiperkolesterolemi veya hipertrigliseridemi
- Laktasyon, postpartum < 6 hafta
- Hipertansiyon (Sistolik $\geq$ 160 mm Hg veya diastolik $\geq$ 100 mm Hg)
- Geçirilmiş veya aktif venöz tromboembolizm
- Komplike kalp kapak hastalığı (pulmoner hipertansiyon, atrial fibrilasyon,
- Subakut bakteriyel endokardit öyküsü
- Fokal nörolojik semptomları olan migren
- Retinopati, nefropati veya nöropati ile komplike diabet
- Dekompanse siroz
- Karaciğer tümörü (adenom veya hepatom)

1.1.1.7 Yan etkileri

Hastaların oral kontraseptif kullanımını bırakmalarına neden olan sık yan etkiler anormal menstrüel kanama, mide bulantısı, kilo alımı, psikolojik değişiklikler, göğüslerde duyarlılık, baş ağrısı'dır (12).

1.1.1.8.Kontraseptif dışı etkiler

OKS' ler doğum kontrol yöntemi olarak uygulanmasının dışında; siklus regülasyonu, menstrüel kan kaybında azalma için ve dismenore, ovulasyon ağrısı (mittelschmerz), endometriozis, akne ve hirsutizm, hipotalamik amenore, menstrüel porfiri ve premenstrüel sendrom endikasyonlarıyla kullanım alanı bulmaktadır (13).

1.1.1.9 Kanser Gelişimi Üzerine Etkisi

Hormonal OK'lerin neoplastik etkileri üzerinde geniş çalışmalar yapılmış ve son meta-analizler göstermiştir ki, KOK kullanımıyla, meme, serviks ve karaciğer

kanseri riskleri artmakta iken, endometrial ve ovarian kanser riskleri azalmaktadır (14). Ovarian ve endometrial kanser riskinin KOK ilişkili olarak azalmasına dair neden-sonuç ilişkisi kaynaklı oldukları düşünülen biyolojik mekanizmalar mevcuttur (15).

Oral kontraseptiflerin, karaciğerin benign adenomunun sebeplerinden biri olduğu öne sürülmektedir. Bu durum, OK kullanımı sonlandırıldığında genellikle gerilemektedir. Bu tümörler bazen ölümcül kanamalara sebep olabilmektedir (16).

1.1.2. MiRNAlar

MikroRNA(miRNA)'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir (17). DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak protein çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanan miRNA'lar, hedef genin mesajcı RNA (mRNA)'lara düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için gen ifade edilmesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir (18). Son yıllardaki çalışmalar, miRNA'larla ilgili işlev bozukluklarının başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın nedeni olduğunu belirlemiştir.(19). İnsan miRNA genlerinin yarısından fazlası fragil bölgeler, heterozigosite kaybının ve amplifikasyonunun minimal olduğu bölgeler veya yaygın kırık bölgeleri gibi, kanser gelişiminmiRNA'lar, hem onkogenik hem de tümörsüpresör özellikte olabilmektedirler. Bazı miRNA'lar protoonkogenlerin translasyonunu inhibe edebilmektedir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lar tümör süpresör miRNA'lar (TS-mir) olarak ifade edilmektedirde rol oynadığı bilinen bölgelerde lokalizedir (20). Bunun tersi olarak, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'lar, tümör baskılayıcı genleri, hücre farklılaşmasını ve apoptozu kontrol eden genleri engelleyerek tümör oluşumunu tetiklerler (17).

1.1.3.Ovaryan Folikül Gelişimi ve Ovulasyon

1.1.3.1 Primordiyal Folikül

Primordial germ hücreleri yolk sak, allantois embriyonun son bağırsağının endoderm tabakasından köken almakta ve gebeliğin 5-6 haftasında genital çıkıntı

bölgesine göç etmektedir(21). Gebeliğin 6-8. haftalarında, hızlı mitotik çoğalma meydana gelerek, 16- 20. haftalarda maksimum oosit sayısına ulaşır ve her iki overde total 6-7 milyon oosit oluşur. Primordial folikül mayozun profazın diploten aşamasında durdurulmuş oosit ve bunun çevresindeki iç biçimli tek sıralı granuloza hücrelerinden oluşmaktadır. Erişkin dönemdeki ilk ovulasyona kadar bu fazda kalırlar. Ovulasyondan hemen önce I. Mayoz devresindeki mayoz bölünme tamamlanıp 23 kromozumlu sekonder oosit oluşur. Oosit sperm penetrasyonu ile aktive olursa II. mayoz bölünme başlar ve 23 kromozumlu matur oosit gelişir(6).

Sayıları tükeninceye kadar, tüm fizyolojik koşullarda foliküller büyür ve atreziye uğrar. Gebelik ovulasyon veya anovulasyon dönemleri büyüme ve atreziye gidişi kesintiye uğratmamaktadır. Bu dinamik süreç, çocukluk ve menopoza dönemleri dahil olmak üzere tüm yaşlarda devam etmektedir. Gebeliğin 16-20. haftalarındaki maksimal sayıya ulaşıldıktan sonra oosit sayısı gittikçe azalır. Azalma oranı var olan sayıya bağlıdır; böylece, en hızlı azalma doğumdan önce meydana gelerek, 6-7 milyondan, doğumdaki 2 milyon değerine iner; puberteye gelindiğinde total oosit sayısı 300.000'dir. Bu büyük havuzun içinden, kadının reproduktif yılları boyunca sadece yaklaşık 400 folikül ovulasyona kadar ulaşılabilir (6). Uyarılmaya ilk olarak yanıt verebilen folikül önceliğe sahip olmaktadır. Ovulasyona ulaşacak olan folikül siklusun ilk birkaç gününde belirlenmektedir. Preovulatuvar evreye gelene kadarki süreç yaklaşık 85 gün sürmektedir. Foliküler gelişmenin ilk görülebilen belirtileri oositin boyutlarının büyümesi ve granuloza hücrelerinin skuamöz şekilden kuboidal biçim almasıdır. Aynı zamanda granuloza hücreleri ile oosit arasında küçük gap junction'lar gelişmektedir. Bunlar granuloza hücreleri ve oosit arasındaki nutrisyonel, metabolit, iyon ve düzenleyici metabolitlerin değişiminin yapıldığı yollardır. Kuboidal granuloza hücrelerinin çoğalması ile (yaklaşık 15 hücre) primordial folikül primer foliküle dönüşmektedir. Granuloza tabakası bazal lamina adını taşıyan membran aracılığı ile stromal hücrelerden ayrılmıştır. Cevredeki stromal hücreler teka interna (bazal laminaya daha yakın) ve teka eksterna (dıştaki kısım) olarak tanımlanan konsantrik tabakalara diferansiye olmaktadır. Çoğu durumda bu büyüme daha menstrual siklusun başında sınırlandırılmakta ve atrezi ile sonuçlanmaktadır(6,21).

1.1.3.2. Preantral (Primer) Folikül

Büyüme bir kez başladıktan sonra folikül preantral aşamaya kadar gelişmektedir, bu safhada oosit büyür ve zona pellucida adı verilen membran ile çevrilidir. Granuloza hücreleri çok katlı bir duzeni oluşturmak üzere proliferer olur ve teka tabakası çevredeki stromadan farklılaşmaya devam eder. Bu büyüme gonadotropinlere bağımlı olup, artan östrojen yapımı ile uyum içindedir (6). Moleküler çalışmalar preantral folikülün granuloza hücreleri steroidlerin her üç sınıfını da sentez edebilme yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir ancak, androjen ve progesterona oranla çok daha fazla östrojen yapılmaktadır. Aromataz enzim sistemi androjenleri östrojene dönüştürerek ovaryan östrojen yapımını sınırlayan faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Aromatizasyonun indüksiyonu veya aktivasyonu FSH'nın etkisindedir. FSH'nın kendi reseptörüne bağlanması ve adenilat siklaz iletimli uyarının ortaya çıkmasını multipl mRNA'ların sentezi takip eder, bunlarda hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve hücrelerindeki steroidogenezi (östrojen yapımı) başlamakta hem de granuloza hücrelerinin büyümesini stimule etmektedir(6,21).

Preantral granuloza hücrelerinde spesifik FSH reseptörleri bulunmaktadır ve FSH'nın varlığında, preantral folikül kendi östrojenik mikrocevresini oluşturmak üzere sınırlı miktardaki androjenleri aromatize edebilir(30). Böylece, östrojen yapımı FSH reseptör içeriği ile sınırlandırılmaktadır. FSH verilmesi ile granuloza hücrelerindeki FSH reseptör konsantrasyonu hem in vivo, hem in vitro ortamlarda artacak ve azalacaktır (up ve down regulasyon). FSH'nın etkisi büyüme faktörlerince module edilmektedir. FSH reseptörleri hızlıca yükselerek her granuloza hücresinde yaklaşık 1500 reseptöre ulaşır (6). FSH östrojen ile birlikte hareket ederek granuloza hücrelerinde sinerjistik mitotik etki gösterir ve proliferasyonunu uyarır. FSH ve östrojen birlikte, FSH reseptörlerinin çoğalmasını uyarmaktadır(6). Androjenlerin erken foliküler gelişimdeki rolü komplekstir. Granuloza hücrelerinde spesifik androjen reseptörleri bulunmaktadır. Androjenler FSH uyarımlı aromataz substrat oluşturmanın yanı sıra, düşük konsantrasyonlarda, aromataz aktivesini daha da arttırabilirler. Androjenden zengin ortamda bulunan preantral granuloza hücreleri androjenleri östrojenlere dönüştürmekten ziyade, daha potent olan a-redukte androjenlere dönüşmektedir. Bu androjenler östrojene dönüştürülemez ve aromataz

aktivesini baskılar. Bunlar ayrıca, folikuler gelişimdeki ayrı bir aşama olan; luteinizan hormon (LH) reseptör oluşumunun FSH ile uyarılmasını da inhibe eder. (6).

Preantral folikülün kaderi hassas bir dengededir. Düşük konsantrasyonlarda androjenler kendi aromatisasyonunu arttırır ve östrojen yapımına katkı sağlar. Daha yüksek düzeylerde ise, aromatisasyonun sınırlı kapasitesi aşılmakta ve folikül atreziye uğramaktadır. Bir folikülün akıbeti androjenik mikrocevreği, östrojenik mikrocevreğe dönüştürebilme yeteneğine bağlıdır (6).

1.1.3.3. Antral Folikül

Östrojen ve FSH'nın sinerjistik etkisi ile granulozanın interselüler boşluklarında biriken folikül sıvısının yapımı çoğalır. Folikül aşamalı olarak antral safhaya geçtikçe kavite oluşma eğilimi belirlemektedir (6). FSH'nın varlığında östrojen folikül sıvısındaki ana madde halini almaktadır. Buna karşın, FSH'nın yokluğunda, androjenler hakim olmaktadır. Normalde, midsiklusa kadar folikül sıvısında LH bulunmamaktadır. Plazma ve antral sıvıda LH'nın erken olarak yükselmesi durumunda granulozadaki mitotik aktivite azalmakta, dejeneratif değişiklikler başlamakta ve folikül içindeki androjen düzeyleri artmaktadır. Bu nedenle granuloza hücrelerinin sürekli artışı ve folikuler büyümenin devamı için östrojen ve FSH'nın hakim durumda olması zorunludur. Androjenik ortam östrojen uyarımlı granuloza proliferasyonunu engellemekte ve sürekli olduğu takdirde, oositteki dejeneratif değişiklikleri uyarmaktadır (6).

1.1.3.4 Preovulatuvar (tersiyer) Folikül

Gelişen dominant folikülün göstergesi olan asimetrik ovaryan östrojen yapımı siklusun 5. gününde ovaryan venöz kanda saptanabilir; bu durum midfolikuler fazdaki FSH düzeylerinin aşamalı olarak düşüşü ile uyumlu olup, dominant folikülün fiziksel gelişiminin göstergesi olan çap artışına öncülük etmektedir (6). Bu siklusun kritik dönemidir. Dominant folikülün seçiminden sonra bile, verilen ekzojen östrojen, FSH düzeylerini gerekenin altına düşürerek preovulatuvar gelişmeyi durdurmakta ve atreziyi başlatmaktadır (22).

Östrojenin FSH'a olan negatif feedback etkisi dominant folikül dışındaki tüm foliküllerin gelişimini inhibe eder. Seçilmiş olan folikül FSH'a bağımlı olmaya devam ettiğinden, FSH'nın azalan plazma düzeyleri karşısında preovulatar gelişimini tamamlamalıdır. Böylece dominant folikül, kendisinin arttırarak ürettiği östrojenin neden olduğu FSH düşüşünün sonuçlarından kurtulmaktadır. Dominant folikülün iki önemli avantajı bulunmaktadır: Diğer foliküllerden daha belirgin olan granuloza proliferasyonu sayesinde ulaşılan daha yüksek FSH reseptör içeriği ve yüksek intrafoliküler östrojen konsantrasyonu veya lokal otokrin/parakrin peptitler nedeni ile ortaya çıkan FSH etki artışı (6).

Daha büyük granuloza hücreleri kütesinin birikimi ile birlikte tekal damar sistemi gelişimi de ilerler. Siklusun 9. gününde dominant foliküldeki tekal vaskularite diğer antral foliküllerdekinin iki katıdır. Bu sayede gonadotropinlerin foliküle akımına izin verilir ve dominant folikül FSH'ya yanıt verebilme yeteneğini korur ve azalan gonadotropin düzeylerine rağmen gelişim ve fonksiyonuna devam eder. Ovulatar tepeye yanıt verebilmek ve etkili korpus luteuma dönüşebilmek için granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin artması gerekmektedir. FSH, büyük antral foliküllerin granuloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin gelişimini arttırmaktadır (6).

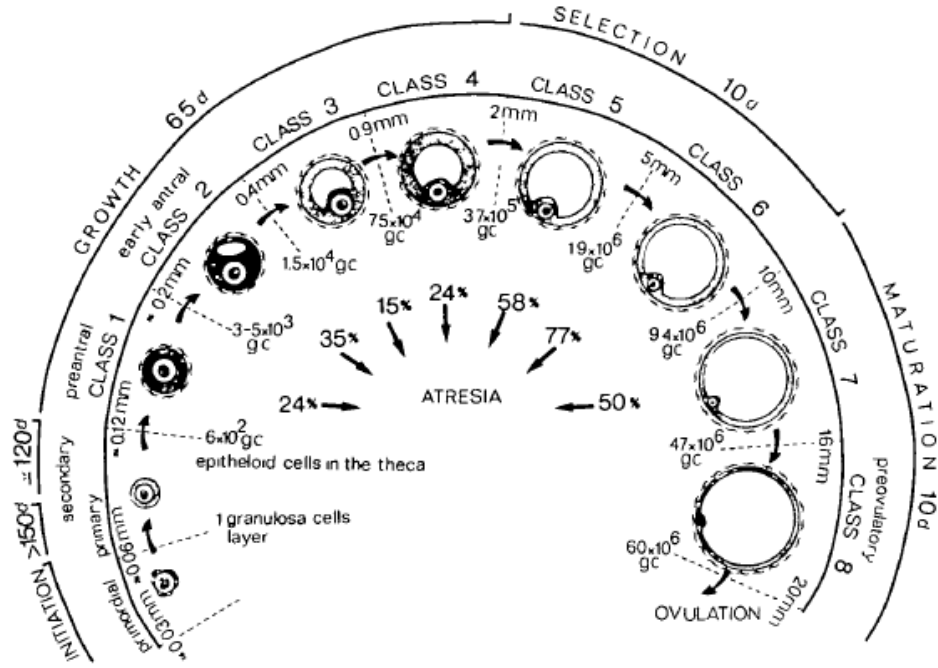
1.1.3.5. Ovulasyon

Preovulatar olgun bir folikül 18-20 mm çapında geniş antrumludur. Etrafında iyi vaskularize teka hücreleri vardır. Teka tabakasında foliküle ait düz kas hücreleri vardır. Ovarian stroma içindeki bağ dokusu arasında yer alan dominant folikül giderek overin korteksine yaklaşarak over yüzeyinde çıkıntı yapar ve folikül tepe noktası açılarak sekonder oosit çevre kumulus kompleksi ile dışarı atılır. Ovulasyon sonrası geride kalan granuloza ve teka hücreleri korpus luteumu oluşturur (6).

Ovulasyonu tetikleyen ana olay over ile hipotalamo-hipofizer sistem arasındaki hormonal etkileşimdir. Bu dönemde salgılanan günlük östrojenin %80'i dominant folikülden, kalan kısmı ise immatür foliküllerden, periferik testosteron, androstenodion ve östriol'un dönüşümünden oluşmaktadır. Serumda yeterli östrojen eşik değerine ulaşıncı, östrojen tepe noktasından (peak) yaklaşık 12-24 saat sonra pozitif feedback etki ile LH sekresyonu stimule olur. LH artımı ile dominant folikül

sıvısında bulunan ve primer oosit'in mayoz bölünmenin I.fazında duraklamasını sağlayan oosit mayoz inhibitörü (OIM) devre dışı bırakılarak, mayoz bölünme tekrar başlatılır. Ovulasyon sırasında overden salınan oosit, I.mayoz bölünmesi tamamlanmış, kromozom sayısı yarıya düşmüş olan 23 kromozomlu sekonder oosit'tir. Ovulasyon anı LH atım başlangıcından 34-36 saat, LH pikinden 10-12 saat sonrasına denk gelir. LH yüksekliği dominant folikülde granuloza hücre LH reseptörleri üzerinden progesteron yapımını arttırır. Progesterondaki az fakat önemli olan kısa süreli yükselişin pozitif feedback etkisi ile LH piki ortaya çıkışı ve midsiklus FSH pikinin oluşumu hızlanır. LH artışı oositte durmuş olan mayozun yeniden başlamasını, granuloza hücrelerinin luteinizasyonunu, oosit ile çevresindeki kumulus tabakasının serbestleşmesini ve folikül rüptürü için gerekli olan prostaglandinlerin ve diğer eikozanoidlerin sentezini sağlamaktadır (6). FSH, LH, progesterondaki bu fizyolojik değişimleri folikül duvar kollajeninin dejenerasyonuna, folikül duvarının ince ve gergin hale gelmesine ve sonuçta da rüptürüne neden olduğu üzerinde durulmaktadır. LH'nın ovulasyon tetiği çekebilmek için progesteron reseptörlerinin otokrin etkisine ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir.

Gonadotropinlerin etkisi altında foliküler sıvıda plazminojen aktivatorlerinin sentezi artar. Ovulasyon yaklaştıkça granuloza hücre plazminojen aktivatorleri sekresyonu çoğalır ve plazminojenden oluşan plazmin etkisi ile de folikül duvarının gerilim gücü zayıflar. Prostaglandinler de folikül duvarından proteolitik enzimlerin serbestleştirilmesine, histamin ve bradikinin oluşturulmasına ve angiogenesis ile hiperemik, inflamatuvar bir ortam oluşturulmasına neden olurlar. Diğer yandan prostoglandinlerin bir diğer etkileri de folikül çevresindeki teka tabakasındaki düz kasların kasılmasını sağlayarak ovulasyona yardımcı olmalarıdır. Prostoglandinlerin ovulasyon üzerinde bu kadar önemli etkileri bulunması nedeniyle, ovulasyon indüksiyonu uygulanan infertil hastalarda prostoglandin sentezini inhibe eden ilaçların perioovuluar dönemde kullanılmaması önerilmektedir (6).



Şekil 1: Erişkin insan overinde folikülogenez aşamaları (23)

1.1.3.6. Korpus Luteum

Oosit salınması ile luteal faz başlar. Korpus luteum luteinize olmuş granuloza hücreleri ile teka interna ve teka eksterna tabakalarından oluşur. Korpus luteumun çevre stromasındaki kapillerler ve fibroblastlar hızla proliferasyon olarak bazal laminaya penetre olurlar, granuloza tabakalarına ve sonrasında folikül antrumuna ulaşır. Böylelikle LDL-Kolesterol granuloza hücrelerine ulaşır. LDL-Kolesterol reseptör regulasyonu LH tarafından düzenlenir. Korpus luteumun asıl görevi salınmış oositi desteklemek ve endometriumu implantasyona hazırlamak için progesteronu salgılamaktır. Progesteron salgısı LH salgısından 6-8 gün sonra en yüksek noktasına ulaşır (6). Granuloza hücrelerine endositoz yoluyla alınan LDL-Kolesterol serbest kolesterol ve aminoasitlere hidroliz olur. Serbest kolesterol mitokondride pregnanolon, progesteron ve az miktarda androjene dönüşür. Korpus luteumdan salgılanan progesteron lokal ve santral etkisi, östrojen ve inhibinin de katkısı ile yeni folikülün gelişimini durdurucu etkisi vardır. Gebelik olmazsa ovulasyondan 9-11 gün sonra korpus luteum hızla küçülmeye başlar ve progesteron, östrojen ve inhibin seviyeleri düşer. Menstürel kanama olur diğer taraftan inhibinin etkisinden kurtulan FSH artmaya başlar, böylelikle yeni menstürel siklus başlar. Gebelik olduğu

takdirde korpus luteumun gelişimi, ilk 3 ay gebelikte artan HCG tarafından desteklenmektedir (6).

1.1.4.Over Folikül Reserv Testleri

1.1.4.1 Bazal Serum FSH

Büyümekte olan folliküller arasında ovulasyona gidecek olan dominant follikülün seçilmesi, normal menstruel siklusta, geç luteal fazdaki FSH uyarısına bağlıdır. Bu dönemde serum progesteron ve inhibin değerlerindeki azalma, mense kadar süren FSH artışı ile sonuçlanır. Folliküler büyüme başlayınca artan serum E2 ve inhibin seviyeleri FSH seviyesini düşürür. Bu bilgiler ışığında overin FSH'ya olan duyarlılığını değerlendirmek için en uygun zamanın, menstrüel siklusun luteofoliküler geçiş dönemi olduğu kabul edilmektedir. FSH ölçümleri genelde siklusun 3. gününde (D3) yapılmaktadır. Normal over rezervi için laboratuvar ölçüm sınırı 12 mIU/mL kabul edilmektedir (24,26). Azalmış over rezervi durumunda ovaryan hormon üretimindeki azalma hipotalamik/hipofizer FSH sekresyonu üzerindeki negatif feedback etkiyi kaldıracağından FSH yükselecektir (26).

1.1.4.2 Bazal FSH/LH Oranı

Menopozda FSH ile birlikte LH değerleri de artış göstermektedir. Ancak FSH' daki yükselme LH' dan birkaç yıl önce gerçekleşmektedir. Bu bağlamda FSH/LH oranındaki artış over rezervindeki azalmanın ilk belirtisi olabilir (24).

1.1.4.3 Bazal Serum Östradiol (E2)

FSH'ya ek olarak bazal E2 ölçümü, fertilite potansiyelini önceden belirlemede bazal FSH veya kronolojik yaşın tek başına kullanılmasına kıyasla daha etkin olabilir(25). 38-42 yaş arasındaki, FSH düzeyleri normal olan kadınlarda D3 E2'nin <80 pg/ml olması, tedavide iyi bir prognoza işaret etmektedir (26). Folliküler E2 düzeylerinin erken dönemde artmasının, azalmış ovaryan cevapla ilişkili olduğu gösterilmiştir (27).

1.1.4.4. Bazal Serum İnhibin B

İnhibin transforming growth faktör-b (TGF-b) ailesinden, 32 kDa ağırlıkta, hipofizden FSH salımını inhibe eden, yapısal olarak AMH' e benzeyen heterodimerik bir proteindir (28). İnhibin A dominant follikül' den salgılanmakta iken, İnhibin B daha çok gelişmekte olan folliküllerden salgılanmaktadır. İnhibin B konsantrasyonları luteo folliküler geçiş döneminde artmaya başlar ve midfolliküler dönemde en üst düzeye ulaşır. Serum inhibin B düzeylerinin gelişmekte olan folliküllerin sayı ve kalitesiyle orantılı olduğu düşünülmektedir (24,29).

1.1.4.5 CCCT (Clomiphene Citrate Challenge Test)

Menstruel siklusun 5-9. günleri arasında 100 mg CC verilir. Siklusun 3. ve 10. günlerinde FSH ölçülür. Bu ölçümlerde laboratuvar sınırlarını aşan bir değer bulunmuşsa test pozitif olarak değerlendirilir. Bu sınır genellikle 10-12 mIU/mL dir (30).

1.1.4.6. GAST (Gonadotropin releasing hormon (GnRH) Agonist Stimülasyon Testi)

Menstrüasyonun 2. veya 3. günü verilen GnRH analoguna cevaben E₂'deki değişim paternleri değerlendirilir. Diğer testlere göre üstünlüğü olmadığı belirlenmiştir (30).

1.1.4.7. EFORT (Eksojen FSH Ovaryan Rezerv Testi)

Siklusun 3. günü 300 IU FSH IM uygulanır. Önce ve 24 saat sonra E₂, FSH değerlerine bakılır. İyi cevap olarak değerlendirmek için artış oranları sırasıyla > 25-30 pg/mL, <9 IU/L olmalıdır (30).

1.1.4.8. Antral Folikül Sayısı (AFS)

AFS yaşla beraber azalmaktadır. Otuzyediyi yaşından önce yılda %4,8, sonrasında ise %11,7 oranında azalmaktadır (30). AFS gonadotropin stimülasyonuna verilen yanıtı öngörmeye iyi bir parametre olsa da yapılan çalışmalarda gerek antral follikül tanımında, gerekse AFS eşik değerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda 2-5mm arasındaki foliküller antral follikül olarak tanımlanırken, çoğu

çalışmada 2-10 mm arasındaki folliküller antral follikül olarak tanımlanmaktadır. AFS aynı hastada sikluslar arasında da değişiklik gösterebilmekte ve bu değişiklik genç ve AFS fazla olanlarda daha fazla gözlenmektedir (32).

AFS'ye göre yapılan derecelendirme

Grade I overler; 4 ve altında antral follikül içerir.

Grade II overlerde 4-6 AF bulunur.

Grade III overlerde 7-10 AF bulunur.

Grade IV overler polikistik over (PCO) yada PCO benzeri olarak değerlendirilir ve tedavi dozu bu derecelendirmeye göre belirlenir.

1.1.4.9. Over Volümü

Over hacmi, ilerleyen yaşla birlikte azalır. Kadın hayatı boyunca over hacmi, 10 yaşında ortalama 0,7 cm³'ten, 18 yaşında 5,8 cm³'e kadar büyür. Over hacminin transvajinal yoldan ultrasonografik ölçümü, hızlı, doğru ve cost-effective bir yöntemdir. Over hacmi ve antral follikül sayısı arttıkça over rezervinin de arttığı öne sürülmektedir (32).

1.1.14.10. Over Biyopsisi

Reproduktif potansiyel overin korteksindeki primordial follikül sayısı ile korelasyon gösterir. Overden biyopsi alınarak ölçülen follikül yoğunluğunun over rezervini göstermek için kullanılabileceği düşünülmüş, ancak Lambalk ve ark. (33) folliküler dağılım çok fazla varyasyon gösterdiği için araştırmacılar ovaryan biyopsinin over rezervi değerlendirilmesinde yeri olmadığına karar vermişlerdir (34).

1.1.4.11. Anti Mülleryan Hormon (AMH)

TGF- β ailesinden 140kDa büyüklüğünde dimerik glikoprotein yapıdadır (35). Erkeklerde testiküler gelişimin başlangıcından puberteye kadar sertoli hücrelerinden, daha az miktarda dişilerde granüloza hücrelerinden doğumdan menapoza kadar sentezlenmektedir (36). AMH'nın tek etkisinin reproduktif organlara olduğu düşünülmektedir. En önemli ve belirgin etkisi mülleryan kanalın regresyonunu sağlamaktır. Yokluğunda mülleryan kanaldan fallop tüpleri, uterus ve vajenin üst 1/3' ü gelişmektedir (37).

Anti-mülleryan hormon overyan granüloza hücrelerinden preantral ve küçük antral folliküllerden, pitüiter FSH'nın etkisiyle dominant follikül için seçilebilecek büyüklüğe ve farklılaşmaya ulaşılıncaya kadar sentezlenmektedir. İnsanlarda bu olay follikül 4-6 mm büyüklüğe ulaşılıncaya kadar gerçekleşmektedir. AMH teka hücresi ve atretik folliküllerden sentezlenmemektedir (38). Son çalışmalarda preantral, geç pre-antral ve preovulatuvar folliküllerde AMH mRNA seviyelerinin oositin gelişim evreleriyle paralel olarak düzenlendiği, AMH'nın intra ve inter-folliküler koordinasyonda önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (39). AMH sentezini düzenleyen mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber granüloza hücreleri üzerinde AMH reseptörleri tespit edilmesi overyan fizyolojide rolü olduğunu düşündürmektedir (40). AMH'nın serin tireonin kinaz reseptörlerini kullanan iki farklı reseptörü bulunmaktadır (AMHR Tip1, AMHR Tip 2). AMHR2 mülleryan kanal mezenkiminde bulunmaktadır. Bu reseptörün fonksiyon bozukluğu tıpkı AMH yokluğu gibi kalıcı mülleryan kanal sendromuna yol açabilmektedir. Ratlarda AMHR2 granüloza ve teka hücrelerinde de izlenmektedir (41). AMHR 1 özellikleri ve işlevi günümüze kadar tam olarak tespit edilememiştir.

Primordial folliküllerin gelişmesi negatif ve pozitif faktörlerin etkisi altındadır. AMH erken folliküler gelişim üzerine negatif etkileri olan bir faktördür. Homozigot AMH knockout dişi ratlarda daha fazla sayıda büyüyen preantral ve küçük antral follikül saptanmış ancak bu ratlarda primordial follikül stoklarının daha erken yaşta tükendiği gözlenmiştir.

Anti-mülleryan hormon etkilerinin direk primordial hücreler üzerinden olup olmadığını göstermek için yapılan bir çalışmada AMH bulunmayan rat overini AMH bulunan yapay ortama bıraktıktan iki gün sonra yapılan incelemede büyüyen follikül sayısının %50 azaldığı, AMH'nın primordial oositleri direk olarak etkilediği gözlenmiştir ve AMH'nın primordial follikül gelişiminin aktivasyonunu preantral folliküllerde azalttığı sonucu çıkarılmıştır (42).

İn vivo ve in vitro çalışmalar AMH eksikliğinde foliküllerin FSH'ya daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Düşük ve yüksek FSH konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda AMH'dan yoksun fareler, AMH mevcut farelerle karşılaştırıldığında hem sayısal hem de gelişimsel olarak follikül gelişiminde daha iyi yanıt alındığı

gözlenmiştir (43). Clemente ve ark. (44) ekzojen AMH'nın kültür ortamında granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini ve LH reseptör sayısını azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar ışığında AMH'nın overyan folliküllerin FSH'ya verdiği yanıtı belirleyen faktörlerden birisi olduğu sonucu çıkmaktadır. Başka bir çalışmada ise AMH'nın farelerde 1.mayoz bölünmeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (45). AMH insan granüloza-luteal hücrelerin proliferasyonunu bloke etmekte ve folliküler sıvı AMH konsantrasyonu granüloza hücrelerindeki mitoz indeksi ile ters orantılı bulunmuştur (46). Hayat boyunca AMH düzeyi kadınlarda erkeklerden daha düşüktür. Yenidoğanda AMH seviyeleri tespit edilemeyecek kadar düşüktür; 2-4 yaşlarında hafif yükselme olur ve sonrasında ergenliğe kadar stabil seyrederek. Yaş ilerledikçe folliküler rezerv azalmasına bağlı olarak serum düzeyi düşer, menapozda çok düşük veya tespit edilemeyecek düzeye geriler (47). Serum AMH menstrüal siklus sırasında fluktuasyon göstermemektedir. Bu özelliği diğer over rezerv testlerinden farklı olarak siklusun herhangi bir gününde değerlendirilme yapma avantajı sağlamaktadır (48). Minimal fluktuasyonlar siklik olmayan küçük follikül büyümesinden dolayı oluşabilmektedir. Overyan follikül havuzunun azalması ve oosit kalitesinin düşmesi nedeniyle yaşla beraber üreme fonksiyonları azalmaktadır. AMH over rezervini ölçmek amaçlı son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Spontan menapoz sonrasında, ooferektomi sonrasında AMH düzeylerinin tespit edilemeyecek düzeylere düşmesi AMH'nın tamamen over kaynaklı olduğunu göstermektedir (49). D3'te saptanan AMH seviyeleri yaşla beraber düşmektedir. De Vet ve ark. (50) yaptığı çalışmada 1,1-7 yıl boyunca takip edilen olgularda AMH seviyelerinin ortalama %38 düştüğü, buna karşın aynı sürede antral follikül sayısı, bazal FSH düzeyi ve inhibin B düzeylerinde değişiklik olmadığı saptanmıştır. Over rezervini gösteren diğer belirteçlere oranla yaşa bağlı oosit/follikül rezervini daha iyi gösterdiği düşünülmektedir ve yaş arttıkça diğer parametrelerde değişiklik olmadan ilk olarak AMH düzeyleri azalmaktadır (51).

Folliküller, antral follikül aşamasına gelişinceye kadar gonadotropinlerden bağımsız olarak gelişmektedir (52). Hipofizektomize, hipopituitarizm olan olgularda antral follikül basamağına kadar gelişim olmaktadır. AMH sekonder amenore tanısında hipogonadotropik hipogonadizm ile hipergonadotropik hipogonadizm

ayrımında yardımcı olabilmektedir. Gebelikte gonadotropin düzeyleri oldukça düşük olmasına rağmen gebelik öncesi AMH düzeylerinde değişiklik olmadığı görülmektedir. AMH plasentadan sentezlenmemekte, gebelik boyunca ve puerperiumda düzeyleri değişmemektedir (53).

Anti-mülleryan hormon sadece granüloza hücrelerinden sentezlenmektedir, bu nedenle granüloza hücreli tümörlerde (GCT) marker olarak kullanılabilir. GCT saptanan olguların %76-93'ünde yüksek bulunmuştur (54). Tümör rezeksiyonunu takiben yapılan seri ölçümlerde, rekürrensin klinik olarak tespitinden ortalama 16 ay önce yükselmeye başlamaktadır (55). AMH, GCT takibinde E₂ ve inhibine göre daha iyi bir belirteçtir, özellikle rekürrenslerin 10-20 yıllık zaman dilimlerinde ortaya çıktığı GCT'lerde rekürrenslerin erken tesbitinin sağ kalım süresini arttırdığı düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı

Bu deneysel çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) laboratuvarında yapılmıştır. Tüm işlemler Fırat Üniversitesi Etik onayı ile veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir.

Sunulan çalışmada 35 adet düzenli siklusa sahip, 190–220 gr ağırlığında, 4 aylık, erişkin dişi Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar 12 saat ışık (08–22), 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 21–23 C° sabit sıcaklıktaki odada, standart pellet yemi ve şehir suyu ile beslendi.

2.2. Deneyin Yapılışı

Araştırmamızda 35 adet düzenli siklusa sahip, 190–220 gr ağırlığında, 4 aylık, erişkin dişi Wistar Albino cinsi rat, estrus fazında rastgele, prospektif, tek kör olarak 5 gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=7): Kontrol grubu. Plasebo tablet verildi.

Grup 2 (n=7): 3 ay boyunca gastrik lavaj yoluyla etinil estradiol 1,5mcg/gün + Drospirenon 150mcg/gün (Yasmin® Almanya, Bayer Scherring Pharma) verildi.

Grup 3 (n=7): 3 ay boyunca gastrik lavaj yoluyla etinil estradiol 1,5mcg/gün + Siproteron asetat 100mcg/gün (diane 35® Almanya, Bayer Scherring Pharma) verildi.

Grup 4 (n=7): 3 ay boyunca gastrik lavaj yoluyla etinil estradiol 1,5mcg/gün + Gestoden 3,75mcg/gün (Ginera tb® Almanya, Bayer Scherring Pharma) verildi

Grup 5 (n=7): 3 ay boyunca gastrik lavaj yoluyla etinil estradiol 1,5mcg/gün + Drospirenon 7,5mcg/gün (Microgynon® İstanbul, Türkiye Bayer Türk Kimya San. Ltd.) verildi.

3 ay sonra deneyden 18 saat önce oral beslenme kesilerek, sadece su içmelerine izin verildi. Ratlara anestezi sağlamak amacıyla 400 mg/kg/IP dozunda kloral hidrat uygulanarak ratlar sırt üstü operasyon masasına yatırıldı.. Batın orta hat insizyonla açılarak bilateral ooferektomi yapıldı. Sağ over histolojik inceleme için %10 luk formaldehite fiske edilirken, sol over – 80 de RNA izolasyonu için saklandı. Anestezi altındaki ratlardan biyokimyasal analiz için intrakardiyak kan alınarak serum AMH analizi yapıldı.

2.3 Işık Mikroskopik Doku Hazırlanması

Her gruptan alınan over dokuları % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Masson Trikrom, ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda incelenip primordial, primer, sekonder ve tersiyer foliküller ve corpus luteum sayıldı. Hepsi toplanarak over folikül rezervi saptandı, fotoğraflandı. Masson Trikrom boyanmada; fibrozis, germinal epitelde bozulma ve korpus luteum angiogenezi 0'dan +3'e kadar sayı ile ordinal skala oluşturularak skorlandı. (yok=0, az =+1, orta=+2, şiddetli=+3).

2.2.4. miRNA İzolasyonu

2.2.4.1.Kullanılan Aletler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukranya
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centri füge Tube, Meksika
- Homojenizatör :Next Advance, Averill Park NY, Bullet Blender Storm, ABD
- Homojenizatör Boncuğu: Next Advance, GB05-RNA 0.5mm Dia, RNase-Free Glass Beads, ABD
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825,Switzerland, İsviçre
- PZR ve Qubit tüpleri (0.6ml): Neptune, Katalog: 3737.S.X,Biotix Laboratory Media, İngiltere
- Plate Yapıştırıcı: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, ABD
- Plate: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0.1 mL), Singapur
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Biometra, Almanya
- Qubit® 2.0 Fluormeter: İnvitrogen by life teknologies, Avusturalya

- Real Time- PCR: AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No:C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

2.2.4.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- cDNA Kiti: AB Applied Biosystems, High- Capacity cDNA Reverse Trancription Kits, Part No:437522 REVB, Foster City, CA
- Qubit® RNA Kiti: İnvitrogen/Molecular Probes, Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer, ABD
- RNA Kiti: İnvitrogen, Ambion by life technologies™ , PureLink™ RNA Mini Kit, Katalog No: 12183018A, ABD
- TaqMan® Gene Expression Master Mix: AB Applied Biosystems, Katalog No:4369016, ABD
- Temizleme Solüsyonu: Bioshop, Nuclease Removal Reagent (500 mL), Kanada

2.2.4.3 Total RNA İzolasyonu

2.2.4.3.1 Kullanılan Çözeltiler:

- Lizis buffer: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.
- Wash I: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.
- Wash II: Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.
- %70'lik etanol

2.2.4.3.2. Deneyin Yapılışı

Over dokularından RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kiti kullanıldı. Çalışma prosedürü aşağıdaki gibidir:

Kit içerisindeki lizis buffer'dan 1ml ve 2-merkaptetanol'dan 10 µl falkon tüpüne alınıp karıştırılarak Lizis tampon çözeltisi elde edildi. Over, doku ile eşit miktarda homojenizatör boncuğu ve hazırladığımız çözeltiden 600µl alınarak kilitli eppendorf tüplere bırakıldı. Homojenizatörde 6 dakika (dk) 9. hızda parçalama işlemi

yapıldı. Örnekler 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. RNA içeren sıvı fazın hepsi yeni bir ependorfa alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Örneklerden 700 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarıldı ve 12.000xg'de 15 saniye(sn) oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kalan örneklerde kolonlara aktarılacak aynı şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında biriken sıvı boşaltıldı. Yıkama işlemleri kitin içindeki Wash I ve Wash II ile yapıldı. Örnekler 700 µl Wash I eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplam tüpü değiştirildi. Örnekler 500 µl Wash II eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı. Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar alınarak yeni ependorf tüplere bırakıldı ve üstüne 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletildi ve 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Ependorf tüpün dibindeki sıvı kısım bu aşamadan sonra RNA içermektedir. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

2.2.4.3.3. Spektrofotometrik RNA Ölçümü:

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (İnvitrogen/Molecular Probes) kullanıldı.

RNA miktarı µg/ml olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı. Komplementer DNA sentezi (cDNA) için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı ve 1.grup: kontrol, 2.grup: Yasmin, 3.grup: Diane 35 ve 4.grup: Gintera, 5.grup: Microgynon olmak üzere toplam 5 RNA havuzu elde edildi.

2.2.4.4. Komplementer DNA Sentezi

2.2.4.4.1Kullanılan Çözeltiler

High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti: Kit içinde 10X RT Buffer, 25X dNTP mix, 10X RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase hazır halde bulunmaktadır.

2.2.4.4.2. Deneyin Yapılışı:

cDNA sentezi için havuz yapılan RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. cDNA sentezi toplam 20µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için 10µl RNA örneği, 2 µl

10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0.8 µl 25XdNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1µl MultiScribe™Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı (Tablo 2). Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dk ve 4°C’de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi (Tablo 3). Oluşan cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

Tablo 2: cDNA karışım miktarı

Bileşik	Hacim (µl)	Katalog No
10X RT Tamponu	2.0	4319981
25X dNTP karışımı (100mM)	0.8	4367381
MultiScribe™Revers Transkriptaz	1.0	4319983
10XRT Random Primer	2.0	4319979
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4.2	
Primer	1	
Reaksiyon toplamı	10.0	

Tablo 3: cDNA sentezi için uygulanan PZR programı

PZR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

2.2.4.4.3 Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu:

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA’lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile amplifiye edildi.

MiRNA’ların miktarlarının belirlenmesi için Tablo 4’de verilen primerler kullanıldı.

Tablo 4: RT-PZR’ da kullanılan primerler

TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD, 250µl	
Test	Katalog Numarası
4.5S RNA (H):	001716
Mmu-Mir-21	002493
Mmu-mir191	002576
Rno-mir-494	462468-mat
Rno-mir 145	463225-mat

Real Time PZR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PCR Plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5µl TaqMan Master Mix, 2,5 µl nükleaz içermeyen su ve 0,5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları (Tablo 5) ependorflara kondu ve vortekslendi. Plate’deki cDNA örneklerinin üzerine 8µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate’in üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 5: RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşikler	Hacim(µl)X Örnek Sayısı
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2.5
Toplam	10.0

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları Tablo 6’ da gösterildiği şekilde ayarlandı.

Tablo 6: Uygulanan RT-PZR programı

RT-PCR X 40 döngü				
	1. Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2dk	10dk	15sn	1dk

2.5. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri

Anestezi altındaki sıçanlardan enjektör yardımıyla intrakardiyak kan örnekleri alınarak, cam tüpler içerisine konuldu. Bu örnekler 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar pasteur pipet ile çekilerek ependorf tüplerine alındı ve incelenmek üzere -20 °C’de derin dondurucuda bekletildi.

Serum örnekleri oda ısısında bekletilerek çalışma periyoduna getirildi ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında Plazma AMH düzeyleri, Rat Mullerian Inhibitory Substance/Antimullerian Hormone (MIS/AMH) ELISA kiti (EASTBIOPHARM HANGZHOU EASTBIOPHARM CO., LTD, Cat no: CK-E30083, China) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) otomatik yıkayıcı kullanıldı. Sonuçlar ng/ml olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 0,1-40 ng/ml, sensitivitesi 0,051 ng/ml idi.

2.5. İstatistik Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 21.0 programı kullanıldı. Işık mikroskopi ve AMH değerleride tüm grupların karşılaştırılması için, Kruskall Wallis varyans analizi ile yapıldı. $p<0.05$ bulunan değerler için, gruplar arası ikili karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test kullanılarak yapıldı. $p<0.01$ değerleri anlamlı kabul edildi.

PCR sonuçlarında gruplar arasında farklılıkların karşılaştırılması için t testi kullanıldı. $p<0.01$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. AMH Düzeyleri

Deneyin sonunda, anestezi altındaki sıçanlardan alınan kanlarda AMH analizi yapıldı. Kontrol grubuyla Yasmin kullanılan grup arasında anlamlı fark bulunmazken Diane 35, Ginera, Microgynon gruplarında AMH kontrol grubuna göre azalmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi(Tablo 7).

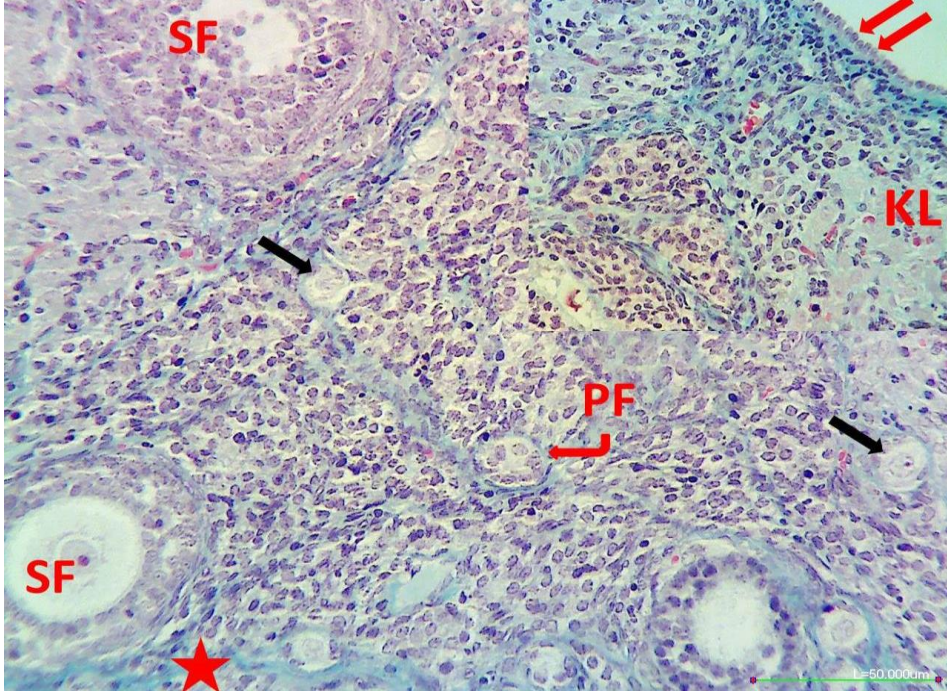
Tabo 7. Deneyin bitiminde, sıçanlardan intrakardiyak alınan kan örneklerindeki serum AMH düzeyleri

Gruplar	AMH(ng/dl)
G1(n=7)	3,8±0,5
G2(n=7)	3,8±1
G3(n=7)	3±0.5
G4(n=7)	3±0.4
G5(n=7)	2,9±0,5

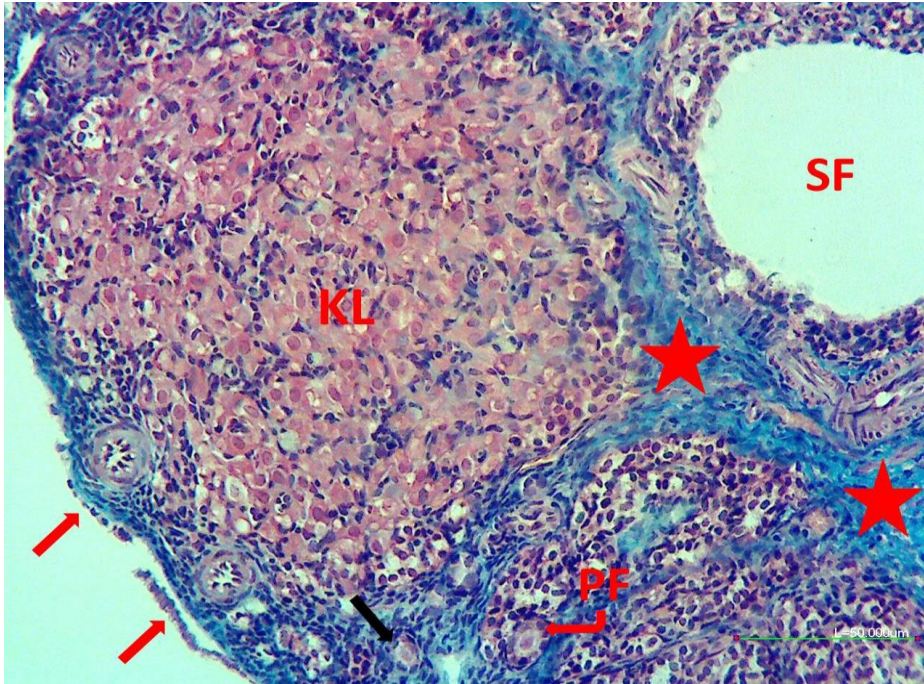
AMH: Antimüllerian hormon

3.2. Işık Mikroskopi Bulguları

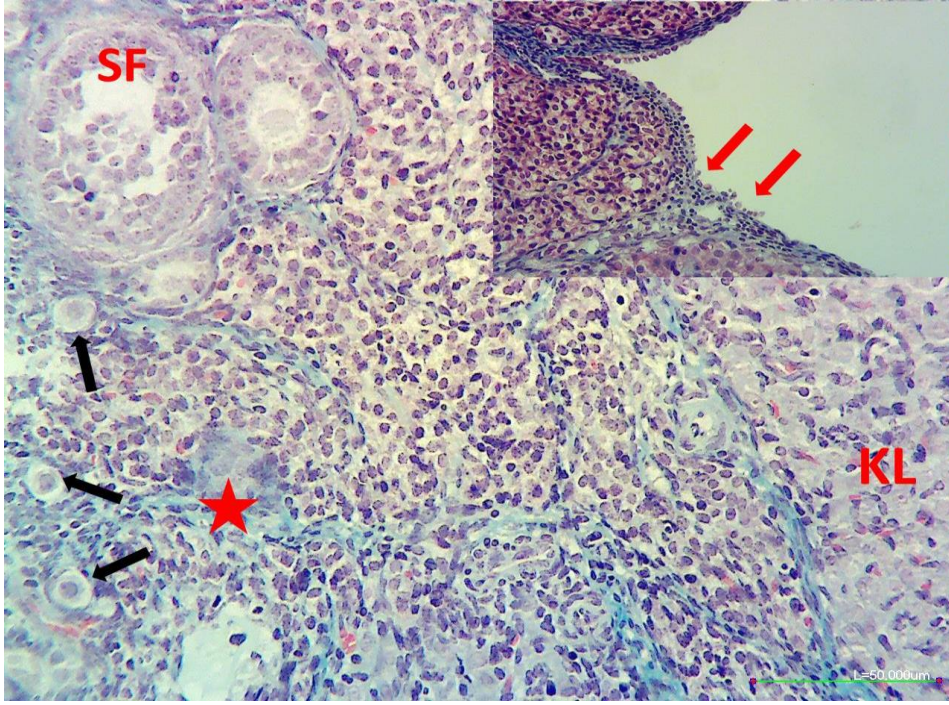
Masson's trichrome ile boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; kontrol grubuna ait over dokuları normal görünümdeydi (Şekil 2). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Ginera (Şekil 3), Microgynon (Şekil 4), Diane 35 (Şekil 5) ve Yasmin (Şekil 6) gruplarında fibrozis (kırmızı yıldız), germinal epitelde (kırmızı çift ok) bozulma ve korpus luteum (KL) angiogenezinde gerileme belirgin olarak artmıştı ($p<0,01$). Ayrıca tüm gruplara ait over dokularında primordiyal folikül (siyah ok), primer folikül (PF), sekonder folikül (SF) ve tersiyer folikül sayılarak over rezervi belirlendi. Over rezervi için yapılan sayımda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Microgynon, Diane 35 ve Yasmin gruplarında farklılık gözlenmezken Ginera grubunda belirgin azalma izlendi ($p<0,01$). Tüm gruplara ait histolojik bulgular Tablo 8' de özetlenmiştir.



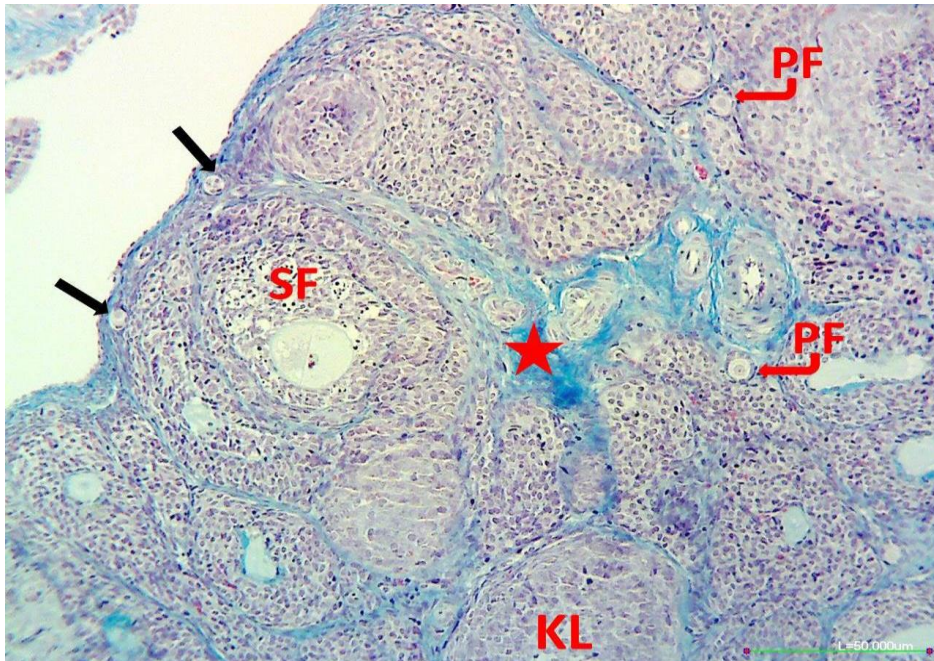
Şekil 2. Kontrol grubu ışık mikroskopide gelişmekte olan foliküller ve epitel bulguları Skala bar:50µm . Germinal epitelyum (kırmızı çift ok), fibrozis (yıldız), primordial folikül (siyah ok), primer folikül (PF), korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF).



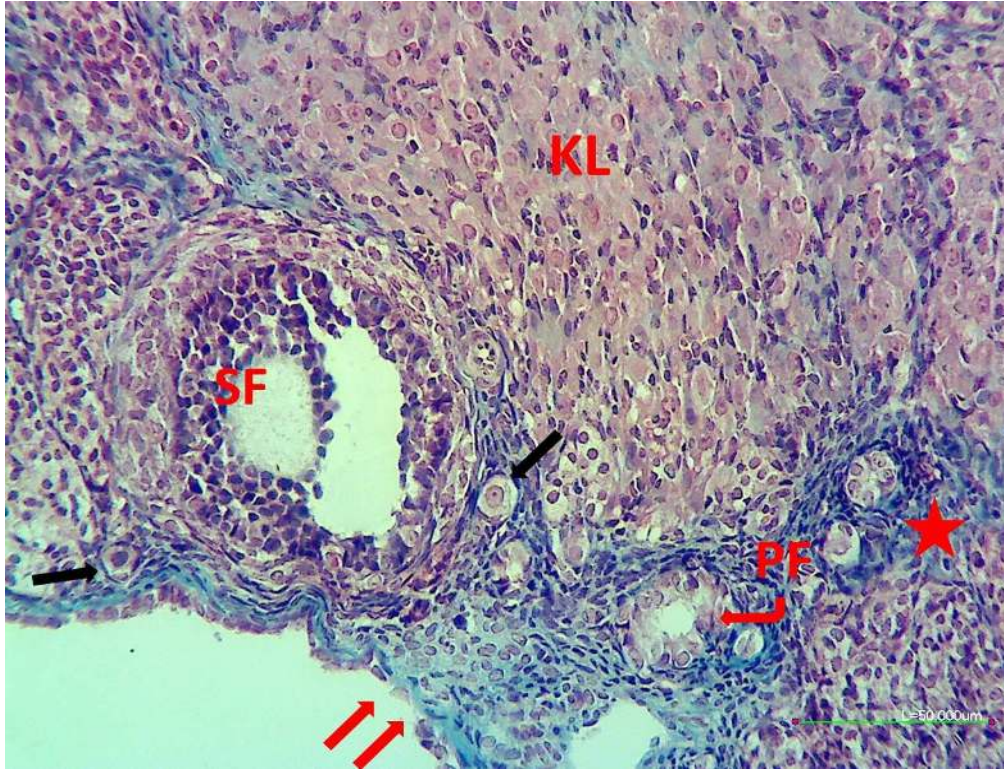
Şekil 3. Ginera verilen grupta germinal epitelde ayrılma (kırmızı çift ok) ve fibrozis artışı (yıldız) izleniyor skala bar:50µm. Korpus luteum(KL), sekonder folikül(SF).



Şekil 4. Microgynon verilen ratlardaki germinal epitelde bozulma (kırmızı çift ok), fibrozis (yıldız) ve ovaryan foliküller skala bar:50µm. Primordial folikül (siyah ok), korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF).



Şekil 5. Diane 35 verilen ratlarda büyümekte olan foliküller ve fibrozis (yıldız) izleniyor skala bar:50µm. Primordial folikül (siyah ok), primer folikül (PF), korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF).



Şekil 6. Yasmin grubunda epitelde bozulma (kırmızı çift ok), büyümekte olan foliküller skala bar:50µm. Fibrozis (yıldız), primordial folikül (siyah ok), primer folikül (PF), korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF).

Tablo 8. Ratların overinde ışık mikroskobu ile sayılan gelişen foliküller, korpus luteum ve toplam folikül rezervi (adet)

Gruplar	Primordial folikül	Primer folikül	Seconder folikül	Tersiyer folikül	Korpus Luteum	Toplam folikül
G1	19.1±1,3 ²	14±,1,4 ³	10,1±1,3 ¹	4,1±1,3 ²	13±0,9 ⁴	47,2±2,8 ^{3,4}
G2	20,1±1,9 ²	13,1±1,3 ³	15,1±1,5 ²	3±1,2 ²	9±0,6 ³	50±2,6 ⁴
G3	18,1±2,1 ²	12,1±1,3 ³	9,8±1,5 ¹	3±1,2 ²	5±1 ²	43±2,9 ³
G4	8,1±1,3 ¹	6±1,7 ¹	8,1±1,3 ¹	1±0,8 ¹	13±0,6 ⁴	21,4±2,8 ¹
G5	17±1,2 ²	9,4±1,3 ²	8,8±1,3 ¹	0,8±0,6 ¹	3±1,2 ¹	36,1±2 ²

* Ortalamaların üzerindeki farklı rakamlar, ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (p<0.01). NOT: Ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

Tablo 9. Işıık mikroskopide over yüzey epitelinde bozulma, fibrozis ve korpus luteum içi angiogeneze gerileme bulguları.

Gruplar	fibrozis	Germinal epitelde bozluma	Korpus luteum içi angiogeneze gerileme
G1	0±0 ¹	0±0 ¹	1±0 ²
G2	0,4±0,5 ^{1'2}	1,5±0,9 ²	0,4±0,5 ¹
G3	1±0,5 ^{2'3}	1±0,8 ²	0,5±0,4 ¹
G4	1±0,5 ^{2'3}	1,5±0,9 ²	0,5±0,5 ¹
G5	1,5±0,5 ³	3±0 ³	0,5±0,5 ¹

* Ortalamaların üzerindeki farklı rakamlar, ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (p<0.01). NOT: Ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

3.3. MiRNA Bulguları

Mir-21 ekspresyonunun kontrol grubuna göre Gİnera'da 18584, Diane'de 6931, Yasmin'de 2878, Microgynon'da 448 kat arttığı bulundu. Bu kat artışları t testine göre kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu(G;p: 0,000, D;p:0,000, Y: p:0,000, M;p:0,000)

Mir-494 ekspresyonunun kontrol grubuna göre Gİnera'da 116, Diane'de 49, Yasmin'de 2,6, Microgynon'da 2,9 kat arttığı bulundu. Bu kat artışları t testine göre kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu(G;p: 0,000, D;p:0,000, Y: p:0,008, M;p:0,011)

Mir-191 ekspresyonunun kontrol grubuna göre Gİnera'da 92, Diane'de 16, Yasmin'de 3, Microgynon'da 5,9 kat arttığı bulundu. Bu kat artışları t testine göre kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu(G;p: 0,000, D;p:0,000, Y: p:0,004, M;p:0,002)

Mir-145 ekspresyonunun kontrol grubuna göre Gİnera'da 86, Diane'de 33, Yasmin'de 20, Microgynon'da 6 kat arttığı bulundu. Bu kat artışları t testine göre kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu(G;p: 0,000, D;p:0,000, Y: p:0,000, M;p:0,002). Tüm gruplara ait miRNA bulguları tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. Tüm grupların miRNA ekspresyonu kat artışı

	Mir 21	Mir 145	Mir 191	Mir 494
Kontrol	1 ¹	1 ¹	1 ¹	1 ¹
Ginera	18584,07 ⁵	86,75635 ⁵	92,20625 ⁵	116,7801 ⁴
Yasmin	2878,118 ³	20,2512 ³	3,145235 ²	2,634959 ²
Microgynon	448,612 ²	6,054852 ²	5,998698 ³	2,952606 ²
Diane35	6931,564 ⁴	33,16564 ⁴	16,33513 ⁴	49,1718 ³

Ortalamaların üzerindeki farklı rakamlar, ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (p<0.01). NOT: Ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

TARTIşMA

Ginera ve Microgynon kullanımı over folikül rezervini azaltırken, AMH seviyesine etki etmemektedir. Diane 35, Yasmin kullanımı hem folikül havuzu hem de AMH üzerine olumsuz etki etmemektedir. Oral kontraseptif kullanımı germinal epitelde bozulma ve mir 145'i artırarak kanser gelişimi üzerine engelleyici etki yaparken, mir- 21, mir-191, mir-494'ü artırarak kanser gelişimini uyardığı saptandı.

Ginera içerisindeki progestin olan gestoden, Microgynon içerisindeki androjenik olarak bilinen progestin olan levonorgestrel'den yaklaşık 2 kat daha fazla androjen reseptör affinitesine sahiptir (56). Erken foliküler fazda androjenler FSH ile sinerjistik çalışır. Bu nedenle bir KOK' dan dan istifade edebilmek için androjenik progestin kullanılması folikül gelişimi için gerekli gonodotropin etkisini engelleyecektir ancak androjen etkisine de maruz bırakacaktır. İkisi bir takım gibi folikül gelişimini negatif etkiler. Başlangıçta androjenler folikül büyümesini sağlarken sonrasında FSH desteğinin olmaması büyüyen folikülülü atreziye uğratacaktır. Bu bağlamda Barad ve ark' nın yaptığı çalışmada genç hastalar da dâhil olmak üzere yüksek androjenik KOK kullananlarda over rezervi testlerinde ve toplanan oosit sayısında anlamlı azalma izlenmiştir (57). Androjenik progestin olan gestoden içeren Ginera ve levonorgestrel içeren Microgynon grubunda ışık mikroskobu ile sayılan toplam over rezerv düşüklüğü Barad ve ark'nın (57) çalışmasıyla uyumlu olarak azalmış bulundu.

Yasmin içerisindeki progestin olan drospirenon anti androjenik etkilidir. Tek başına drospirenon ve EÖ kombinasyonları ovulasyonu baskılarken folikül gelişimini tamamıyla baskılamaz (58). Barad ve ark.'nın (57) yaptığı çalışmada drospirenon ve siproteron asetat içeren KOK kullanan hastalar ile kontrol grubu arasında toplanan oosit sayısı arasında fark saptanmazken androjenik KOK kullanan grup arasında anlamlı azalma izlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da Yasmin ve Diane 35 gruplarında over folikül rezervinde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark saptanmazken corpus luteum sayısı anlamlı olarak düşük bulundu. Barad ve ark. (57) ile uyumlu olarak antiandrojenik progesteron içeren Yasmin ve Diane 35 in ovulasyonu engellediği ancak over folikül gelişimi üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı tespit edildi.

Kombine oral kontraseptiflerin kontraseptif etkilerinin yanında over kanseri gelişimini önleyici etkileri de bulunmaktadır. Üç yıl KOK kullanımı over kanseri riskini % 40 azaltmakta, kullanıldığı müddetçe koruyucu etkisi artmakta ve bıraktıktan sonra 2 dekat koruyucu etkisi sürmektedir(59).

Ovulasyon hipotezine göre tekrarlayan ovulasyonun over yüzey epiteline yaptığı mikrotravma neticesinde over kanseri gelişmektedir. KOK, gebelik ve emzirme ile oluşan ovulasyon inhibisyonu over kanserinden korumaktadır. Ters olarak ovulasyonu artıran nulliparite erken menarş, geç menapoz over kanseri riskini artırmaktadır (60,61). Buna karşın kronik anovulasyona neden olan polikistik over gibi hastalıklar over kanserinden korumamaktadır (62). Ek olarak CC gibi ovulasyon indüksiyon ajanlarının uzun süre kullanılması over kanseri riskinde artışa neden olmaktadır (63).

Gonadotropin hipotezine göre aşırı gonadotropin seviyeleri yüzey epiteline malign transformasyona neden olmaktadır (64). Bu teori KOK ların gonadotropinleri inhibisyonu üzerinden etkisini ve menapozdan sonra over kanseri riskinin artmasını açıklarken emzirme gibi FSH düzeylerini artırıp over kanseri riskini azaltan durumları açıklayamamaktadır (65,66).

Bir diğer teori hormonal hipotezdir ki, KOK'lardaki progesteronun over yüzey epiteline p53 tumor supressor gen ekspresyonunu indükleyerek apoptozisi indüklediği ve hücre proliferasyonunu engelleyerek over kanseri gelişimini azalttığı hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (2).

Rodriguez ve ark.'nın (67) 3 yıl boyunca dişi maymunlar üzerinde yaptığı; kontrol, sadece östrojen, östrojen + progesteron (levonorgestrel) verilen grupları kapsayan ve over kanseri üzerine koruyucu etkilerinin araştırıldığı randomize çalışmada kontrol ve östrojen grubunda over yüzey epiteli bazal tabaka üzerinde tek sıra izlenmiş ve apoptotik hücreler seyrek olarak görülmüştür. Bunun yanında östrojen + progesteron grubunda göze çarpan tipik morfolojik bulgular; over yüzeyinden yama şeklinde ayrılma eğilimi, seyrek stoplazmalı hücrelerin over yüzeyinden ayrılması olarak raporlanmış. İmmunohistokimyasal olarak apoptotik hücrelerin dramatik arttığı izlenmiştir. Bu da progestasyonel ajanın apoptozis oranını artırdığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda da kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm KOK gruplarında germinal epitelde bozulma bu çalışmaya benzer şekilde

belirgin olarak artmış bulundu. Morfolojik olarak epitelde benzer ayrılmalar izlendi. Rodrigez ve arkadaşlarının apoptozis göstergesi olarak kabul ettiği germinal epitel düzeyindeki bozulma bizim yaptığımız çalışmada da tüm KOK gruplarında tespit edilmiştir.

MikroRNA(miRNA)'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir. Bu protein kodlamayan RNA molekülleri kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirirler. miRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Yakın zamanda yapılan gen ekspresyon çalışmaları, kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonlarını gözler önüne sermiştir. Kanser başlangıcında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör süpresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler (17).

Kanserde değişen miRNA ekspresyonu tümör tanısında, hastalığa özgü prognoz ve tedaviye yanıtın moleküler biyomarkırları olarak kullanılabilir. Ayrıca, miRNA'lar gen tedavisinde özgül hedefler olarak seçilebilir (68).

Bir onkogen gibi fonksiyon gösterdiği tespit edilen mikroRNA lardan biri miR-21'dir. Mir-21'in AML, KLL ve glioblastoma gibi hematolojik malign'lerde ve solid tümörlerde, pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser türünde yüksek seviyede ekspresyonu gözlenmiştir. Mir-21, transkripsiyonel olarak Stat3 tarafından IL-6 sinyal yolağında aktif duruma geçmektedir (69). Mir-21, invazyon ve metastaz olaylarında çok iyi karakterize edilmiştir. Mir-21, hücre hareketini ve invazyonu, tümör süpresör bir protein olan PTEN'in mRNA'sını hedefleyerek teşvik etmektedir. PTEN, birkaç MMP (Matriks Metalloproteaz)'nin ekspresyonunu engelleyerek dolayısıyla hücre invazyonunu azaltarak tümör süpresör bir etki göstermektedir (70). Son zamanlarda, over kanserinde Mir-21'in, PDCD4'ü baskıladığı, bunun da invazyon ve metastaza ve kemoterapi rezistansına yol açtığı belirlenmiştir (71).

Onkogen olarak tanımlanan mir-21'in aynı zamanda ovulasyon süresince folikül gelişiminde rolü tanımlanmıştır. Fiedler ve ark. (72) folikulo luteal geçişte özellikle üç miRNA tanımlamışlardır bunlardan biri de mir 21 dir. Luteinizasyon sırasında mir- 21 yüksek seyretmektedir. Carletti ve ark.'nın (73) fare overinde yaptıkları çalışmada mir-21'in granuloza hücrelerinde ve over dokusunda antiapoptotik olduğunu, LH/HCG yanıtına bağlı olarak granuloza hücrelerinde eksprese olduğunu ve mir-21 azalmasının in vivo ovulasyon oranlarının azalmasıyla sonuçlandığını raporlamışlardır.

Dahiya ve ark. (74) farklı over kanseri dokusunda ve 10 over kanseri hücre kültürlerinde miRNA ekspresyon profilinin incelendiği çalışmada benzer çalışmaların aksine mir-21'in over kanseri dokularında anlamlı olarak downregule olduğu izlenmiş.

Onkogen olarak tanımlanmış bir diğer miRNA mir-494 tür. Tümör gelişiminde mir-494 meme kanseri, hepatosellüler kanser, akciğer kanseri hücre kültürlerinde proliferasyonu artırarak etki göstermektedir (75). Bu etkisini gösterdiği mekanizmalardan biri PTEN downregulasyonudur (76). Dahiya ve ark.'nın (74) yaptığı 34 over kanseri ve 10 over kanseri hücre kültürü üzerinde yaptığı çalışmada over kanseri hücre kültürlerinde mir-494 ekspresyonunda artış izlenmiştir.

Mir-191 bu güne kadar yaklaşık yirmiden fazla malignensi ile ilişkisinin saptanması nedeni ile mir 21 gibi kötü anılmaktadır. Over kanseri dahil 16 farklı kanser tipinde ekspresyonunun artması nedeniyle [meme(kadın), kolon, akciğer, karaciğer, prostat, pankreas, mide, hipofiz adenomu, özefagus skuamöz karsinom, oral skuamöz karsinom, osteosarkom, B ALL, mesane, anaplastik büyük hücreli lenfoma, akut myeloid lösemi] çoğunlukla onkogenik mir olarak adlandırılrsa da 6 diğer kanser tipleride (medulloblastom, retinoblastom, tiroid foliküler tümör, erkek meme kanseri, ALL ve melanom) downregule olduğu bilinmektedir (77).

Bizim çalışmamızda farklı KOK lar verilen tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre mir-21, mir-494, mir-191, ekspresyonu anlamlı yüksek bulundu. Onkogenik olarak anılan bu miRNA ların hepsinin anlamlı yüksek çıkması, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynayan bu RNA moleküllerinin farklı dokulardaki hedeflerine göre farklı görevler oynamalarından olabilir.

Mir-145 çeşitli kanserlerde sıklıkla down-regülatör olarak rapor edilmiştir ve genel bir tümör süpressör olarak görev yaptığı belirlenmiştir (78,79). miR-145 5. Kromozomun kısa kolunda lokalize(5q32) ve meme, kolon, akciğer, karaciğer, mesane, hipofiz bezi, B hücre, over ve prostat kanseri gibi çeşitli kanserlerde miktarının düştüğü bulunmuştur (80). Bu güne kadar, bir takım genler değişik kanser oluşturma yollarındaki hedef genler ile ilişkili olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle miR-145 tümör hücrelerinin büyümesinin süpresyonunu, hücre apoptozisini Fli1,IRS1,c-Myc ve DFF45 genlerini hedef alarak yapar. Buna ek olarak, miR-145 tümör migrasyonu, invazyonu ve metastazdaki yavaşlamayı ise mucin1, p70S6K1 ve NUDT1 genlerini hedefleyerek yapar (81,82,83). Bu veriler gösteriyor ki miR-145, tümörlerin başlama ve progresyonunda onkosüpressör olarak çalışmaktadır (84). Buna karşın başka bir çalışma zıt bir sonuç öne sürerek, metastatik kolorektal kanserlerde miR-145 'in onkogenik potansiyelinin olduğunu göstermiştir (85).

Bizim çalışmamızda farklı KOK lar verilen tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre mir-145 ekspresyonu anlamlı yüksek bulundu. Bu da KOK'ların over kanseri gelişimi üzerine önleyici etkisini desteklemektedir

Biz çalışmamızı over dokusundaki ekspresyonlarına göre dizayn ettik. Spesifik hüce kültürlerinde benzer çalışmaların yapılması KOK' ların hücre düzeyinde etkisinin anlaşılması konusuna ışık tutacaktır.

Kombine oral kontraseptifler (KOK) dünya genelinde en sık kullanılan hormonal kontrasepsiyon yöntemidir. Kontrasepsiyon etkisinin yanında siklus regulasyonu, dismenore, akne, premenstruel semptomlarını azaltma etkisinden de tıpta yararlanılmaktadır. Bunun yanında yardımcı üreme tekniklerinde over süpresyonu, kist formasyonunda azalma, oosit senkronizasyonu amaçlı çeşitli protokollerde kullanılmaktadır. Bu da KOK ların over rezervi ve mevcut rezerv testlerine etkisinin ne olduğu sorusunu akla getirmektedir.

KOK kullanımı sırasında FSH sekresyonu inhibe olur. Takiben HFI da tekrar siklus içi normal değerlere çok kısa bir süre içerisinde yükselir (86). Yaptığımız çalışmada bu hipotezi göz önüne alarak HFI'sız kontinyu 3 ay farklı KOK kullanıldı.

Reproduktif dönemin akıbetini belirleyen en önemli faktör olan yaş arttıkça folikül havuzundaki oosit kapasitesi de azalmaktadır. Overdeki primordial foliküllerin havuzu veya over rezervi, kalan oosit kalitesi ve sayısı ile bağlantılı

olarak bir kadının üreme potansiyelini tanımlar. Over rezervini değerlendirmek amacıyla klinik kullanım alanı bulan belirteçler FSH, E2, AMH ve inhibin-B, AFS, ovarian vaskülarite ve ovarian volum ölçümü, ayrıca CCCT, EFORT, GAST gibi provokatif testleri içermektedir (4). Bu testlerin her birinin kendine ait handikapları mevcuttur ve hiçbiri tek başına yeterli etkinlikte değildir.

Ancak KOK ile indüklenen hipofiz over baskılanmasının antral folikül sayısı ve AMH seviyesi ile yansıtılan over rezerv fonksiyonlarına etkisi henüz açık değildir (5).

Anti-mülleryan hormon; overyan granüloza hücrelerinden, preantral ve küçük antral folliküllerden, pitüiter FSH'nın etkisiyle dominant follikül için seçilebilecek büyüklüğe ve farklılaşmaya ulaşıncaya kadar sentezlenmektedir. İnsanlarda AMH 4-6 mm'den küçük çoğunlukla sonografik olarak ölçülemeyen preantral ve küçük antral folliküllerin granüloza hücrelerinden sentezlenmektedir (87). Her bir follikülden homojen olarak salgılandığından over rezervini göstermek için kullanılabilecek bir belirteç olarak kabul edilmiştir. AMH teka hücrelerinden ve atretik folliküllerden sentezlenmemektedir (38). AMH salınımının ekstra-ovaryan hormonal kontrolü yoktur. Transgenik ratlarda AMH heterozigot (-/+) olan ratlardaki AMH düzeyi, AMH (-/-) ve AMH (+/+) olan ratların AMH düzeyleri arasında saptanmıştır; bu nedenle AMH salınımının sadece mevcut gen aktivitesine bağlı olduğu, diğer hormonal uyarıların salınması üzerine etkisi olmadığı sonucu çıkartılmıştır (88). Anti-mülleryan hormonlarının hormonal uyarılardan etkilanmemesi overyan rezervin değerlendirilmesinde diğer hormonal parametrelere göre AMH'ya avantaj sağlamaktadır. AMH'nın AFS'ye göre diğer bir avantajı da gözlemciye bağlı olmaması ve dolayısıyla hekimden hekime değişiklik göstermemesidir. AFS özellikle OKS ile baskılanmış hastalarda tam değerlendirilememekte; bu da klinik olarak bazı hastalarda over rezervi hakkında net bir değerlendirme yapmayı güçleştirmektedir.

Son çalışmalarda preantral, geç pre-antral ve preovulatuvar folliküllerde AMH mRNA seviyelerinin oositin gelişim evreleriyle paralel olarak düzenlendiği, AMH'nın intra ve inter-folliküler koordinasyonda önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (39). AMH sentezini düzenleyen mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber granüloza hücreleri üzerinde AMH reseptörleri tespit edilmesi

overyan fizyolojide rolü olduğunu düşündürmektedir (40). AMH etkilerinin direk primordial hücreler üzerinden olup olmadığını göstermek için yapılan bir çalışmada, AMH bulunmayan rat overini AMH bulunan yapay ortama bıraktıktan iki gün sonra yapılan incelemede büyüyen follikül sayısının %50 azaldığı, AMH'nın primordial oositleri direk olarak etkilediği gözlenmiş ve AMH'nın primordial follikül gelişiminin aktivasyonunu ve preantral folliküllerin büyümesini azalttığı sonucu çıkarılmıştır (42). İn vivo ve in vitro çalışmalar AMH eksikliğinde folliküllerin FSH'ya daha duyarlı olduğunu göstermektedir. AMH'dan yoksun farelerde düşük ve yüksek FSH konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda, AMH mevcut farelerle karşılaştırıldığında, hem sayısal hem de gelişimsel olarak daha iyi yanıt alınmış olduğu gözlenmiştir (43).

Clemente ve ark. (44) ekzojen AMH'nın kültür ortamında granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini ve LH reseptör sayısını azalttığını göstermişlerdir .Bu çalışmalara bakarak AMH'nın overyan folliküllerin FSH'ya verdiği yanıtı belirleyen faktörlerden birisi olduğu sonucu çıkarılmıştır.

Başka bir çalışmada AMH'nın farelerde 1.mayoz bölünmeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (45). AMH, insan granüloza-luteal hücrelerin proliferasyonunu bloke etmekte ve folliküler sıvıdaki konsantrasyonu granüloza hücrelerindeki mitoz indeksi ile tersorantı göstermektedir (46).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda hormonal kontraseptif kullananlarda ovarian volum ve AFS nin azaldığı konusunda fikir birliği olmasına karşın serum AMH değerleri üzerine etkisi konusunda çeşitli sonuçlar bildirilmiştir. Van den Berg ve ark.'nın (89) yaptığı bir çalışmada bir ay boyunca KOK kullanımı sonrası endokrin (AMH; FSH) ve TVUSG(AFS, overyan volum) bulguları ile bir sonraki siklusün erken foliküler fazında bakılan bulguları arasında fark izlememiştir. Arbo ve ark.'nın (90) 20 kadını içeren çalışmasında bir ay boyunca KOK kullanılan siklusun luteal fazındaki AMH değerinin takip eden KOK kullanılmayan siklusun foliküler fazından daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da AMH düzeyinde tüm deney gruplarında kontrole kıyaslandığında anlamlı farklılık izlenmedi.

Steiner ve ark. (91) 2 siklus KOK verdikleri normal ve obez kadınları kıyasladığı çalışmada HFI da bakılan AMH değerlerinde anlamlı fark bulmazken obez hastalarda anlamlı derecede düşük olduğunu raporlamışlardır.

Deb ve ark.'nın (92) yaptığı bir prospektif vaka kontrol çalışmasında 1 yıldan fazla KOK kullanan 34 katılımcı ve 1 yıldan az KOK kullanan 36 kadın arasında 6 mm'nin üzerindeki antral folikül sayısı KOK kullananlarda anlamlı olarak azalmış, serum AMH düzeyi ve küçük antral folikül (2-6 mm) sayısında ise anlamlı farklılık izlenmemiştir. Buna karşılık 208 KOK kullanan hasta grubu ile 504 KOK kullanmayan hasta grubunun kıyaslandığı çalışmada KOK kullananlarda serum AMH düzeyi, tüm boyutlardaki AFS ve over volümünde anlamlı azalma izlenmiştir(93). 180 KOK kullanan hastanın 76 kullanmayanla kıyaslandığı çalışmada KOK kullananlarda serum AMH düzeyinin düşük olduğu bulunmuştur (94).

Li ve ark.'nın (95) yaptığı bir çalışmada, farklı hormonal kontraseptif yöntemleri kullanılmış, hormonal tedavi öncesi ve hormonal tedavi bitimi AMH değerleri karşılaştırılmıştır. KOK kullanan hasta grubunda AMH düzeyi anlamlı derecede azalırken KOK dışındaki hormonal kontraseptif yöntem kullanan hastalarda ise AMH seviyesinde anlamlı farklılık izlenmemiştir.

Bizim farklı KOK' lar kullandığımız deneysel çalışmada Yasmin ile kontrol grubu arasında AMH düzeylerinde fark izlenmezken Diane 35, Ginera, Microgynon gruplarının da kontrol grubuna göre, AMH düzeyinde azalma izlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu da AMH'nin oral kontraseptif kullananlarda güvenilir bir over rezerv belirteci olduğunu gösterse de daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sapmaz ve ark.'nın (96) adezyonu önleme üzerine yaptıkları deneysel çalışmada seprafilm interceedden daha etkili bulunurken insanlarda seprafilm'in adezyonu önlemesi hakkında yeterli delil bulunmamıştır (97). Yine Fail ve ark.'nın (98) yaptığı hayvan deneyinde sterilizasyon amacıyla eritromisin kullanılmış ve hayvan çalışmalarında eritromisin etkili bulunmuştur. Ancak insanlarda sterilizasyon amaçlı kullanımı aynı başarıyı göstermemiştir (99). Bu tür çalışmalara da dayanarak türler arası farklılık göz önünde bulundurulmalıdır.

5. KAYNAKLAR

1. Mishell DR, Jr., Kletzky OA, Brenner PF, Roy S, Nicoloff J. The effect of contraceptive steroids on hypothalamic-pituitary function. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 128: 60–74.
2. Murdoch WJ, Van Kirk EA. Steroid hormonal regulation of proliferative, p53 tumor suppressor, and apoptotic responses of sheep ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:61–67.
3. Byskov AG. Follicular atresia. In: Jones R (ed.), *The Vertebrate Ovary*. New York: Plenum Press; 1978: 533–562
4. Sills ES, Alper MM, Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 30-6
5. Jayaprakasan K, Deb S, Batcha M, Hopkisson J, Johnson I, Campbell B, Raine-Fenning N. The cohort of antral follicles measuring 2–6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Mullerian hormone. and response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2010; 94: 1775–1781
6. Speroff L, Fritz MA. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 8. edition Lippincott Williams & Wilkins; 2011
7. Hatch RA. *Contraseptive Technology* 16th revised edition. Newyork; Irrington Publishers 1994
8. Özkan SÖ. Oral Kontrasepsiyon. Ahmet Erk, Serdar Günalp. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve infertilite*, 7. Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, 2007: 861-942.

9. Oelkers W. Drospirenone, a progestogen with antimineralocorticoid properties: a short review. *Mol Cell Endocrinol* 2004 Mar 31;217:255-61.
10. Sitruk-Ware R. Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 2008;61:151-7.
11. World Health Organization. Improving access to quality care in family planning: Medical eligibility criteria for contraceptive use 2001; Geneva: World Health Organization; 2001
12. Rosenberg MJ, Waugh MS, Burnhill MS. Compliance, counseling and satisfaction with oral contraceptives: a prospective evaluation. *Fam Plann Perspect* 1998;30:89-92.
13. Gürbay A, Giray B, Hıncal F. Kombine oral kontraseptifler: riskleri ve yararları. Combined oral contraceptives: risks and benefits. *T Klin Tıp Bilimleri* 1997, 17:1-14.
14. Burkman R, Schlesselman JJ, Zieman M. Safety concerns and health benefits associated with oral contraception. *Am J Obstet Gynecol* 2004 ;190:5-22.
15. Schlesselman J, Collins J. The influence of steroids on gynecologic cancers. In: Fraser ISJR, Lobo RA, Whitehead MI, editors. *Estrogens and progestogens in clinical practice*. London: Churchill Livingstone; 1998;82:831 – 64.
16. Rooks JB, Ory HW, Ishak KG, Strauss LT, Greenspan JR, Hill AP, et al. Epidemiology of hepatocellular adenoma. The role of oral contraceptive use. *JAMA* 1979;242:644-8.
17. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş VH. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011;38:113-20.

18. Konaç E, Önen Hİ, Sözen S. Üroonkolojide MikroRNA (miRNA)'ların yeri ve önemi. Üroonkoloji Bülteni 2010; 1: 3-13.
19. Bodur E, Demirpençe E. Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu.Hacettepe Tıp Dergisi 2010; 41: 82-89
20. Tuğ E, Erol D, Yüce H. MikroRNA'lar ve İnsan Hastalıkları. Abant İzzet Baysal Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 24-28
21. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. Hum Reprod Update. 2012 ;18:73-91
22. Fukuda M, Fukuda K, Andersen CYD, Byskov AG. Does anovulation induced by oral contraceptives favor pregnancy during the following two menstrual cycles?. Fertility and Sterility 2000;73:742-7.
23. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Human Reprod 1986;1; 81 - 87 .
24. Çiçek N M, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi, Güneş Kitabevi, 2. Baskı, 2006;1413-1435, 101-107, 1301-1332.
25. Licciardi FL, Hung- Ching L, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in-vitro fertilization. Fertil Steril. 1992; 64:991-994.
26. Buyalos RP, Daneshmand S, Brzechffa PR. Basal estradiol and follicle-stimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy. Fertil Steril. 1997; 68:272-277.

27. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1995; 64:1136-40.
28. Soules MR, Battaglia DE, Klein NA. Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas*. 1998; 30:193-204.
29. Danforth DR, Arbogast LK, Mroueh J. Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil Steril*. 1998;70:119-23.
30. Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon indüksiyonu. İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri ve Reprodüktif Endokrinoloji Merkezi, 2000
31. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvajinal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 1999;72:845–851.
32. Hansen KR, Morris JL, Thyer AC, Soules MR. Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting. *Fertil Steril* 2003;80:577–583.
33. Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R. Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2004;19:1055– 1059.
34. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing bazal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328–336.

35. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685–698.
36. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P. AMH (MIS); what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003;15:21–31.
37. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994; 79:415–425.
38. Rajpert-De Meyts, E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of sertoli and granulosa cells. *J ClinEndocMetabol* 1999; 84:3836–3844.
39. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Developmental Biology* 2004;266:201–208.
40. Josso N, di Clemente N, Gouedard L. Anti-müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:25–32.
41. Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, et al. Autocrine and paracrine müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:53–67.
42. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002;143:1076–1084.

43. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891–4899.
44. Clemente N, Goxe B, Rémy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B, et al. Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 1994;2:553–558.
45. Tsafiriri A, Picard JY, Josso N. Immunopurified anti-müllerian hormone does not inhibit spontaneous resumption of meiosis in vitro of rat oocytes. *Biol Reprod* 1988;38:481–485.
46. Seifer DB, MacLaughlin DT, Penzias AS, Behrman HR, Asmundson L, Donahoe PK, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid müllerian-inhibiting substance and androgen content. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:711–714.
47. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, et al. Müllerian inhibiting substance in humans: Normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:571–576.
48. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000;73:859–861.
49. La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al. Anti-müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12:545–548.
50. de Vet A, Loven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77: 357–362.

51. Van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Schefferde GJ, Jong FH. Anti-müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004;11:601–606.
52. Richardson SJ, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition. *Ann N Y Acad Sci* 1990;592: 13–20.
53. La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V, Volpe A. Anti-müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod* 2005;20: 1569–1572.
54. Lane AH, Lee MM, Fuller AF, Jr Kehas DJ, Donahoe PK, MacLaughlin DT. Diagnostic utility of Müllerian inhibiting substance determination in patients with primary and recurrent granulosa cell tumors. *Gynecologic Oncology* 1999;73:51–55.
55. Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, et al. Detection of minimal levels of serum anti-müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:540–544.
56. Kuhl H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* 2005;8:3–63.
57. Barad DH, Kimm A, Weghofer A. Does hormonal contraception prior to in vitro fertilization (IVF) negatively affect oocyte yields? - A pilot study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013, 11:28
58. Rosenbaum P, Schmidt W, Helmerhorst FM, Wuttke W, Rossmanith W, Freundl F, Thomas K, Grillo M, Wolf A, Heithecker R: Inhibition of

ovulation by a novel progestogen (drospirenone) alone or in combination with ethinylestradiol. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2000, 5:16–24.

59. Rosenberg L, Palmer JR, Zauberg AG, Warshauer ME, Lewis JL, Strom BL et al. A case-control study of oral contraceptive use and invasive epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 1994; 139:654 - 61.
60. Whittenrore AS, Ham's R, Itnyre J, the Collaborative Ovarian Cancer Group Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case-control studies. *Am J Epidemiol* 1992;136: 121 2-2.
61. Greer JB, Modugno F, Allen GO, Ness RB. Short-term oral contraceptive use and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 2005; 162:66–72.
62. Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, Evanoff A, Hughes C. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1996;88:554–559.
63. Rossing MA, DalingJR, Weiss NS, Mooie DE, Self SG. Ovarian cancer in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994;331:771- 6.
64. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:717–721.
65. Spona J, Elstein M, Feichtinger W, Sullivan H, Ludicke F, Muller U, Dusterberg B. Shorter pill-free interval in combined oral contraceptives decreases follicular development. *Contraception* 1996;54:71–77.
66. Anderson GL, Judd HL, Kaunitz AM, Barad DH, Beresford SA, Pettinger M, Liu J, McNeeley SG, Lopez AM. Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial. *J Am Med Assoc* 2003;290:1739–1748 .

67. Rodriguez GC, Walmer DK, Cline M et al. Effect of Progestin on the Ovarian Epithelium of Macaques: Cancer Prevention Through Apoptosis? *J Soc Gynecol Invest* 1998;5; 271-6.
68. Zamani AG, Zamani A. MikroRNA'lar ve akciğer kanseri. *Tuberk Toraks* 2013; 61: 57-62.
69. Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermüller J, Kretzschmar AK et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 2007;110:1330–1333.
70. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647–658.
71. Chan JK, Blansit K, Kiet T. The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2014;132 ;739–744.
72. Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X & Christenson LK Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biology of Reproduction* 2008,79: 1030–1037.
73. Carletti MZ, Fiedler SD & Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. *Biology of Reproduction* 2010 ;83 :286–295.
74. Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, Davidson B, Shih leM ,Zhang Y et al. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One* 2008;18;3.

75. Romano G, Acunzo M, Garofalo M, Di Leva G, Cascione L, Zanca C, et al. MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:16570- 75.
76. Liu L, Jiang Y, Zhang H, Greenlee AR, Han Z. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)-pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Life Sci* 2010;86:192-198.
77. Nagpal N, Kulshreshtha R. Mir-191: an emerging player in disease biology. *Frontiers* 2014;99:1-10.
78. Clape C, Fritz V, Henriquet C, Apparailly F, Fernandez PL, Ibbora F et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS One* 2009;4:7542.
79. Puerta-Gil P, Garcia-Baquero R, Jia AY, Ocana S, Alvarez-Ossorio JL et al. miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Am J Pathol* 2012;180:1808-15.
80. Zhu X, Li Y, Xie C, Yin X, Liu Y, Cao Y et al. miR-145 sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel by targeting Sp1 and Cdk6. *Int J Cancer*. 2014; 8.
81. Zhang J, Guo H, Zhang H, Wang H, Qian G, Fan X et al. Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer* 2011;117:86–95.
82. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3207–12

83. Zhang J, Guo H, Qian G, et al. MiR-145, a new regulator of the DNA fragmentation factor-45 (DFF45)-mediated apoptotic network. *Mol Cancer* 2010;9:211
84. Sachdeva M, Mo YY. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res* 2010;70:378–87
85. Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009;9:374.
86. Andersen AN, Witjes H, Gordon K, Mannaerts B. Predictive factors of ovarian response and clinical outcome after IVF/ICSI following a rFSH/GnRH antagonist protocol with or without oral contraceptive pre-treatment. *Hum. Reprod.* 2011;26; 3413–3423
87. Hugues J, Torresani T, Herve F, Martin-Pont B, Tamboise A, Santarelli J. Interest of growth hormone-releasing hormone administration for improvement of ovarian responsiveness to gonadotropins in poor responder women. *Fertil Steril* 1991;55:945–951
88. Scott R, Navot D. Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonists during ovulation induction for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1994;61:880 –885).
89. van den Berg MH, van Dulmen-den Broeder E, Overbeek A, Twisk JW, Schats R, van Leeuwen FE, Kaspers GJ, Lambalk CB. Comparison of ovarian function markers in users of hormonal contraceptives during the hormone-free interval and subsequent natural early follicular phases. *Hum Reprod* 2010; 25: 1520–1527.

90. Arbo E, Vetori DV, Jimenez MF, Freitas FM, Lemos N, Cunha-Filho JS. Serum anti-mullerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills. *Hum Reprod* 2007;22:3192–6.
91. Deb S, Campbell B, Allen C, Clewes J, Cumberpatch G, Fenning N. Quantifying effect of combined oral contraceptive pill on functional ovarian reserve as measured by serum anti-Mullerian hormone and small antral follicle count using three-dimensional ultrasound *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 39: 574–80
92. Steiner AZ, Stanczyk FZ, Patel S, Edelman A. Antimüllerian hormone and obesity: insights in oral contraceptive users. *Contraception* 2010 ;81:245–8
93. Bentzen JG, Forman JL, Pinborg A, Lidegaard Q, Larsen EC, Hansen LF. Ovarian reserve parameters: a comparison between users and non-users of hormonal contraception *Reprod Biomed Online*. 2012 :532-9
94. Kristensen S, Hansen C, Andersen C, Ernst E, Olsen SF, Bonde JP et al. The association between circulating levels of antimüllerian hormone and follicle number, androgens, and menstrual cycle characteristics in young women *Fertility and Sterility*. *Fertil Steril* 2012; 97: 779-785
95. Li HWR, Wong CYG, Yeung WSB, Ho PC, Ng EHY. Serum anti-müllerian hormone level is not altered in women using hormonal contraceptive. *Contraception* 2011: 83;582–585
96. Sapmaz E, Çelik E, İlhan N, Gürateş B, Atılgan R, Özcan Z. Ratlarda Adezyonu Önlemek İçin Kullanılmış Beş Etken Maddenin İncelenmesi. *Türk Fertilite Dergisi* 2004;12;303-7

97. Farquhar C, Vandekerckhove P, Watson A, Vail A, Wiseman D. Barrier agents for preventing adhesions after surgery for subfertility. Cochrane Database Syst Rev 2000;CD000475
98. Fail PA, Martin P, Sokal D. Comparative effects of quinacrine and erythromycin in adult female rats: a nonsurgical sterilization study. Fertil Steril 2000; 73: 387-94.
99. Bairagy NR, Mullick BC. Use of erythromycin for nonsurgical female sterilization in West Bengal, India: a study of 790 cases. Contraception 2004; 69: 47-9

6.ÖZGEÇMİŞ

1985 yılı Elazığ doğumluyum. 1996 yılında Namık Kemal İlkokulu'ndan mezun olduktan sonra ortaokul ve lise öğrenim hayatıma Elazığ Anadolu Lisesi'nde devam ettim. 2003 yılında Elazığ Anadolu Lisesinden mezun oldum. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitimime başladım ve 2009 yılında mezun oldum. 2009 yılında kısa bir süre Mardin ili Midyat ilçesinde pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde asistanlığa başladım ve halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.