

FERIDE ÖZDEMİR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2022

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**“ OVARYAN HİPERSTİMÜLASYONLU SIÇANLARDA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OVARYUM
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELENMESİ ”**

FERİDE ÖZDEMİR

**DANIŞMAN
PROF.DR. SİBEL KÖKTÜRK**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Canım annem Gülizar KARAHAN'a ve bu süreçte kaybettiğim, belki de dünyanın en naif ruhu, canım babaannem Fatma KARAHAN'a ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında aldığım doktora eğitiminin her aşamasında destek ve örnek olan, değerli bilgileriyle bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Sibel KÖKTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin başından beri bana her türlü bilgi ve desteği sağlayan İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hoca, Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na,

Doktora eğitimimin boyunca sağladığı katkı ve desteklerinden dolayı tez izleme komitesinin değerli üyesi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK'e

Tezimin tamamlanma sürecindeki destekleri için Dr. Öğr. Üyesi Tuba EKİZ YILMAZ'a, Doç. Dr. Tuğba KOTİL'e, Dr. Öğr. Üyesi Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ'ye

Birlikte çalışmanın ne kadar değerli olduğunu gösteren, hem akademik hem de manevi anlamda doktora eğitimimin her aşamasında bütün tecrübeleriyle yanımda olan, çok değerli arkadaşlarım Biyolog Sibel DOĞAN'a, Araş. Gör. Dr. Emel USTA'ya, Biyolog İlkey ÖZDEMİR'e,

Bu süreçte yolumun iyi ki kesiştiği her zaman desteklerini çok içten hisettiğim Uzm. Dr. Fatma Nur KARAKUŞ'a, Araş. Gör. Dr. Aslı ERDOĞAN'a

Doktora başvuru sürecinden bu yana beni destekleyen, cesaretlendiren ve umutsuzluğa kapıldığım her anda sabırla yanımda olan eşim Nurettin ÖZDEMİR'e

Elektron mikroskop uygulamalarında desteklerini ve tecrübelerini esirgemeyen Biyolog Funda ONAR'a, Biyolog Ebru KARABULUT AKYÖN'e, Biyolog Fadime AKTAR'a ve iyiki yolum burdan geçmiş dediğim İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ailesinin tüm üyelerine çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34798

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryum	3
2.1.1. Ovaryum Histolojisi.....	3
2.1.2. Folikül Gelişimi	3
2.1.2.1. Primordial Folikül	4
2.1.2.2. Primer Folikül	5
2.1.2.3. Sekonder Folikül	5
2.1.2.4. Tersiyer (Graaf) Folikül	6
2.1.3. Ovulasyon ve Korpus Luteum	6
2.1.4. Foliküler Atrezi	8
2.2. Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu	8
2.2.1. Genel Tanımlama.....	8
2.2.2. Patogeneze	9
2.2.2.1. VEGF	9
2.2.2.2. İnterlökin-6.....	10
2.2.2.3. Estradiol	10
2.3. Mezenkimal Kök Hücreler.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Hücre Kültürü Protokolü.....	14
3.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu	14
3.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hoescht 3342 İle İşaretlenmesi	14

3.2. Hayvan Deneyleri Protokolü.....	15
3.2.1. Deney Gruplarının ve OHSS Modelinin Oluşturulması	15
3.2.2. Işık Mikroskobu Analizleri	17
3.2.2.1. Hematoksilen Eozin Boyası	17
3.2.2.2. VEGF İmmünohistokimya Boyama.....	17
3.2.2.3. Hoescht 3342 İmmünoflorsan analizi.....	18
3.2.3. Elektron Mikroskobu Analizi.....	18
3.2.4. Hormon ve Sitokin Analizi	19
3.2.4.1. Estradiol Analizi.....	19
3.2.4.2. IL-6 Analizi	19
3.3. İstatistik Analizleri.....	20
3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler, ve Cihazlar.....	20
3.4.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	20
3.4.2. Cihazlar	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Florasan Mikroskopi Bulguları	22
4.2. Hayvan ve Ovaryum Dokusu Ağırlık Verileri.....	26
4.3. Işık Mikroskopi Bulguları.....	28
4.3.1. Hematoksilen Eozin Boyası	28
4.3.2. VEGF İmmünohistokimyasal Boyama	39
4.3.3. Folikül Sayımı Sonuçları	44
4.4. Elektron Mikroskopi Bulguları	45
4.5. Estradiol ve IL-6 ELISA Sonuçları.....	50
5. TARTIŞMA	52
6. KAYNAKLAR	60
7. HAM VERİLER	68
8. FORMLAR	70
9. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	71

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Kontrol, MKH, OHSS ve OHSS+MKH gruplarının, ImageJ görüntü analiz programı kullanılarak, VEGF immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren tablo görülmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar * işareti, OHSS grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar # işareti ile belirtilmiştir ($p < 0,001$).....	44
Tablo 4-2 : Deney gruplarına ait ovaryum folikül sayıları. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. (n=6), F: folikül. ^a $p < 0,0001$, ^b $p > 0.05$, ^c $p \leq 0.05$ Kontrol grubuna göre, ^d $p > 0.05$ OHSS grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir (n=6).....	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1: OHSS deney modeli ve MKH uygulaması akış şeması	16
Şekil 4-1: Transplantasyon öncesi Hoescht 3342 ile işaretlenen MKH hücrelerinin florasan mikrografi, Bar 50 µm.	22
Şekil 4-2: Kontrol grubu vasküler alan florasan mikrografi. Bar 25 µm.....	23
Şekil 4-3: OHSS grubu, vasküler alan florasan mikroskopi fotoğrafı. Bar 25 µm.....	24
Şekil 4-4: OHSS+MKH grubu vasküler alan florasan mikrografi. Bar 25 µm	25
Şekil 4-5: MKH grubu vasküler alan florasan mikrografi. Bar 25 µm.....	26
Şekil 4-6: Deney hayvanlarına ait ağırlık değişim grafikleri. A- ilk ağırlık grafiği $p > 0.05$ tüm gruplara göre , B- son ağırlık grafiği $p^a \leq 0.01$, $p^b \leq 0.05$; Kontrol grubuna göre, $p^c > 0.05$; OHSS grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi (n=6).....	27
Şekil 4-7: Ovaryum ağırlık grafiği. $p^a \leq 0.05$ kontrol grubuna göre, $p^b > 0.05$ OHSS grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi (n=6).....	28
Şekil 4-8: Kontrol grubu, ovaryum dokusu ışık mikrografi. Graff folikülü (kalın ok), sekonder folikül (asteriks), multilaminar primer folikül (ok başı) germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 100 µm.....	29
Şekil 4-9: MKH grubu, ovaryum dokusu ışık mikrografi. Graff folikül (beyaz ok), Sekonder folikül (asteriks), multilaminar primer folikül (kalın ok), unilaminar primer folikül (ok başı) germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 100 µm.....	30
Şekil 4-10: OHSS grubu ovaryum dokusu ışık mikrografi. Korpus luteum (asteriks) medulla (M), sekonder folikül (kalın ok), germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 200 µm.	31
Şekil 4-11: OHSS grubu ışık mikrografi. Korpus luteum (asteriks), Hemorajik alanlar (HA). H&E, Bar 100 µm.....	32
Şekil 4-12: OHSS grubu ışık mikrografi. Hemorajik alanlar (HA, oklar). H&E, Bar 50 µm.	33
Şekil 4-13: OHSS grubu ışık mikrografi. İntertistiyal alanlarda ödem. H&E, Bar 20 µm.	34
Şekil 4-14: OHSS grubu ışık mikrografi. A- Kortekste vasküler dilatasyon ve korpus luteum yapıları 100 Bar µm. B- Vasküler dilatasyonun büyük büyütmede gösterimi. H&E, Bar 20 µm.	35

Şekil 4-15: OHSS grubu ışık mikrofrafı. Medullada vasküler dilatasyon. H&E, Bar 200 µm.	36
Şekil 4-16: OHSS grubu ışık mikrofrafı. Atretik foliküller; folikül sıvısı içerisinde apoptoza uğramış granüloza hücreleri ve hemorajik alanlar. H&E, Bar 100 µm.....	37
Şekil 4-17: OHSS+MKH grubu ovaryum dokusu ışık mikrofrafı. Sekonder folikül (siyah asteriks), multilaminar primer folikül (beyaz ok), unilaminar primer folikül (kalın ok), primordial folikül (ok başı), korpus luteum (beyaz asteriks), germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 100 µm.....	38
Şekil 4-18: OHSS+MKH grubu ovaryum dokusu ışık mikrofrafı. Korteks, hemorajik alanlarda azalma (asteriks).....	39
Şekil 4-19: Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikrofrafı görülmektedir. Oosit (O), granüloza hücreleri (GC) ve zona pellusida okbaşı ile gösterilmiştir. Bar 40 µm.	40
Şekil 4-20: MKH grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikrofrafı görülmektedir. Oosit (O), granüloza hücreleri (GC) ve zona pellusida okbaşı ile gösterilmiştir. Bar 40 µm.	41
Şekil 4-21: OHSS grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikrofrafı görülmektedir. Oosit (O), granüloza hücreleri (GC) ve zona pellusida okbaşı ile gösterilmiştir. Bar 40 µm.	42
Şekil 4-22: OHSS+MKH grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikrofrafı görülmektedir. Oosit (O) ve granüloza hücreleri (GC) gösterilmiştir. Bar 40 µm.	43
Şekil 4-23: Kontrol grubuna ait elektron mikrofrafında oosit (O), zona pellusida (ZP), ve kare ile işaretlenen alanda inceleme için seçilen granüloza hücresi görülmektedir. Bar 10 µm.	46
Şekil 4-24: Kontrol grubuna ait granüloza hücresinin elektron mikrofrafı görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), mitokondri (M) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.	47
Şekil 4-25: MKH grubuna ait granüloza hücresinin elektron mikrofrafı görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), mitokondri (M) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.	48

Şekil 4-26: OHSS grubuna ait granüloza hücrenin elektron mikrofrafı görölmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), vakuol (V) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.	49
Şekil 4-27: OHSS+MKH grubuna ait granüloza hücrenin elektron mikrofrafı görölmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), vakuol (V) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.	50
Şekil 4-28: A- Estradiol ELISA kiti absorbans/konsantrasyon grafiğı. B- Gruplara ait ortalama serum Estradiol seviyeleri, ^a p < 0,001, Kontrol ve OHSS+MKH gruplarına göre, ^b p < 0.05, MKH grubuna göre. Analiz verileri ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir (n=6)	51
Şekil 4-29: A- IL-6 ELISA kiti absorbans/konsantrasyon grafiğı. B- Gruplara ait ortalama serum IL-6 seviyeleri, ^a p < 0.05 Kontrol, MKH ve OHSS+MKH gruplarına göre. Analiz verileri ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir (n=6).	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

bFGF	:	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
cAMP	:	Siklik Adenozin Monofosfat
CYP19A1	:	Sitokrom P450 Ailesi 19 Alt ailesi A üyesi
CD	:	Yüzey Farklılaşma Antijenleri
CFTR	:	Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
CXCR4	:	Kemokin Reseptörü 4
CMF-PBS	:	Kalsiyum ve Magnezyum İçermeyen Fosfat Tamponu
DMEM-F12	:	Dulbecco Modifiye Edilmiş Eagle ve Besleyici F12 ham medyum
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
E2	:	Serum 17 β -estradiol
ELISA	:	Enzim Bağlı İmmünoresorbent Analiz
FCS	:	Fetal Sığır Serum
FSH	:	Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
gp130	:	Transmembran Glikoprotein 130
HGF	:	Hepatosit Büyüme Faktörü
hCG	:	Human Koryonik Gonadotropin
IGF-1	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IVF	:	İn Vitro Fertilizasyon
İGK	:	İnsan Göbek Kordonu
JAK	:	Janus Kinaz
LH	:	Lüteinizan Hormon
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR2	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IDO	:	İndoleamin 2,3-Dioksijenaz
IL	:	İnterlökin
IL-6Ra	:	İnterlökin -6 Reseptörü - α

IFN- γ	: İnterferon - γ
Kİ	: Kemik İliği
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktörü
MAPK	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MHC	: Temel Doku Uyumluluk Kompleksi
MIP-L α/β	: Makrofaj İnflamatuvar Protein Alfa/ Beta
MKH	: Mezenkimal Kök Hücreler
MPF	: Maturasyon İlerletici Faktör
NO	: Nitrik Oksit Sentaz
OHSS	: Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu
OMI	: Oosit Olgunlaşmasını Baskılayıcı Madde
P4	: Progesteron
PEDF	: Pigment Epitel Kaynaklı Faktör
PGE2	: Prostaglandin E2
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
POF	: Prematüre Ovaryan Yetmezlik
PKOS	: Polikistik Over Sendromu
SDF-1	: Stromal Kaynaklı Faktör-1 Aktivatörü
Sil-6R α	: Çözünür İnterlökin -6 Reseptörü - α
STAT	: Sinyal Dönüştürücü Transkripsiyon
SU5416	: Semaxanib
TGF- β 1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü β 1
Th1	: Yardımcı Thücreleri 1
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör- α

ÖZET

Özdemir F. Ovaryan Hiperstimülasyonlu Sıçanlarda Mezenkimal Kök Hücrelerin Ovaryum Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul. 2022.

Ovaryum hiperstimülasyon sendromu (OHSS) yardımcı üreme tedavileri sırasında ovulasyon indüksiyonu için yapılan gonodotropin uygulamaları sonucu gelişen ciddi bir iatrojenik komplikasyondur. Eksojen gonodotropin uygulamaları ovaryumlardan salınan vazoaktif ve inflamatuvar sitokin seviyelerini artırarak vasküler permeabilitede artışa neden olmaktadır. Artan vasküler permeabiliteyle birlikte üçüncü boşluklarda sıvı birikimi, ödem, asit, hipovolemi, akut respiratuvar distres sendromu gibi yaşamı tehdit eden durumlar ortaya çıkabilmektedir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) anti-inflamatuvar, immunmodulator, antioksidan ve antiapoptotik etkileri birçok çalışma ile gösterilmiş multipotent hücrelerdir.

Bu çalışmada; OHSS modeli oluşturulmuş Wistar Albino cinsi ratlarda insan göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin terapötik etkileri incelendi. Bu amaçla, hoescht 3342 boyası ile DNA işaretlemesi yapılan MKH'ler intraperitoneal olarak hayvanlara enjekte edildi. Sakrifikasyonun ardından ovaryum dokuları ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerle histopatolojik olarak değerlendirildi. Alınan serum örneklerinde estradiol (E2) ve IL-6 seviyeleri analiz edildi.

OHSS grubunda; hemorajik alanlar, vasküler dilatasyonlar ve ödem belirgindi. Kortekste gelişen tüm folikül tiplerinde kontrol grubuna kıyasla bir azalma gözlenirken atretik foliküllerde ve korpus luteum yapılarında anlamlı bir artış izlendi. Serum E2, IL-6 düzeylerinin ve VEGF immünoaktivitesinin OHSS grubunda anlamlı derecede arttığı tespit edildi. MKH uygulaması ile birlikte OHSS grubunda oluşan, ödem, hemorajik alanlar ve vasküler dilatasyonlarda azalma gözlemlendi. MKH'lerin folikül, korpus luteum sayıları üzerinde istatistiksel olarak olmasa da hafif iyileştirici etki gösterdiği izlenirken serum estradiol, IL-6 seviyeleri ve VEGF immünoaktivitesi üzerinde anlamlı bir azalışa neden olarak terapötik etki gösterdiği tespit edildi. Elektron mikroskopik analizlerle ultrastrüktürel değişiklikler değerlendirildi.

Bu sonuçlar, MKH'lerin OHSS patogenezi üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, MKH'lerin OHSS tedavisinde alternatif bir farmakolojik ajan olarak kullanılabilmesi için daha kapsamlı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : OHSS, Mezenkimal Kök Hücre, İnsan Göbek Kordonu, VEGF, IL-6

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34798

ABSTRACT

Ozdemir F. Immunohistochemical and Electron Microscopic Investigation of the Effects of Mesenchymal Stem Cells on the Ovary in Rats with Ovarian Hyperstimulation Syndrome. Istanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Programme. PhD Thesis. İstanbul. 2022

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is a serious iatrogenic complication that develops as a result of gonadotropin administrations for ovulation induction during assisted reproductive treatments. Exogenous gonadotropin administrations cause an increase in vascular permeability by increasing the levels of vasoactive and inflammatory cytokines secreted from the ovaries. Fluid shift to the third space via increased vascular permeability, so life-threatening conditions such as edema, ascites, hypovolemia, and acute respiratory distress syndrome can be observed. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells whose anti-inflammatory, immunomodulatory, antioxidant, and antiapoptotic effects have been shown in many studies.

In this study; the therapeutic effects of human umbilical cord-derived MSCs in an experimental OHSS rat model were investigated. For this purpose, MSCs whose DNA was labeled with Hoechst 3342 dye were injected intraperitoneally into the rats. After sacrifice, histopathological evaluation of ovarian tissues was performed under light and electron microscope. Estradiol (E2) and IL-6 levels in serum samples were analyzed.

In the OHSS group; hemorrhagic areas, vascular dilatations and edema were evident. While a decrease was observed compared to the control group in all follicle types developed in the cortex, a significant increase was observed in atretic follicles and corpus luteum structures. Serum E2, IL-6 levels and VEGF immunoreactivity were significantly higher in the OHSS group. A decrease was observed in edema, hemorrhagic areas and vascular dilatations in the OHSS group with the administration of MSCs. While it was observed that MSCs had a slight curative effect on follicle and corpus luteum numbers, although not statistically significant, it was found to have a therapeutic effect by causing a significant decrease in serum estradiol, IL-6 levels, and VEGF immunoreactivity. Ultrastructural changes were evaluated by electron microscopic analysis.

These results show that MSCs have positive effects on the pathogenesis of OHSS. However, further experimental and clinical studies are needed to use MSCs as an alternative pharmacological agent in the treatment of OHSS.

Key Words: OHSS, Mesenchymal Stem Cell, Human Umbilical Cord, VEGF, IL-6

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 34798

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS), yardımcı üreme tedavileri sırasında gelişen, gonadotropin etkili ovulasyon indüksiyonunun iatrojenik bir komplikasyonudur (1, 2). OHSS patofizyolojisinin altında yatan esas mekanizma halen tamamen açıklığa kavuşmamış olsa da; ovaryumların folikül uyarıcı hormon (FSH) ile yapılan kontrollü ovulasyon indüksiyonunu takiben lüteinizan hormon (LH) ve human koryonik gonadotropine (hCG) maruz kalması sonucu olduğu bilinmektedir. Korpus luteum oluşumunda ve ovaryum boyutunda meydana gelen artış ile karakterize olan OHSS'de, ovayumlardan salgılanan vazoaktif ve proinflamatuvar faktörlerin etkisiyle, kapiller permeabilitede artış meydana gelmekte ve bunun sonucu olarak da intravasküler alandan periton boşluğuna sıvı birikimi gerçekleşmektedir (3, 4). İntravasküler hacimdeki azalma hemokonsantrasyona, birçok hayati organın perfüzyonunun azalmasına ve tromboembolik etkiye yol açabilmektedir. Özellikle şiddetli form OHSS'de, serum 17 β -estradiol (E2) seviyelerindeki artış, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), çeşitli proinflamatuvar sitokinler (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 ve Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α), histaminler, büyüme faktörleri gibi birçok mediatörün de salınımı ile birlikte renal, hepatik ve solunum fonksiyon bozuklukları dahil olmak üzere çoklu organ yetmezliği gelişebilmektedir (1, 3, 5). IL-6, OHSS patogenezinde aktive olan en önemli sitokinlerden biridir. Makrofajlar, lenfositler endotel hücreleri, gibi birçok hücre tarafından sentezlenen IL-6'nın vasküler permeabiliteyi arttırdığı bilinmektedir (6). Yapılan çalışmalarda OHSS hastalarının foliküler sıvılarında kontrol gruplarına kıyasla IL-6 seviyesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, in vitro fertilizasyon hastalarında oosit toplama sırasında foliküler sıvıdaki IL-6 konsantrasyon seviyelerinin, OHSS' nin erken bir belirleyicisi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (7, 8).

Mezenkimal kök hücreler (MKH); immünmodulator, immünsüpresif, antioksidan ve antiapoptotik etkileri birçok çalışma ile gösterilmiş, multipotent özellikle doku onarım potansiyelleri yüksek olan hücrelerdir. MKH'ler terapötik etkilerini migrasyon, farklılaşma ve salgıladıkları pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler, hepatosit büyüme faktörü (HGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), VEGF gibi parakrin faktörler aracılığı ile gerçekleştirirler (9-11).

MKH' ler, kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, amniyotik sıvı, diş pulpası, wharton jeli ve plasenta gibi çeşitli dokulardan izole edilebilir (10, 12). İnsan göbek kordonunun (İGK) izole edilen MKH'lerin daha az bioetik sorun teşkil etmesi, kolay elde edilmesi, hipoinmunogenik olması, yüksek proliferasyon hızı ve transplantasyondan sonra uzun canlı kalma süresi gibi özelliklere sahip olması, diğer MKH kaynakları ile kıyaslandığında bu hücreleri; allojenik transplantasyon tedavileri için daha avantajlı bir kök hücre kaynağı haline getirmiştir (13, 14). Prematüre ovaryan yetmezlik (POF) ve polikistik over sendromu (PKOS) gibi inflamatuvar süreçlerde yer alarak ovaryum hasarı oluşturulan birçok hastalık modelinde, transplante edilen MKH'lerin iyileştirici etkileri gösterilmiştir (15-17). Tüm bu yararlı etkiler, MKH'lerin OHSS gibi inflamasyon artışı ile karakterize hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Son yirmi yılda, klinik uygulamalarda ovulasyon indüksiyonu için hCG yerine gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonistlerinin kullanılması OHSS insidansını ve şiddetini önemli ölçüde azaltmış olsa da en son Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği raporuna göre, Avrupa ülkelerinde OHSS insidansı %0,18 ile %1,40 arasında değişmektedir (18). Günümüzde kabergolin kullanımı dışında herhangi bir tedavi seçeneğinin bulunmaması farklı tedavi seçeneklerinin gerekliliği düşüncesini doğurmuştur. Literatürde OHSS modeli oluşturulmuş sıçanlarda, İGK-MKH uygulamasının ovaryum üzerindeki etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bilgiler ışığında planlanan projemizde, OHSS patogenezinde oluşan; folikül ve oosit yapısının bozulması, granüloza hücrelerinde apoptozis, korpus luteum oluşumunda, ovaryum boyutunda, inflamasyonda (IL-6 seviyesinde artış) ve damar permeabilitesinde artış (VEGF seviyesinde artış) gibi hasarlara karşı İGK-MKH'lerin koruyucu etkilerinin morfolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve ultrastrüktürel olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

2.1.1. Ovaryum Histolojisi

İnsanda ovaryumlar, gametogenez aşamalarının gerçekleştiği, steroid hormonlarının üretildiği, yaklaşık 1,5 cm genişliğinde, 3 cm uzunluğunda ve 1 cm kalınlığında bir çift organdır (19, 20). Ovaryumların yüzeyi kübik veya yassı tek katlı bir epitel ile kaplıdır. Germinal epitel olarak da adlandırılan bu tek katlı epitel tabakası ovaryum dışında mezotel ile devamlılık gösterir. Germinal epitelin altında sıkı bağ dokusu yapısında, tunika albuginea adı verilen bir tabaka yer almaktadır. İntrauterin yaşamda ve doğumdan sonraki ilk birkaç ay henüz oluşmamış olan tunika albuginea, mezenkim kaynaklı fibroblastoid hücrelerinin ortaya çıkmasıyla oluşur. Literatürde tunika albuginea ile ilgili detaylı çalışma bulunmamakla birlikte, bu tabakanın çeşitli ovaryum tümörlerinin kaynağı olduğu düşünülmektedir (19-21). Ovaryum sınırları birbirinden keskin bir şekilde ayrılmayan korteks ve medulla adı verilen iki kısımdan oluşur. Tunika albuginea'nın altında bulunan korteks, medullayı çevreleyecek şekilde ovaryumun periferinde yer alır. Kortekste, yer yer düz kas hücreleri içeren ve hücreden oldukça zengin bir bağ dokusu içine gömülü olan ovaryum folikülleri bulunur. Ovaryumun merkezi bölgesinde bulunan medulla ise; hilumdan gevşek bağ dokusu içinde içeri giren, sinirler, kan ve lenf damarları bulunur (19, 22).

Ovaryum, gamet üretimi ve menstrüal siklusu kontrol eden östrojen, progesteron gibi steroid yapıdaki hormonların, sentezlenip salgılanması işlevlerini gerçekleştiren bir organdır. Östrojen, erken dönemde iç ve dış genital organların organogenezinde rol alırken puberte döneminde ise dişi seks karakterlerinin gelişiminde görev alır. Ayrıca, duktal ve stromal yapıların gelişimini uyararak meme bezleri üzerinde etki gösterir. Progesteron ise endometriyumda salgılama değişiklikleri oluşturarak, uterus ve diğer iç genital organları implantasyon sürecine hazırlar (19, 23).

2.1.2. Folikül Gelişimi

Ovaryumun korteksinde, her biri tek bir primer oosit ve bunu çevreleyen granüloza yada folikül hücrelerinden oluşan, farklı boyutlarda foliküller bulunmaktadır. Foliküllerin gelişimi, puberte ile birlikte ovaryum steroidleri, gonadotropinleri ve foliküler hücre salgıları etkisi altında döngüsel olarak tamamlanır.

Gelişim evresine göre histolojik olarak 3 tip folikül tanımlanır (19). Bunlar;

2.1.2.1. Primordial Folikül

Embriyonik dönemin 4. haftasında endodermal hücreler arasında oluşan primordial germ hücreleri vitellüs kesesinden dışı gonad taslağına göç eder. Gonadlara ulaşan primordial germ hücreleri oogonyumlara farklılaşır ve yoğun bir mitotik bölünme sürecine girerler. Bu esnada, sölom epitelinden hücre proliferasyonu ile primitif seks kordonları gelişir ve primordial germ hücrelerinin etrafını sarar. Daha sonra primitif seks kordonları medulla içerisinde dağılır ve dejenere olur. Yedinci haftada ovaryum yüzey epitelinden kortikal kordonlar yani sekonder seks kordonları oluşur. Bu kordonlar dördüncü ayda hücre kümelerine ayrılır, proliferer olur ve oogonyumların etrafını sararak primordial folikül oluşumunu başlatırlar (22, 24).

Yoğun bir mitotik bölünme geçiren oogonyumların sayıları 20. haftada yaklaşık 7 milyona ulaşır. Bu aşamada ki mitotik aktivite gelecekteki over rezervinin ne kadar olacağını belirler. Mitozla bölünme devam ederken oogonyumların bir kısmı 1. mayoz bölünmenin profazına girer ve primer oosit adını alır. 28. hafta civarında mitoz bölünme sona erer, atrezi süreci başlar ve çok sayıda primer oosit ve oogonium atretik hale gelir. Dejenere olmayan foliküller 1. mayoz bölünmenin profaz aşamasında duran primer oositler ile birlikte primordial folikül yapısını oluştururlar (24-26).

Erken gelişimleri gonadotropin ekspresyonlarından bağımsız olan primordial foliküller, tunika albugineanın altındaki korteks stromasında yer alırlar. Tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrili primordial foliküldeki oositin çapı 30 µm'dir. Bu aşamada ki oosit ince dağılmış kromatin ve nükleolus içeren büyük bir nükleusa (germinal vezikül) sahiptir. Sitoplazmasında endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, lizozom ve mitokondri gibi organellerin küme şeklinde bir araya gelmesiyle oluşan balbiani cisimciği yer alır. İnsan oositleri farklı olarak morfolojik olarak nükleer porların yapısına özdeş, bir nükleer zarf kesiti dizisi olan anüller lameller içerir. Primer oositler mayoz 1'in profaz evresinde uzun yıllar kalır. Oositin olgunlaşması bu süre zarfında primordial folikül hücrelerinden salınan oosit olgunlaşmasını baskılayıcı madde (OMI) tarafından engellenir. Mayoz bölünmedeki bu duraksama ovulasyon öncesi maturasyon ilerletici faktör (MPF) salınmasıyla ortadan kalkar (19, 23-25).

2.1.2.2. Primer Folikül

Primordial foliküller, büyüme evresine geçince, oosit ve folikül hücrelerinde değişiklikler meydana gelir. Oositi çevreleyen tek katlı yassı folikül hücreleri, önce kübik daha sonra prizmatik şekil alır. Germinal vezikül büyür ve oosit çapı artarak 50-80 µm'ülür. Bu aşamada granüloza hücreleri ve oosit tarafından salınan, yüksek glikoprotein ve glikozaminoglikan seviyeleri içeren zona pellusida yapısı oluşur. Bu evredeki folikül unilaminar primer folikül (tek katlı primer folikül) olarak adlandırılır. Zona pellusida ZP-1, ZP-2, ZP-3 adı verilen 3 glikoproteinden oluşmaktadır. ZP-3, akrozomal reaksiyonda rol alan önemli bir sperm reseptörüdür. Tek tabakalı prizmatik folikül hücreleri proliferasyon olarak çok tabakalı hale gelir ve granüloza hücre tabakasını oluştururlar. Bu aşamada folikül multilaminar primer folikül (çok katlı primer folikül) adını alır. Granüloza hücreleri arasında oluklu bağlantılar gelişir. Oosit maturasyonu arttıkça sitoplazmada bulunan balbiani cisimciği dağılır, kortikal granüller belirir, granüllü endoplazmik retikulum ve serbest ribozom sayısı artar. Bu değişiklikler olurken folikül çevresindeki stromada yer alan fibroblast hücreleri, teka kılıfını oluşturur (19, 21, 22).

2.1.2.3. Sekonder Folikül

Çok katlı primer foliküldeki granüloza hücre tabakası 6-12 tabakaya ulaştığında, bu hücreler arasında içinde folikül sıvısı ihtiva eden boşluklar oluşur. Kalınlaşan zona pellusida ile birlikte bu aşamadaki foliküller, sekonder folikül olarak adlandırılır. Folikül sıvısı içinde glikozaminoglikanlar, plazminojen, progesteron, östrojen, androjen, aktivin, inhibin, follistatin gibi FSH ve LH salınımında etkili olan hormonlar bulunur. Folikül gelişimi ve sıvı miktarı arttıkça, bu sıvı dolu boşluklar birleşerek tek bir boşluk olan antrum oluşturur. Granüloza hücreleri FSH bağımlı hale gelir ve oositi antrum tarafında kuşatan, kumulus ooforus adı verilen bir tümsek oluşturur. Oositi zona pellusidanın hemen üzerinde çevreleyen ve ovulasyonda oositle birlikte kalan, prizmatik şekilli kumulus ooforus hücreleri ise korona radiata adını alır (19, 22).

Foliküller gelişim devam ettikçe folikül çevresinde gelişen teka kılıfı; teka interna ve teka eksterna tabakalarına ayrılır. Teka interna; folikül bazal laminasına bitişik yüksek derecede vaskülarize, tipik steroid salgı yapan hücrelerden oluşmuş iç tabakadır. Buradaki hücreler LH stimülasyonuna yanıt olarak bir androjen öncülü olan androstenedion salgılar. Androstenedion granüloza hücrelerine taşınır ve FSH etkisi altında aromataz enzimi tarafından östradiole çevrilir. Teka eksterna; ovaryum stroması

ile devam eden, kollajen lifleri ve düz kas hücreleri içeren dış tabakadır. Teka interna ve folikül arasındaki sınır belirgin iken, teka tabakaları ve stroma arasındaki sınır belirgin değildir (21, 22, 25).

2.1.2.4. Tersiyer (Graaf) Folikül

Folikül gelişimi devam ederken antrum büyür, granüloza hücrelerinde proliferasyon azalır. Folikül büyümesi ile orantılı bir mitotik aktive oluşmadığı için granüloza tabakası ince bir tabaka olarak gözlenir. Ovulasyondan önce çapı 10-20 mm'ye ulaşan folikül tersiyer (Graaf) folikül olarak adlandırılır. Antrum boyutunda artış meydana geldikçe granüloza hücreleri arasındaki boşlukta artar, oosit ve kumulus hücreleri ile kalan granüloza hücreleri arasındaki bağlantı zayıflar, ovulasyon sürecine hazırlık başlar. Korona radiata ve bu hücrelerle birlikte gelen bazı kumulus ooforus hücreleri ovulasyonda oosit ile birlikte kalır. Primer ve sekonder folikül granüloza hücrelerinde sadece FSH reseptörü bulunurken Graaf folikülde LH reseptörleri de vardır. LH reseptörleri ovulasyon sonrasında kalan folikül luteinizasyonunda görev alır. Teka tabakaları bu dönemde daha belirgindir. (19, 22, 23).

2.1.3. Ovulasyon ve Korpus Luteum

Ovulasyon, sekonder oositin ovaryumdan korona radiata hücreleri ile birlikte atıldığı hormon uyarımlı bir süreçtir. Ovulasyondan hemen önce artan östrojen seviyelerinin etkisiyle LH salınımında ani bir artış gerçekleşir. LH'daki ani artışla germinal vezikülün devamlılığını sağlayan siklik adenozin monofosfat (cAMP) eşik değerinin altına düşer ve germinal vezikül parçalanır. Böylece mayoz I'in profazında bekleyen primer oosit bölünmesini tamamlayarak mayoz II 'nin metafazında duraksar ve sekonder oosit adını alır. Ovulasyondan sonra 24 saat canlı kalabilen sekonder oosit, fertilizasyon gerçekleşirse mayoz II 'yi tamamlar aksi durumda dejenere olur (19, 23, 25).

Her menstrüal siklusta 5-12 folikül gelişmeye başlar fakat çoğunlukla bir folikül daha fazla büyüyerek baskın hale gelir ve diğer foliküllerin gelişimi inhibe olur. Baskın olan folikül, foliküler büyümenin bütün aşamalarını tamamlar ve ovulasyona uğrar. Ovulasyon öncesinde foliküler sıvıdaki hacim ve basınç artışıyla Graaf folikülü ovaryum yüzeyinde bir çıkıntı oluşturur. Bu çıkıntı üzerinde stigma adı verilen damarsız bir bölge belirir. Ani LH artışı ile birlikte, granüloza hücreleri daha fazla miktarda prostaglandin, hyaluronan salgılar, kumulus ve granüloza hücreleri arasında

glikozaminoglikanlar birikir ve teka eksterna tabakasındaki düz kas lifleri, foliküler sıvıdan gelen prostaglandinlerin etkisiyle kasılmaya başlar. Ovaryum yüzeyinde artan gerilim sonucu stigma bölgesi yırtılır ve sekonder oosit etrafındaki korana radiata ve kumulus hücreleriyle birlikte tuba uterinanın fimbriyalarına doğru atılır. Ovulasyon süreci tamamlanmış olur (19, 21, 22).

Ovulasyondan sonra ovaryum korteksinde kalan Graaf folikülün granüloza ve teka interna hücrelerinde bir dizi değişiklik meydana gelir. Folikül hücreleri büzüşür, katlanır ve bazal laminası yıkılır. Teka internadaki damarlardan antrum boşluğuna doğru bir kanama gerçekleşir ve buradaki kanın pıhtılaşması sonucu korpus hemorajikum oluşur. Daha sonra stromadan gelen bağ dokusu folikül boşluğunu kaplar, teka interna ve granüloza hücreleri LH etkisiyle gerçekleşen ve luteinizasyon olarak adlandırılan bir süreçle; morfolojik ve işlevsel bir değişikliğe uğrar, teka lutein ve granüloza lutein hücrelerine farklılaşır ve korpus luteum yapısı oluşur. Granüloza lutein hücreleri, granüloza hücrelerinden herhangi bir mitotik aktivite olmadan gelişen çapları 25-30µ arasında olan merkezi yerleşimli, steroid sentezleyen hücre özelliklerini (tübüler kristal mitokondri, agranüler endoplazmik retikulum, lipid damlacıkları) edinmiş hücrelerdir (19, 21). Bu hücreler FSH ve LH etkisiyle progesteron ve östrojen salgırlar. Teka lutein hücreleri ise, LH etkisiyle androstenedion ve progesteron üreten, 15 µ çapında, daha koyu boyanan steroid sentezleyen hücre özellikleri taşıyan, periferik yerleşimli hücrelerdir. Fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşirse korpus luteum gelişimini sürdürür ve gebeliğin üçüncü ayına kadar, uterus endometriyumunun büyümesini desteklemek için, implante embriyonun trofoblast hücrelerinden salgılan hCG etkisiyle progesteron ve östrojen üretmeye devam eder. Fertilizasyon ve implantasyonun gerçekleşmediği durumda ise korpus luteum sadece 14 gün aktif kalır. Trofoblast kaynaklı hCG uyarımı olmadığı için steroid hormon üretimi azalır ve korpus luteum dejenere olmaya başlar. Dejenere korpus luteumun hücreleri arasında hiyalin materyal birikir ve korpus albicans adını alır. Bu yapıda ovaryum korteksi içine gömülür ve birkaç ay içinde kaybolur (19, 22, 24).

2.1.4. Foliküler Atrezi

Ovaryum foliküllerinin çoğu gelişimlerini tamamlayamaz ve atrezi denilen bir süreçle dejenere olurlar. Fetal gelişim, postnatal hayat, puberte ve menopoz döneminde, foliküllerin büyük bir çoğunluğu granüloza hücrelerinde gelişen apoptoz ile birlikte atreziye uğramaktadır. Her menstrual siklusta çok sayıda primordiyal folikül olgunlaşmaya başlar, fakat sadece bir tanesi atreziye uğramaz ve foliküler maturasyonunu tamamlar. Küçük foliküllerin atrezisi sırasında önce immatür oosit dejenere olmaya başlar, küçülür daha sonra granüloza hücreleri dejenerasyona uğrar. Büyük foliküllerin atrezisinde ise, matür oositin dejenerasyonu gecikir, atrezi granüloza hücrelerinin proliferasyonun durması ve apoptozu ile başlar. Atretik foliküller dalgalı hiyalin bir tabaka olan camsı membran, dejenere olmuş zona pellusida, oosit ve granüloza hücrelerini istila eden makrofajların varlığıyla ayırt edilebilirler (19, 21).

2.2. Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu

2.2.1. Genel Tanımlama

Ovaryan hiperstimülasyon sendromu, bazen rutin gebelik süreçlerinde spontan olarak gelişebilse de, çoğunlukla yardımcı üreme tedavileri sırasında oluşan ve ölümle sonuçlanabilen ciddi bir iatrojenik komplikasyondur. İnfertilite problemleri dünya çapında ~186 milyon insanı etkilemekte ve yardımcı üreme tedavilerine olan talep giderek artmaktadır (27). Hem in vivo fertilizasyon hem de in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamaları sırasında, daha fazla oosit elde edilmesi için eksojen hCG ile yapılan kontrollü ovulasyon indüksiyonu; kapiller permeabilitede artış, ovaryum boyutunda büyüme ve periton boşluğunda sıvı birikimi ile karakterize OHSS oluşumuna neden olabilmektedir (1, 3) .

OHSS klasik olarak hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç kategoriye ayrılmaktadır (5, 28). Hafif form, yüksek serum 17-estradiol (E2), progesteron (P4), seviyeleri ile karakterizedir ve “kimyasal OHSS” olarak tanımlanır ve ovaryum çapı 5 cm'den küçüktür. Orta form OHSS’de ise şişkinlik, karın ağrısı, mide bulantısı, kusma, ishal görülür ve ovaryum çapı yaklaşık 5-12 cm çapında büyümüştür. Şiddetli formda, ovaryum çapı genellikle 12 cm 'den büyük olup masif asitler ile çevrilidir, hidrotoraks, perikardiyal efüzyon ve böbrek fonksiyon bozukluğu ile hemo-konsantrasyon gelişebilir (1, 5, 28). Orta ve şiddetli form OHSS insidansı, tüm IVF sikluslarında %3 ile %10 arasında iken yüksek riskli grupta olan PKOS’lu hastalarda görülme sıklığı %20'ye ulaşabilir (6, 29, 30).

Ovulasyon indüksiyonu sırasında OHSS'yi önlemek için GnRH agonisti, aspirin, metformin, dopamin agonisti (kabergolin) kullanımı ve embriyo kriyoprezervasyonu gibi çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (30). Fakat bazı hastalarda yukarıda belirtilen müdahalelere rağmen orta ve şiddetli form OHSS oluşabilmektedir (31). Bu nedenle OHSS riskini en aza indirmek için ovulasyon indüksiyonundan sonra ikincil müdahalelere ihtiyaç vardır.

2.2.2. Patogenez

OHSS patogenezindeki mekanizmalar kesin olarak aydınlatılmamış olsa da, hCG kullanımı ile birlikte, ovaryumlarda vazoaaktif maddelerin salınımında meydana gelen artış, vasküler permeabiliteyi arttırarak intravasküler dehidratasyona ve üçüncü boşluklara sıvı geçişine sebep olmaktadır (6, 32). Ovaryum boyutunda masif büyüme, korpus luteum oluşumunda ve serum 17 β -estradiol (E2) seviyesinde artış ile karakterize olan OHSS'de; ovaryan renin-anjiyotensin sistemi, prostaglandinler, histaminler, sitokinler (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF), VEGF, Pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF) gibi birçok mediatör aktive olmaktadır. OHSS'nin şiddetli formunda ödem, hipovolemi, asit, hidrotoraks, hidroperikardiyum, tromboz ve akut respiratuar distres sendromu gibi yaşamı tehdit eden durumlar ortaya çıkabilmektedir (1, 3, 33).

2.2.2.1. VEGF

VEGF, güçlü anjiogenik, endotelial hücreye özgü mitojenik ve vasküler permeabiliteyi arttırıcı etkilere sahip, heparin bağlayıcı bir glikoproteindir (34, 35). İnflamasyon, yara iyileşmesi, embriyogenez, büyüme ve neoplazmaların metastazı gibi hem normal hem de patolojik anjiyogenez süreçlerinde önemli bir rol oynayan VEGF, ovaryan anjiyogenezisi, foliküler büyüme ve korpus luteum oluşumunda da görev alır (6, 34, 35). Endotel hücreleri arasında yer alan sıkı bağlantı proteinlerini yeniden düzenleyerek kapiller permeabilitede artışa neden olur (29). VEGF ekspresyonu ve OHSS patogenezi arasındaki ilişki bir çok çalışmada gösterilmiştir (32, 36). IVF sikluslarında oosit maturasyonu için gerekli olan hCG uygulaması, luteinize granüloza hücrelerinde VEGF messenger RNA (mRNA) ekspresyonunu arttırır. Aşırı salgılanan VEGF, endotel hücreleri üzerinde bulunan VEGF reseptörü 2 (VEGFR2)'ye bağlanarak fosforile eder ve kapiller permeabilitede artışa neden olur (37, 38). Kapiller permeabilitede artış intravasküler dehidratasyon, hemokonsantrasyon, azalmış organ perfüzyonu ve üçüncü boşluklarda sıvı birikimi ile sonuçlanarak solunum, böbrek ve dolaşım problemlerinin gelişmesine sebep olur (32, 36, 38). Ratlarda yapılan

çalışmalarda VEGFR2'ünü bloke eden bir bileşik olan SU-5416 uygulamasının kapiller permeabilitedeki artışı azalttığı gosterilmiş olsa da tromboemboli oluşturma riski nedeniyle insan tedavilerinde kullanılamayacağı bildirilmiştir (39, 40). Ayrıca dopamin reseptör agonistlerinin de (kabergolin) endotel hücreleri üzerindeki VEGFR2' yi bloke ederek hafif form OHSS tedavisinde kullanılabileceği, fakat ağır form OHSS tedavisinde yetersiz kaldığı, gebelik sırasında gelişen OHSS vakalarında ise uterusu ki neovaskülarizasyonu azalttığı rapor edilmiştir (36, 38, 41).

2.2.2.2. İnterlökin-6

IL-6; glikoprotein yapıda, moleküler ağırlığı 20 kilodalton olan, IL-6 reseptörü - α (IL-6R α) aracılığı ile sinyal veren, 4 helikal sitokin ailesinin bir üyesidir (8, 42). IL-6, IL-6R α 'ya bağlanır, transmembran glikoprotein 130 (gp130) ile etkileşime gezer ve januskinaz (JAK), sinyal dönüştürücü transkripsiyon aktivatörü (STAT), mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol-3-kinaz yolakları aracılığıyla hücre içi sinyalleşmenin başlatılmasını sağlar. Glikoprotein 130, bütün hücrelerde bulunurken, IL-6R α ; megakaryositler, belirli lökosit popülasyonları ve hepatositler gibi birkaç hücre tipinde ekspresse edilir. Fakat endotel hücreleri gibi bazı hücreler yüzeylelerinde IL-6 affinitesi olan çözünür IL-6 reseptörü - α (sIL-6R α) bulundurur (8, 42) IL-6-IL-6R α yolağı klasik sinyal yolağı olarak adlandırılır ve anti-inflamatuar süreçlerde rol alırken, IL-6- sIL-6R α yolağı ise trans -sinyal yolağı olarak adlandırılır ve proinflamatuar süreçlerde rol alır (43, 44). sIL-6R α 'nın otoimmün hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçlerde, IL-6 aktivitesini kontrol ettiği birçok çalışmayla gosterilmiştir. IL-6, OHSS'li kadınlarda bulunan başlıca immünregülatör sitokinlerden biridir. Özellikle, şiddetli form OHSS hastalarının asit serum ve folikül sıvılarında, IL-6 ekspresyonunun arttığı bir çok çalışma ile gosterilmiştir (6). Wei ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada IL-6 trans-sinyal yolağı aracılı endotelial bariyer disfonksiyonunun, malign over asidi oluşumuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgular, OHSS sonucu meydana gelen vasküler sızıntı ile IL-6 trans-sinyal yolağı arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu gstermektedir (8).

2.2.2.3. Estradiol

Estradiol (E2), folikülogenez, ovulasyon, luteal fonksiyon ve steroidogenez gibi dişi üreme sistemi üzerinde önemli rol oynayan süreçlerde yer alan ve granüloza hücrelerinden sentezlenen steroid bir hormondur (45). E2' nin biyosentezi, sitokrom P450 ailesi 19 alt ailesi A üyesi (CYP19A1) geni tarafından kodlanan aromataz enzimi

tarafından katalize edilir. Aromataz, preovulatuvar foliküllerin granüloza hücrelerinde eksprese edilir ve ovulasyondan sonra, granüloza hücreleri aromataz eksprese eden ve E2 sentezleme kapasitesini koruyan granüloza-lutein hücrelerine farklılaşır. Aromataz/E2 ekspresyonu hipofizden salgılanan FSH kontrolü altında gerçekleşir (45, 46). Bununla birlikte, çeşitli büyüme faktörlerinin ve hormonların, granüloza hücrelerinde aromataz/E2 ekspresyonunu düzenlediğinde rapor edilmiştir (45). E2, vasküler permeabilite ve VEGF ekspresyonlarını arttırarak OHSS patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (47). OHSS hastalarında, foliküler sıvı ve serum E2 seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (1, 29, 45). Yapılan son çalışmalar, oosit maturasyonu için yapılan son hCG uygulaması öncesinde ve hemen sonrasında artan E2 seviyelerinin OHSS erken tanısında kullanılabileceğini belirtmektedir (6, 45). Günümüzde klinik uygulamalarda, hastalarda; ovulasyon indüksiyonu sonucu gelişen folikül sayısının 20'den fazla, E2 seviyesinin 4000 pg/ml' in üzerinde olması orta form OHSS; folikül sayısının 30'dan fazla ve E2 seviyesi 6000 pg/ml'in üzerinde olması, şiddetli form OHSS gelişimi için risk sınırı olarak kabul edilmektedir (48).

OHSS'nin yardımcı üreme tedavileri dışında; FSH reseptör genindeki mutasyonlar, gebelik sırasında anormal derecede yüksek hCG sekresyonu, hipofiz adenomu 1 ve pankreatik nöroendokrin tümör kaynaklı FSH sekresyonu gibi patolojik süreçlerde de oluştuğu rapor edilmiştir (32, 49, 50).

2.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği, adipoz doku, diş pulpası, göbek kordonu, wharton jeli, plesanta gibi dokulardan izole edilebilen, endoderm, mezoderm ve ektoderm kaynaklı hücrelere farklılaşma yeteneği gösteren, güçlü multipotent özellikte kök hücrelerdir (10, 11, 51). Anti-inflamatuar, immünmodulator süreçlerde yer almaları ve in vitro ortamda kolay elde edilebilmeleri, bu hücreleri son yıllarda bir çok hastalığın tedavisi için güçlü bir seçenek haline getirmiştir. Uluslararası Hücrel Tedavi Derneği Mezenkimal Kök Hücre Komitesi'ne göre MKH'ler; standart kültür koşullarında plastik-adherent olmalı, osteoblastlara, adipositlere, kondroblastlara farklılaşabilmelidir. Ayrıca, CD (Yüzey farklılaşma antijenleri) CD105 CD90, CD73, CD90 yüzey moleküllerini eksprese edebilirken, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-DR yüzey moleküllerini eksprese etmemelidir (10, 52). Kaynaklarına bakılmaksızın bütün MKH'ler morfoloji, farklılaşma potansiyeli ve immünofenotip bakımından bazı benzer özellikler taşıyalar da, farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler arasında

proliferasyon hızları, büyüme oranları, immünosupresif özellikleri ve gen ekspresyon profilleri açısından farklılıklar bulunmaktadır (53). İlk kez Friedenstein ve ark. tarafından fare kemik iliğinden (Kİ) izole edilen Kİ-MKH'ler üzerinde en fazla çalışma yapılan hücrelerdir ve günümüzde kök hücre uygulamalar için altın standart olarak kabul edilmektedirler (11, 54, 55). Bununla birlikte, Kİ-MKH'lerinin, kemik iliğinden izolasyonun ağırlı ve invaziv bir süreç olması, tek seferde elde edilen hücre miktarının ve hücre proliferasyon hızının az olması, farklılaşma yeteneklerinde yaşa bağlı meydana gelen gerileme gibi dezavantajlarının olması bu hücrelerin klinik uygulamalarını sınırlandırmakta ve araştırmacıları yeni hücre kaynaklarına yöneltmektedir (56). Göbek kordonundan izole edilen kök hücreleri, göbek kordonunun atık bir doku olması, hücre elde etmek için invaziv bir sürecin gerekmemesi ve bundan kaynaklı daha az enfeksiyon riski taşıması, hücre proliferasyon hızlarının yüksek olması, in vitro ortamda kırk pasaja kadar çoğalabiliyor olması, temel doku uyumluluk kompleksi II (MHC II) molekülü ve CD40, CD80, CD86 stimülatör ligandları içermemesi ve bu sebeple daha az immünojenik aktivasyon göstermesi gibi özellikleri, bu hücrelerin klinik uygulamalarda kullanımını daha avantajlı konuma getirmiştir (11, 57).

Mezenkimal kök hücreler terapötik etkilerini üç farklı mekanizma ile gösterirler. Birinci mekanizma; transdiferansiyasyon ve hücre füzyonu olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Transdiferansiyasyon süreci ile MKH'ler, hasarlı bölgeye göç eder, farklılaşır ve hasarlı hücrelerin yerini alarak doku rejenerasyonunda görev alırlar. Hücre füzyonunda ise MKH'ler ve göç edilen bölgedeki hücreler arasında füzyon meydana gelir. Hasarlı dokudaki hücrelerin nükleusları füzyon etkisiyle yeniden programlanır ve MKH'lere özgü genleri eksprese ederek apoptotik etkilerden korunurlar (11, 58). İkinci mekanizma; MKH'ler; HGF, VEGF, IGF-1 gibi büyüme faktörleri, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 vb. sitokinler ve monosit kemotaktik protein-1 gibi immünomodülatör, immünsüpresif, antiapoptotik moleküller salgılayarak parakrin etki gösterebilirler. MKH'ler immünmodulatör etkilerini T hücreleri ve IFN- γ üreten yardımcı T hücre 1 (Th1) proliferasyonunu inhibe ederek ve sitotoksik T hücresi aracılı sitotoksisiteyi azaltarak ve B hücresi proliferasyonu inhibisyonu ile antikor (İmmunoglobulin G, İmmunoglobulin M) oluşumunu engelleyerek gösterirler (59). Üçüncü mekanizma ise; MKH'ler göç ettikleri bölgedeki hücrelerle sıkı bağlantılar, desmozomlar ve gap junctionlar aracılığı ile etkileşime geçerek bu hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve farklılaşmasını sağlayabilirler (11, 60, 61).

Prematür ovaryan yetmezlik, PKOS gibi hastalıklar ve kemoterapi uygulamaları infertilite problemlerine neden olmakta ve İVF uygulamalarına olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Günümüzde kullanılan hormon replasman tedavileri çoğu zaman yeterli olamamakta ve meme kanseri, OHSS gibi komplikasyonların gelişimine sebep olmaktadır (10, 62). Bu bağlamda, son yıllarda MKH'lerin infertilite üzerine etkilerini araştıran bir çok çalışma yapılmıştır. MKH'lerin oositlere farklılaşması ile ilgili bilgiler sınırlı ve yetersiz olsada; ovaryum hasarı oluşturulmuş ratlar kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda MKH uygulamalarının folikül sayısını, E2 seviyelerini arttırdığı ve granüloza hücrelerinde apoptozu azalttığı rapor edilmiştir. MKH'ler hasarlı ovaryum dokusu üzerindeki iyileştirci etkilerini, granüloza, teka ve vasküler endotelial hücrelere farklılaşma yetenekleri ve salgıladıkları VEGF, HGF, lösemi inhibitör faktörü (LIF), transforme edici büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Bcl-2 gibi parakrin faktörler aracılığı ile gerçekleştirirler (11, 59, 63). Farklı dozlarda uygulanan insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin POF ve PKOS oluşturulmuş rat modellerinde; E2 ve FSH seviyelerini düzenlediği, folikül sayılarını arttırdığı pro-inflamatuar sitokin seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (10, 63, 64). Bütün bu yararlı göz önüne alınarak bu çalışmada diğer kök hücre kaynaklarına kıyasla daha avantajlı olan insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerini kullanıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bezmîâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 30.05.2019 tarihli ve 2019/118 sayılı etik kurul onayı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hücre Kültürü Protokolü

3.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu

Bu çalışmada göbek kordonundan izole edilen, İGK-MKH hücre hattı T25 ve T75 steril kültür flasklarda, DMEM-F12 (Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyum, F12 ham medyum), %10'luk fetal sıgır serumu (FCS), 100 µg/ml streptomisin, 100 IU/ml penisilin 0.2 µM glutamin, içeren kültür medyumı içerisinde, % 95 hava ve %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığa sahip inkübatörde inkübasyona bırakılarak çoğaltıldı. Hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığı zaman pasajlama işlemine başlandı. Kültür medyumı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponu (CMF-PBS) yıkandı. %2'lik tripsin kullanılarak flaska yapışan hücrelerin kaldırılması sağlandı. Daha sonra tripsin miktarı kadar medyum eklenerek pipetaj aracılığı ile hücreler toplandı, 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve 2 ml medyum eklenerek T25 ve T75 kültür flasklarına aktarıldı.

Hücre sayısını belirlemek için, hücreler tripsin uygulanarak toplandı. Hücre süspansiyonu falcon tüpe alındı, 500 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Pellet üzerine hücre yoğunluğu baz alınarak 2-5 ml kültür medyumı eklendi. Yeni oluşan hücre süspansiyonu Neubauer lamına 45° açıyla verildi ve hücre sayımı yapıldı. Transplantasyon için gerekli olan hücre sayısına ulaşıldı.

3.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hoescht 3342 İle İşaretlenmesi

Hayvan deneyleri protokolünün 3.günü 12 ml medyum içerisinde bulunan yaklaşık 12x10⁶ İGK-MKH'ye Hoechst 3342 (Sigma B2261-25mg bisBenzimide H 33342 trihydrochloride) boyası yapılarak bu hücrelerin DNA yapılarının işaretlenmesi sağlandı. 0,5 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içine 5 mg Hoescht 3342 boyası eklendi ve stok solüsyon oluşturuldu. Stok solüsyondan ml başına 1-2 µl olacak şekilde Hoechst 3342 boyası alındı ve içerisinde yaklaşık 12x10⁶ İGK-MKH ve 12 ml medyum bulunan

falcon tüpüne eklendi ve karanlık ortamda 30 dk bekletildi. Hücrelere fazla boyadan arınması için CMF-PBS 5 dk iki kez yıkama işlemi yapıldı ve 12 ml serumsuz medyum eklenerek hücre süspansiyonu oluşturuldu. Bu hücre süspansiyonundan insülin iğnesi ile 1ml alındı ve intraperitoneal olarak ratlara enjekte edildi. 1ml hücre süspansiyonun içerisinde yaklaşık 1×10^6 hücre vardı. Ayrıca Hoechst 3342 ile boyanan bir miktar hücre florasan mikroskop (Olympus IX71) kullanılarak incelendi

3.2. Hayvan Deneyleri Protokolü

3.2.1. Deney Gruplarının ve OHSS Modelinin Oluşturulması

Bu çalışmada Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı tarafından sağlanan 22 günlük Wistar Albino cinsi 30-40 gram ağırlığında, 24 adet immatür dişi sıçan kullanıldı. Hayvan sayıları için power (güç) analizi yapıldı. İncelenen literatürde VEGF yoğunluğu baz alınarak %80 güç ile I. tip hata olasılığı 0,05 alınarak ortalama 0.3, 1.86, 2.3, 1.1 ve standart sapma 1 olarak alındığında her bir grupta minimum 6 denekle çalışılması uygun bulundu. Her grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu (65). Deney süresi 7 gün olarak planlandı ve birinci gün hayvanların 22 günlük oldukları gün olarak belirlendi. Daha önceden oluşmuş korpus luteum yapılarının olmaması ve gelişen çok sayıda folikülün varlığı nedeniyle çalışma 22 günlük immatür ratlar kullanılarak yapılmıştır (66). Hayvanların yaş aralığının küçük olmasından dolayı intravenöz enjeksiyon yönteminin transplante edilcek hücrelere zarar verebileceği düşünülmüş ve bu nedenle intraperitoneal yöntem seçilmiştir.

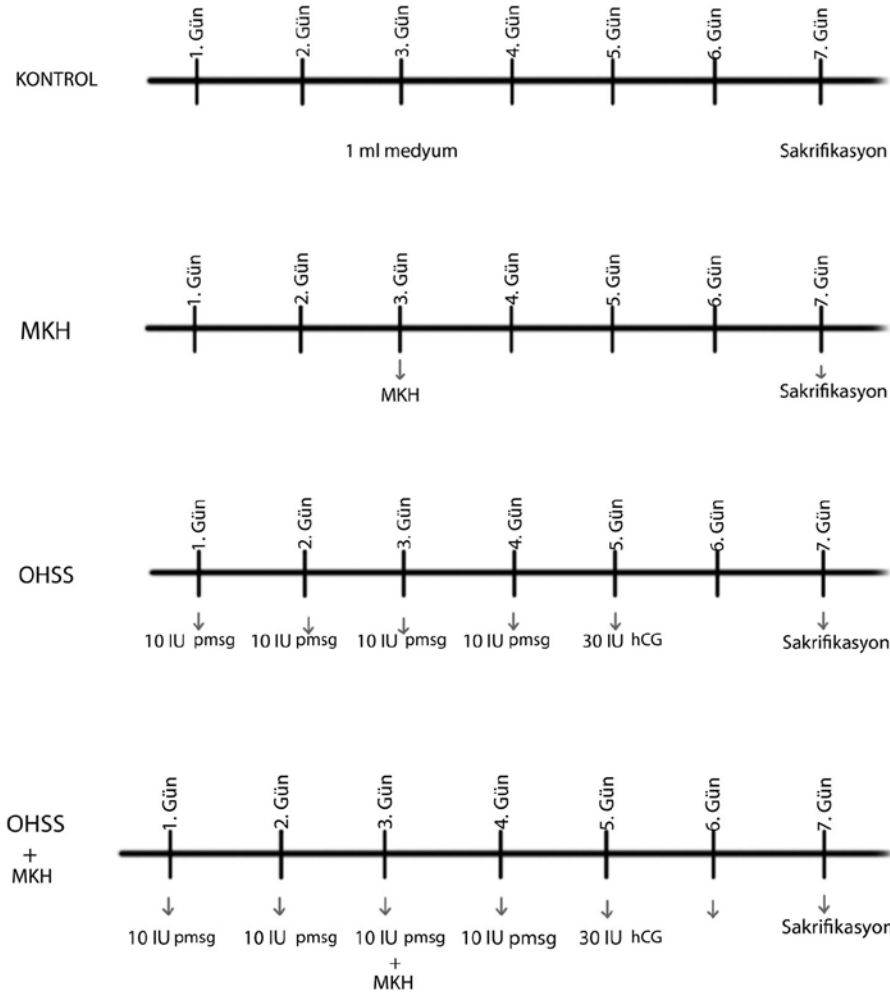
Kontrol (n=6) Hücre uygulamasının yapıldığı 3. gün intraperitoneal (i.p) yolla 1ml serumsuz medyum uygulandı.

OHSS (n=6) 1.2.3.4. günler 10 IU PMSG (Gebe kısarak serum gonadotropini) ve 5.gün 30 IU hCG subkutan olarak uygulanarak ağır form OHSS modeli oluşturuldu.

MKH (n=6) Deney protokolünün 3.günü her hayvana Hoescht 3342 ile işaretlenmiş $\sim 1 \times 10^6$ İGK-MKH hücresi 1ml serumsuz medyum içerisinde i.p yolla uygulandı.

OHSS+MKH (n=6) 1.2.3.4. günler 10 IU PMSG ve 5.gün 30 IU hCG subkutan olarak uygulanarak ağır form OHSS modeli oluşturuldu. 3.gün her hayvana Hoescht 3342 ile işaretlenmiş $\sim 1 \times 10^6$ MKH hücresi 1ml serumsuz medyum içerisinde i.p yolla uygulandı.

hCG uygulamasından 48 saat sonra (7.gün) sıçanlar ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edildi. Deney sonlandırılmadan önce, Enzim Bağlı İmmünoabsorbent Analiz (ELISA) analizleri için bütün deney gruplarından kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 2000 g'de 10 dk santirfüjlendikten sonra serum toplandı ve -80°C'de ELISA analizleri yapılmaya kadar muhafaza edildi. Histolojik ve immünohistokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere sağ ovaryum dokuları %10'luk tamponlanmış formaldehit solüsyonu içine alınarak fiks edildi. OHSS deney modeli ve MKH uygulamasına ilişkin süreç Şekil 1' de verilmiştir.



Şekil 3-1: OHSS deney modeli ve MKH uygulaması akış şeması

3.2.2. Işıık Mikroskobu Analizleri

Fosfat tamponlu %10'luk formalin solüsyonu içerisindeki sağı ovaryumlar, yükselen alkol serilerinden; sırasıyla %70 (60dk), %95 (30 dk iki kez) ve %100 (30 dk iki kez) tutularak dehidrate edildi ve ksilol (Pancreac 141769.1612) içinde 60 dk boyunca şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Dokular erimiş parafin (Merck 1.07337.1000) içerisinde 45dk (3 kez) 56°C'deki etüvde bekletildi ve parafin bloklara gömüldü (67). İmmunflorasan uygulamalar için 5 µm'lik, seri kesit ve immunohistokimya boyamaları için ise 3 µm'lik kesitler mikrotom (LEICA, RM 2255) ile alındı. Folikül sayımı için alınan seri kesitler aynı folikülün tekrar sayılmasını engellemek için 60 µm da bir olacak şekilde her bir ovaryumdan 20 kesit aralıklarla alınan 5'er kesit üzerinde hematoksilin eozin boyaması yapılarak değerlendirildi (68).

3.2.2.1. Hematoksilin Eozin Boyası

Parafin bloklardan alınan 3 µm'lik kesitler 56°C'lik etüvde bekletildikten sonra 30 dakika ksilolde bekletilerek parafinden arındırıldı ve daha sonra inen alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı. Kesitler 10 dk hematoksilin ile boyandıktan sonra 15-20 dk çeşme suyunda morartma uygulandı. Asit alkole alınarak fazla boyası giderilen kesitler eozinde 2 dk boyandı ve distile suya alındı. Daha sonra kesitler yükselen alkol serilerinden geçirildi. Ksilol uygulaması sonra kesitler kapatıcı ile kapatıldı morfolojik özellikleri değerlendirmek amacıyla ışık mikroskopunda (Olympus BX40) incelendi.

3.2.2.2. VEGF İmmünohistokimya Boyama

Parafin bloklardan alınan 3 µm'lik kesitlerde VEGF immünoreaktivitesini değerlendirmek için VEGF antikoru (sc-7269) ve immünohistokimya kiti (Fare Spesifik HRP/AEC (ABC) ab64258) kullanıldı. Adeziv lam üzerine alınan kesitler bir gece etüvde bekletildikten sonra ksilolde 2 kez 5 dk tutularak parafinden arındırıldı. İnen alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı ve kesitlerin rehidrate olunması sağlandı. Kesitler antijen iyileştirme (antijen retrieval) amacıyla sitrat tampon solüsyonu (pH=6,0) içinde mikrodalgada 3dk 2 kez kaynatıldı ve soğuması için 15 dk bekletildi. Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile iki kez 5 dk yıkamanın ardından kesitler endojen peroksidaz blokajı için H₂O₂'de 10 dakika karanlık ortamda bekletildi ve sonrasında tekrar PBS ile iki kez 5 dk yıkama yapıldı. Lam üzerindeki doku kesitlerinin etrafında hidrofobik kalem kullanılarak bir alan oluşturuldu. Özgöl olmayan antikor bağlanmalarını engellenmesi amacıyla 10 dk protein blok solüsyonunda tutuldu.

Bloklama sonrasında kesitlere yıkama işlemi yapılmadan 1:100 dilüsionunda VEGF antikoru uygulandı ve +4°C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin ardından kesitler 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı ve 10 dk biyotin içeren sekonder antikor solüsionunda tutuldu. 3 kez 5 dk PBS ile yıkamanın ardından kesitlere 10 dk streptavidin peroksidaz solüsionu uygulandı. PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra kesitlere 10 dk aminoetil karbazol (AEC) kromojen uygulandı. Kesitler distile su ile yıkandı ve spesifik reaksionun daha kolay incelenebilmesi için 50 saniye Mayer hematoksilende zıt boyama yapıldı. Ardından çeşme suyu ve distile su ile yıkama yapıldı ve su bazlı kapatıcı ile kapatma işlemi uygulandı.

Görüntü analiz programı image J 1.46r ile kesitlere renk dekonvolüsion işlemi yapıldı (69). Her grupta yer alan boyamalardan (n=6) 3 kesitte x40 büyütmede elde edilen 2 alandaki görüntüye renk dekonvolüsion işlemi uygulandı ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.2.3. Hoescht 3342 İmmünflorasan analizi

İmmünflorasan analizler için adeziv lamalar üzerine alınan 5 µm'lik parafin ovaryum kesitleri 56°C'deki etüvde bekletildikten sonra 30 dakika ksilolde bekletilerek parafinden arındırıldı ve immünflorasan mikroskop (Olympus BX61) kullanılarak incelendi.

3.2.3. Elektron Mikroskobu Analizi

Ultrastrüktürel incelemeler için alınan sol ovaryum dokuları 0,1M fosfat tamponlu %2,5'lik glutraldehit solüsionu içerisinde +4°C' de iki gün tutularak fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra dokular, 1 mm³'lük parçalar haline getirildi ve %1'lik osmik asit (EMS 19132) içinde 1 saat fikse edildikten sonra %1'lik uranil asetat içinde tutularak kontrastlama yapıldı. Artan alkol serilerinde dehidratasyonu sağlanan dokular, propilen oksite 2 kez 10 dk olucak şekilde konuldu. Ardından dokular birer saat süreyle sırasıyla 1:1 ve 1:3 propilen oksit: epon karışımlarına ve sonrasında saf epon içerisine konuldu. Kapsüller içinde epona gömülen dokular 60 °C, 18 saat etüve konuldu ve polimerizasyon işlemi yapıldı. Hazırlanan bloklardan ultramikrotom kullanılarak (C:Reichert OM U3) yarı ince kesitler alındı ve çalışmada incelenecek hedef alanlar belirlendi. Daha sonra 60 nm kalınlığında ince kesitler alınarak film ile kaplı 100 mesh gridler üzerine yerleştirildi ve 30 dk uranil asetat, 10 dk kurşun nitrat

damlaları ile muamele edildi ve JEOL 1011 transmisyon elektron mikroskopunda değerlendirildi.

3.2.4. Hormon ve Sitokin Analizi

Hormon (E2) ve sitokin (IL-6) analizleri, deney sonunda sıçanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda ELISA yöntemi ile belirlendi mikropate okuyucu (Biochrom Anthos Zenyt 200 Microplate Raders) ile absorbans ölçümü yapıldı.

3.2.4.1. Estradiol Analizi

Estradiol ölçümü elisa kiti (EIA-2693 DRG Estradiol Elisa) protokolüne uygun olarak yapıldı. 25 µl orjinal standarttan 0,25 pg/ml, 100 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml, 2000 pg/ml olmak üzere 5 farklı konsantrasyon hazırlandı. Her standarttan ve serum örneklerinden 25 µl kuyucuklara konularak üzerine 100 µl Streptavidin-horseradish peroksidaz eklendi ve 90 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Üç defa 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında stop solüsyonundan 50 µl her kuyucuğa eklenerek enzimatik reaksiyonun durdurulması sağlandı ve 10 dakika içerisinde 450 nm dalgaboyunda ELISA okuyucuda optik dansitesi okundu.

3.2.4.2. IL-6 Analizi

Sitokin IL-6 ölçümü elisa kiti (Rat IL-6 Elisa Kit Picokine EK0412) protokolüne uygun olarak yapıldı. 10 ng/ml rat liyofilize IL-6 standardı ve 1ml dilüent solüsyonu kullanılarak stok konsantrasyon hazırlandı. Stok standarttan 4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml ve 0 pg/ml olmak üzere 8 farklı konsantrasyon hazırlandı. Her standarttan ve bütün gruplardan alınan rat serum örneklerinden her kuyucuğa 100µl konuldu. Sıfırıncı standard konsantrasyon kuyucuğuna 100 µl dilüent solüsyonundan eklendi. Koruma membranı ile plate kapatıldı ve oda sıcaklığında 90 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve 100 µl Biotinylated Anti-Rat IL-6 antikorı eklendi ve üzeri koruma membranı ile kapatılarak oda sıcaklığında 60 dk inkübe edildi. Her kuyucuğa 300 µl yıkama solüsyonu eklenerek 3 defa yıkama işlemi yapıldıktan sonra 100 µl Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi eklendi ve oda sıcaklığında 40 dk inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi 5 defa tekrarlandıktan sonra her kuyucuğa 90 µl renk geliştirme reaktifi eklendi ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 25 dk inkübe

edildi. Ardından 100 µl stop solüsyonu eklenerek sarı renk oluşumu gözlemlendi ve 30 dk içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda optik dansitesi okundu.

3.3. İstatistik Analizleri

Folikül sayıları ve ağırlık verilerinin istatistiğinde Graphpad Prism (ver. 7.00) programı kullanılmıştır. Parametrelere ait verilerin normaliteleri Shapiro-Wilk testi ile ölçülmüştür. Normal dağılım gösteren çoklu değişken grupları arasındaki ortalamaların kıyası ANOVA (Tukey testi ile beraber) ile yapılırken, normal dağılım göstermeyen çoklu grupların arasındaki kıyaslamalar ise Kruskal-Wallis (Dunn Testi ile beraber) ortaya konuldu. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası (standart error of mean=s.e.m) olarak ifade edildi ve $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Elisa analizleri için SPSS 24.0 istatistik programı kullanılarak Tek Yönlü Varyans (Tek Yönlü ANOVA) testi yapıldı. Estradiol ve IL-6 konsantrasyonlarının gruplar arası karşılaştırması için post hoc Tukey testi kullanıldı. Tüm veriler ortalama $\pm$ SEM olarak edildi ve $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

VEGF verilerinin istatistik analizleri için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve post-hoc Tukey testleri kullanılarak değerlendirildi. İstatistik analizler sırasında güven aralığı $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler, ve Cihazlar

3.4.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Ketalar (Pfizer), Ketamin HCl (Doğa İlaç), Ksilazin HCl, Formaldehit (Sigma, 15512), Etil Alkol (Merck, 1.00983.2500), Ksilol (Pancreac 141769.1612), Parafin (Thermo, 6774060), PMSG (Folligon 1000 IU intervet), hCG (1500 IU Chorulon; Intervet), Anti-VEGF monoklonal primer antikor (Santa Cruz sc7269), Fare spesifik HRP/AEC (ABC) immünohistokimya kiti (ab64258), Antikor dilüent solüsyonu (ScyTek ABB125), Mayer hematoksilen, Eozin, Su bazlı kapatma solüsyonu (1161 ImmunoHistoMount Sigma), Glutaraldehit (Merck, 104239), Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma, 45359-1EA-F) (EMS G100-Cu), Jelatin Kapsül (Size 3) (EMS 70104). Sıçan IL-6 ELISA Kit (Picokine EK0412), Sıçan ELISA Kit (EIA-2693 DRG Estradiol Elisa), İnsan göbek kordonu mezenkimal kök hücre hattı (ATCC Normal Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells, PCS-500-010™). Hoechst

3342 (Sigma B2261-25mg bisBenzimide H 33342 trihydrochloride), (Bayer), DMEM F12 (Sigma-Aldrich, D8900-10L), DMSO (Sigma-Aldrich), Fetal bovine serum FBS, (Panbiotech P30-3306), Trypsin/EDTA, Mikrotom bıçağı (Feather A35), hidrofobik kalem, Pozitif şarjlı lam, lamel 10 µl, 100 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik mikropipet ve uçları, 25 cm²'lik ve 75 cm²'lik hücre kültür kapları, insülin enjektörü, ependorf tüpü, santrifüj tüpü, Neubauer lamı, bakır grid (EMS G100-Cu).

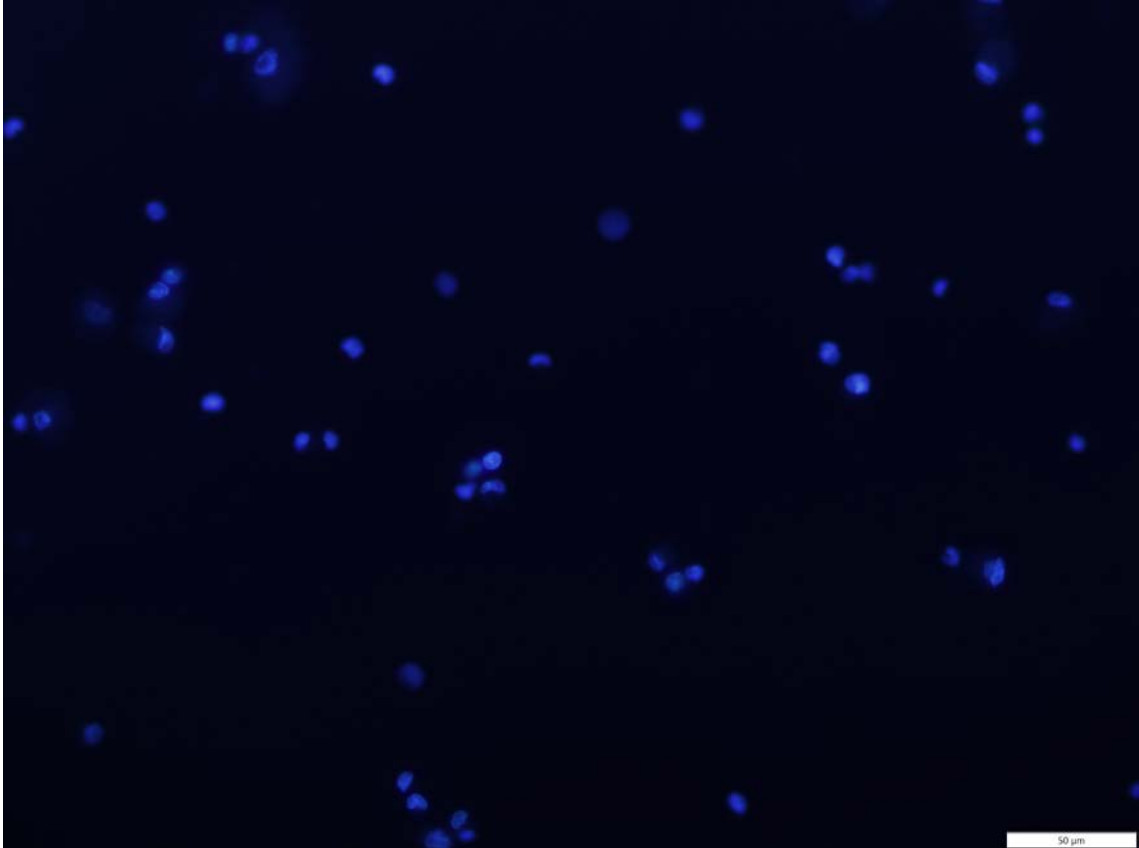
3.4.2. Cihazlar

Doku takip cihazı (Leica TP1020) Mikrotom (Leica RM 2255), Geçirimli Elektron Mikroskobu (JEOL-JEM 1011), Ultramikrotom (EMUC7), Işık Mikroskobu (Olympus BX61), İnkübatör, Santrifüj, Buzdolabı (Arçelik), Manyetik karıştırıcı, Mikroplate okuyucu (Biochrom Anthos Zenyt 200 Microplate Raders) Sterilizasyonu yapılmış sınıf II laminar havalandırma tezgâhı.

4. BULGULAR

4.1. Florasan Mikroskopi Bulguları

Transplantasyon öncesi canlı MKH'ler Hoescht 3342 boyanarak DNA'ları işaretlendi. Florasan mikroskopi altında hücre DNA'ları mavi renkte gözlemlendi (Şekil4-1). Hoescht 3342 ile işaretli MKH'lerin transplantasyon sonrası ovaryum dokusuna migrasyonunu değerlendirmek için tüm grupların ovaryum dokusu parafin bloklarından alınan kesitler florasan mikroskopunda analiz edildi. OHSS+MKH ve MKH gruplarında mavi renkte ışımaya gözlenirken hücre transplantasyonu yapılmayan Kontrol (Şekil4-2) ve OHSS (Şekil4-3) gruplarında ışımaya gözlenmedi. Hoescht 3342 ile işaretli MKH'ler, ovaryum dokusunda vasküler alanlarda ve stromada görüldü. OHSS+MKH (Şekil4-4) grubunda ovaryum stromasında ve vasküler alanda görülen ışımaya MKH grubuna(Şekil 4-5) kıyasla daha fazlaydı.



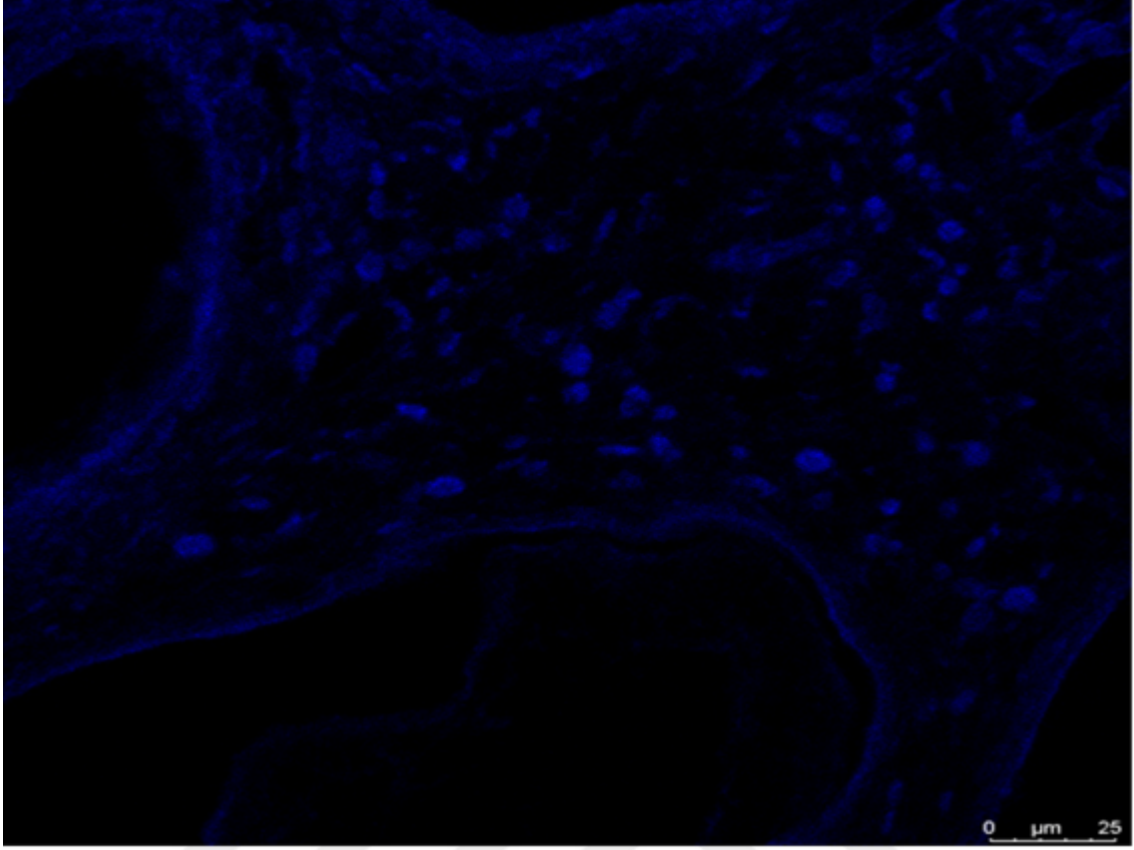
Şekil 4-1: Transplantasyon öncesi Hoescht 3342 ile işaretlenen MKH hücrelerinin florasan mikrografı, Bar 50 µm.



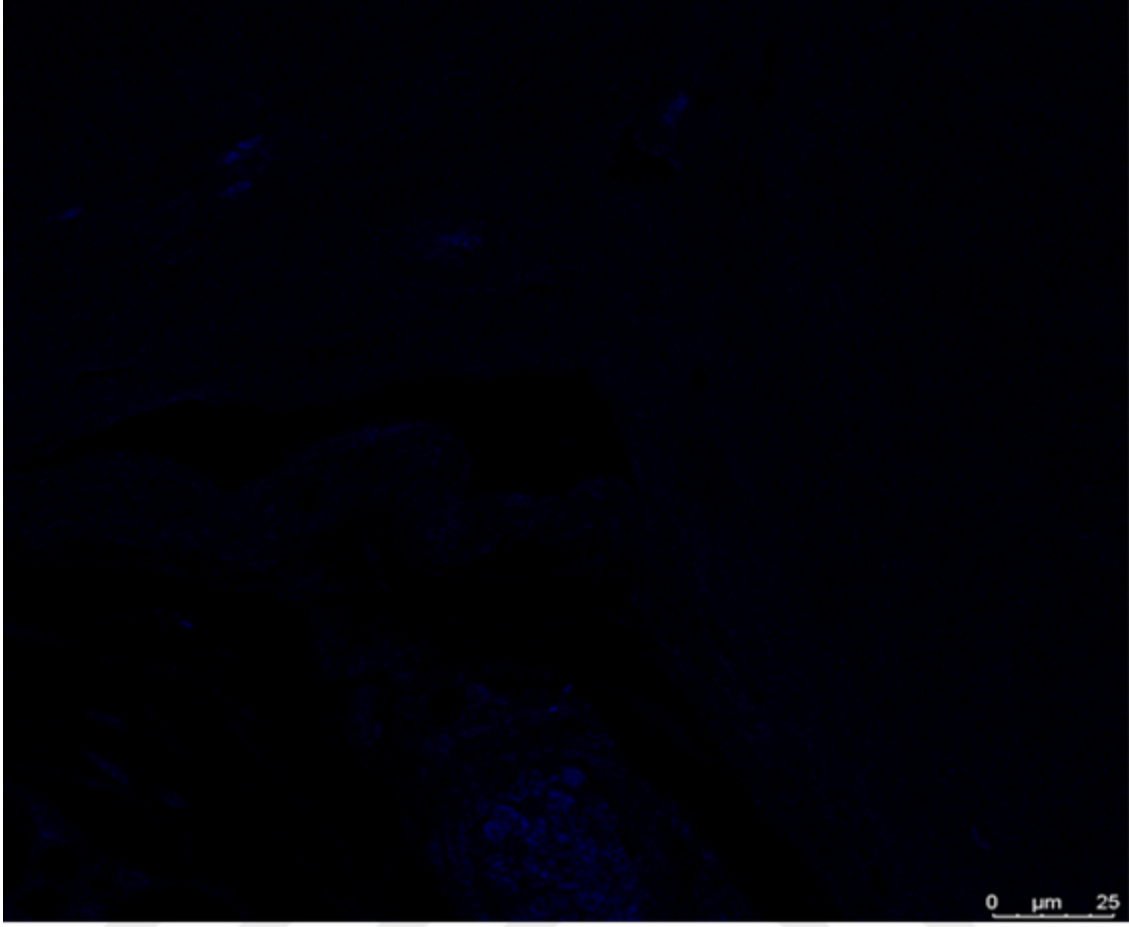
Şekil 4-2: Kontrol grubu vasküler alan florasan mikrofrafı. Bar 25 µm



Şekil 4-3: OHSS grubu, vasküler alan florasın mikroskopi fotoğrafı. Bar 25 μm



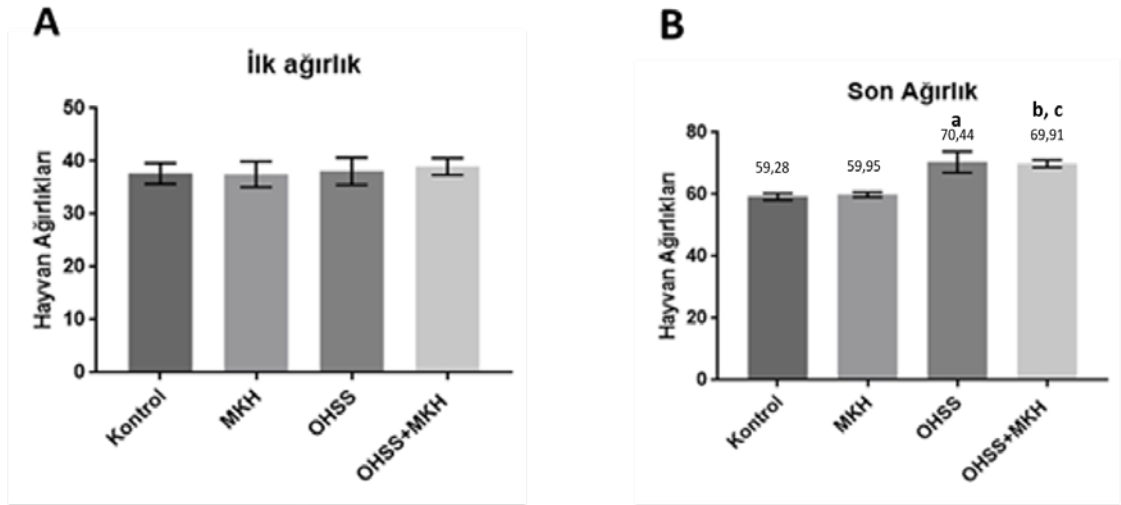
Şekil 4-4: OHSS+MKH grubu vasküler alan florasın mikrografı. Bar 25 μm



Şekil 4-5: MKH grubu vasküler alan florasan mikrografı. Bar 25 μ m

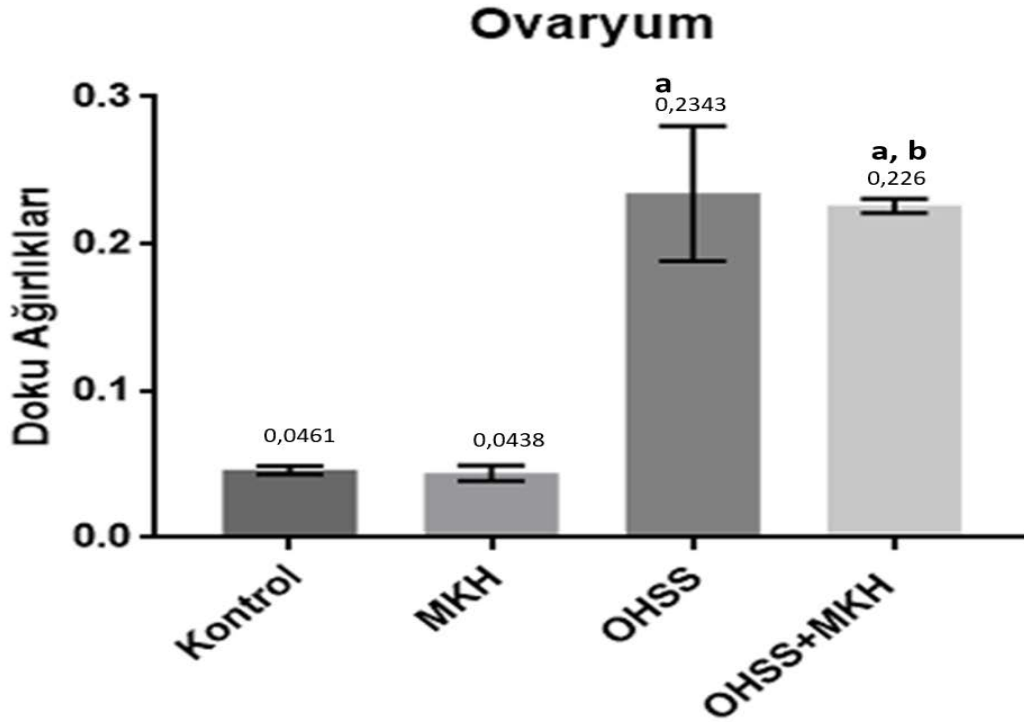
4.2. Hayvan ve Ovaryum Doku Ağırlık Verileri

Deney protokolünün ilk ve son günü bütün gruplardaki hayvanların ağırlık ölçümleri yapılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kontrol ve MKH grupları arasındaki ağırlık artışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). OHSS ve OHSS+MKH gruplarında ise, Kontrol ve MKH gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p \leq 0.001^{***}$). OHSS+MKH grubunda MKH uygulaması ağırlık artışını azaltmış olsada, OHSS grubu ile karşılaştırıldığında bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p = 0,8942$), (Şekil 4-5).



Şekil 4-6: Deney hayvanlarına ait ağırlık değişim grafikleri. A- ilk ağırlık grafiği $p > 0.05$ tüm gruplara göre , B- son ağırlık grafiği $p^a \leq 0.01$, $p^b \leq 0.05$; Kontrol grubuna göre, $p^c > 0.05$; OHSS grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi (n=6)

Sakrifikasyon sonrasında bütün gruplardan alınan sağ ovaryum dokularının ağırlık ölçümü yapıldı ve istatistiksel olarak gruplar arasındaki farklılıklar analiz edildi. Kontrol ve MKH gruplarında ovaryum ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0.05$). OHSS ve OHSS+MKH gruplarında ovaryum ağırlıkları, Kontrol ve MKH grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p \leq 0.05$). OHSS+MKH grubunda, MKH uygulamasının ovaryum ağırlıkları üzerinde bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi, OHSS ve OHSS+MKH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$), (Şekil 4-6).



Şekil 4-7: Ovaryum ağırlık grafiği. $p^a \leq 0.05$ kontrol grubuna göre, $p^b > 0.05$ OHSS grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi (n=6)

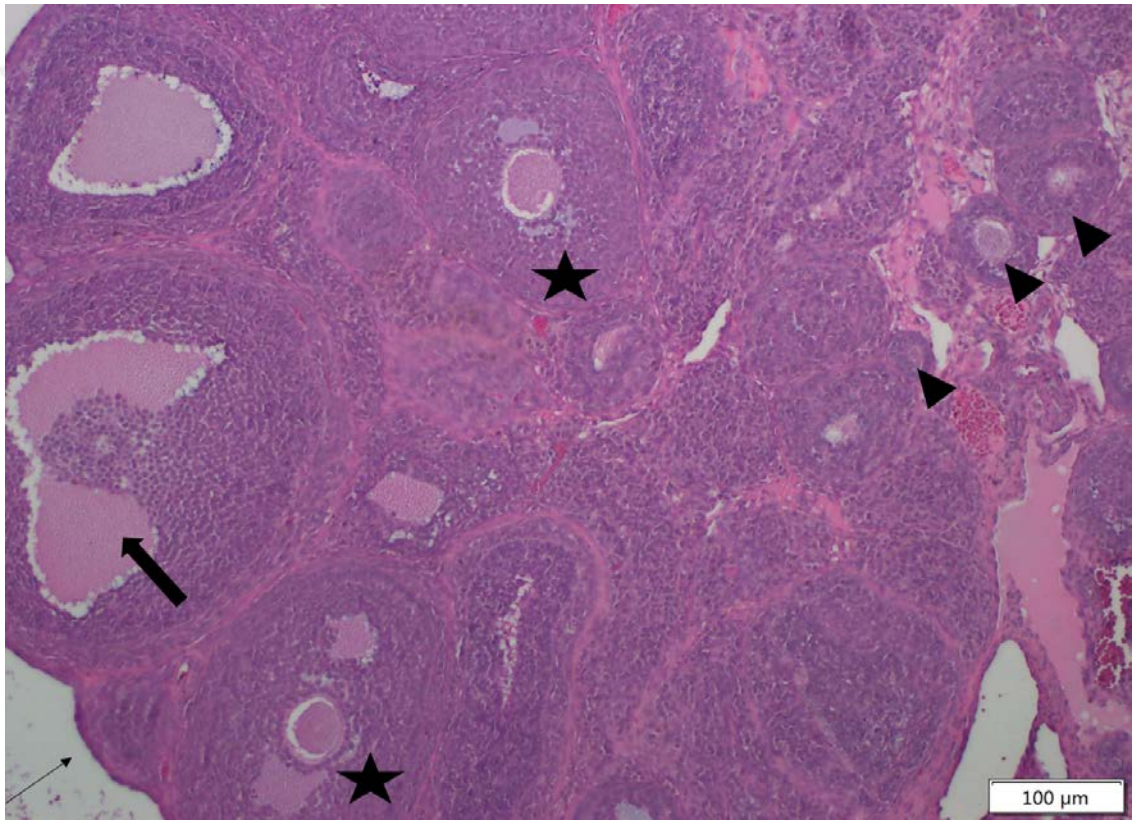
4.3. Işık Mikroskopi Bulguları

4.3.1. Hematoksilen Eozin Boyası

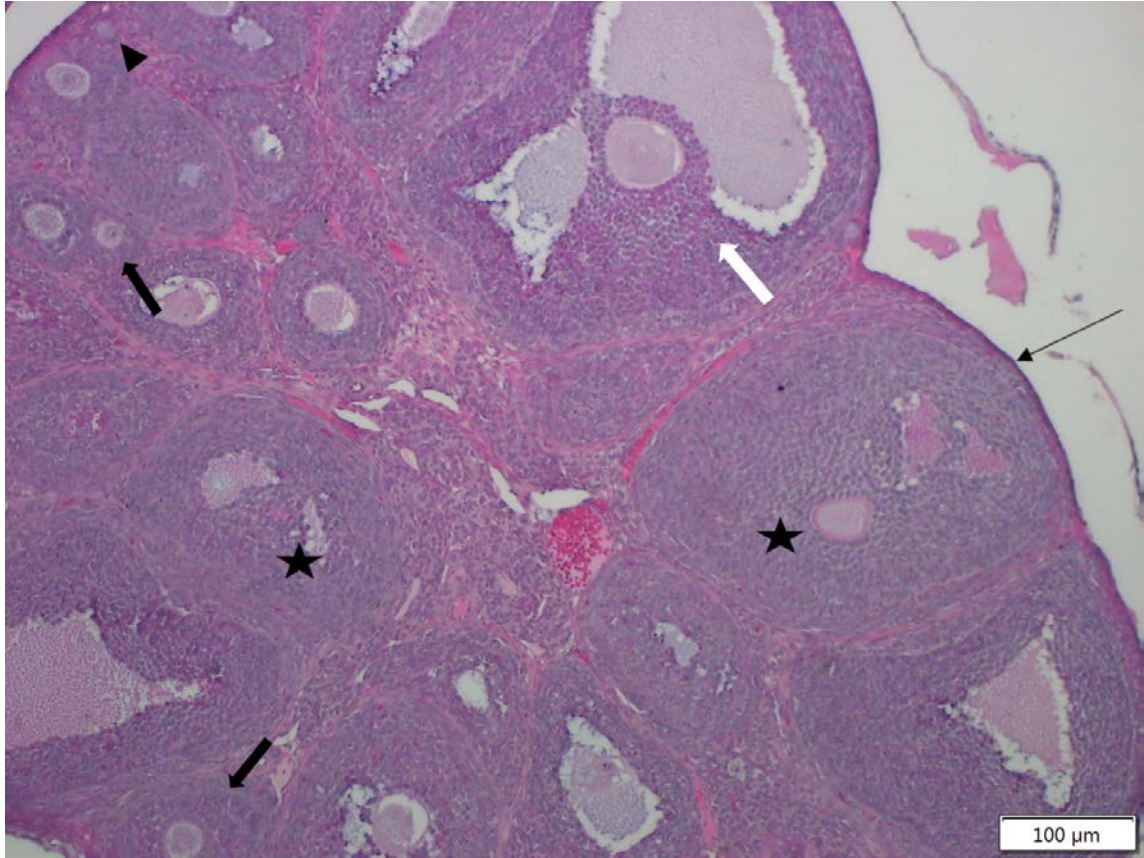
Ovaryum dokularını içeren parafin bloklardan alınan seri kesitler H&E boyası uygulanarak genel morfoloji, tüm ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapıları değerlendirildi. Kontrol ve MKH gruplarında ovaryum dokusu stabil bir yapı gösterdi. Germinal epitel tek katlı yassı yer yer tek katlı kübik formdaydı ve altında yer alan tunika albuginea tabakası normal görünümdeydi. Ovaryum korteks medulla hatları belirgindi. Kortekste tüm folikül yapıları (primordial, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graff) görüldü. Folikül hücrelerinin nukleusları, aktivitesiyle uyumlu olarak ökromatik soluk boyanma gösterdi (Şekil4-8,9).

OHSS grubunda ovaryum boyutunda belirgin bir artış gözlenirken germinal epitel ve tunika albuginea tabakası normal görünümdeydi. Ovaryum korteksinde tüm folikül yapıları (primordial, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graff) gözlemlendi fakat neredeyse tüm kortekse yayılan, dışta teka lutein hücreleri ile çevrili, içte poligonal şekilli, soluk sitoplazma içeren granüloza lutein hücrelerinden oluşan korpus

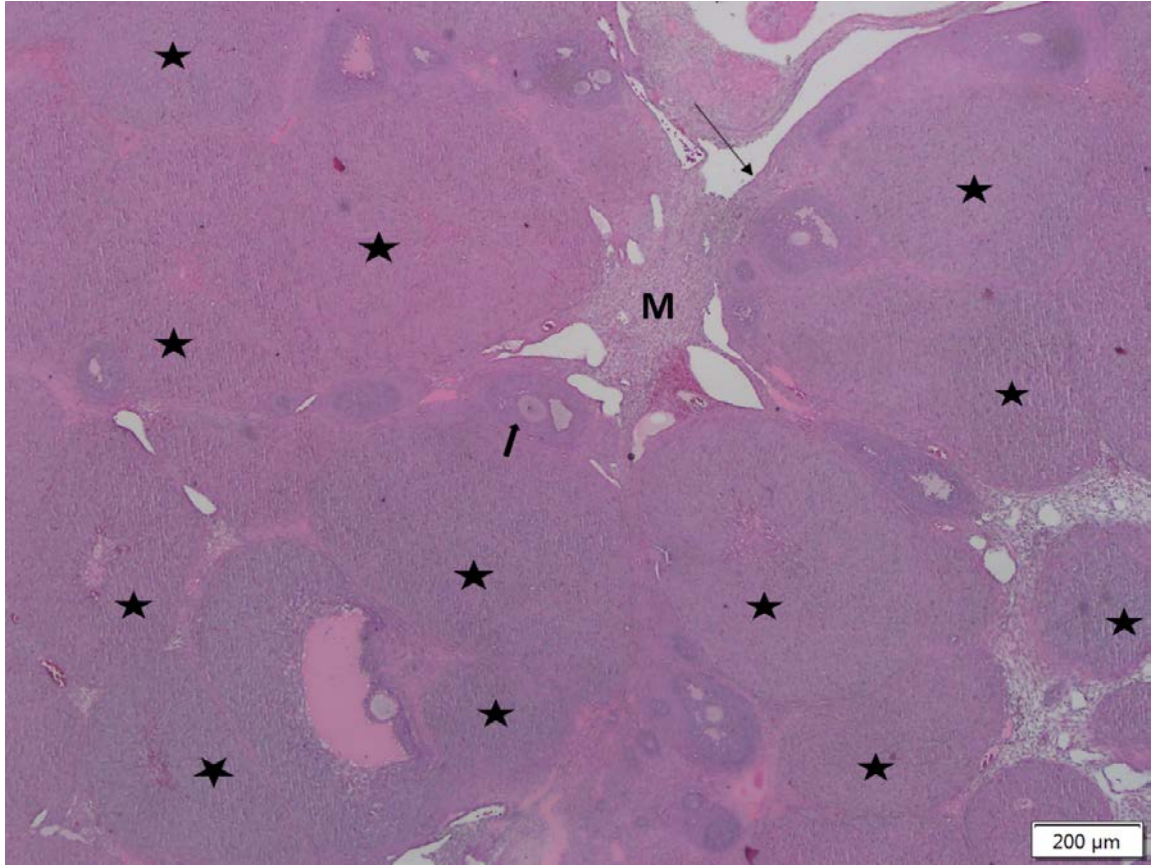
luteum yapıları daha belirgin ve fazlaydı. Korpus luteum yapılarında ve interstisyel alanlarda çok sayıda hemorajik alan ve vasküler dilatasyon gözlendi. Özellikle intertistiyal alanlarda ödem belirgindi. Ayrıca folikül kavitesinde çok sayıda nekrotik granüloza hücrelerinin meydana getirdiği debris yapısı izlendi. Korpus luteum sayı ve boyutlarının artışı ile artan korteks alanına karşılık medulla bölgesi iç kısımda vasküler dilatasyonların ve hemorajik alanların yoğunlukta olduğu daha dar bir alan olarak gözlendi (Şekil4- 10, 11, 12, 13, 14, 15,16), OHSS+MKH grubunda ise OHSS grubuna kıyasla interstisyel ödem, korpus luteum sayısında ve hemorajik alanlarda azalış gözlenirken folikül sayısında artış vardı (Şekil4-17, 18).



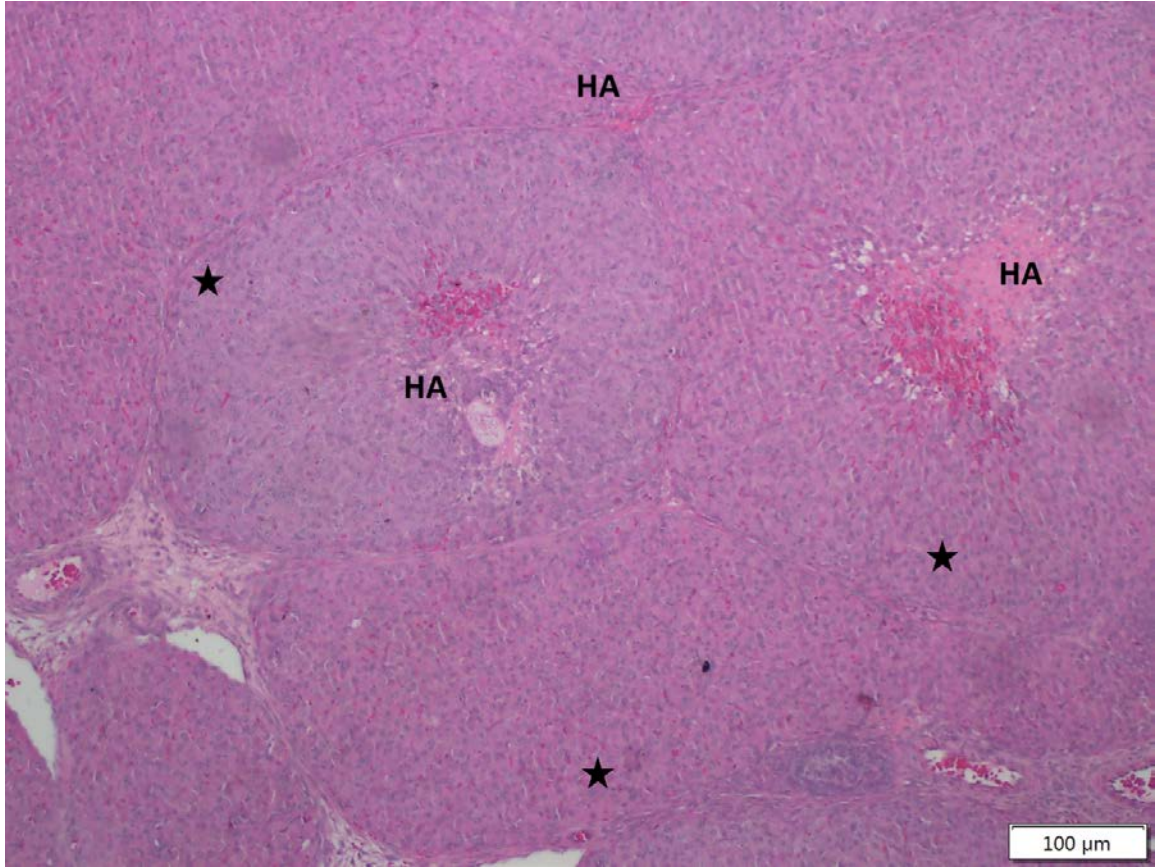
Şekil 4-8: Kontrol grubu, ovaryum dokusu ışık mikroskopi. Graff folikülü (kalın ok), sekonder folikül (asteriks), multilaminar primer folikül (ok başı) germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 100 µm.



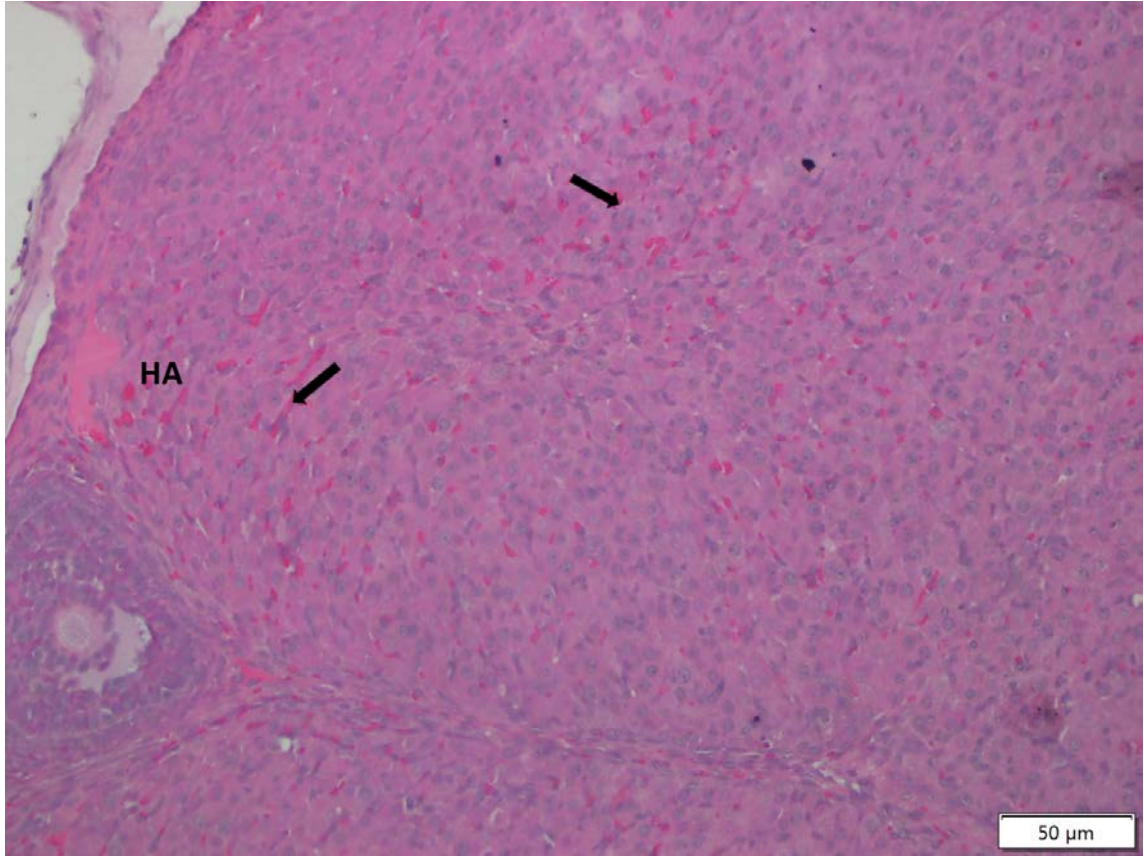
Şekil 4-9: MKH grubu, ovaryum dokusu ışık mikrosafı. Graff folikül (beyaz ok), Sekonder folikül (asteriks), multilaminar primer folikül (kalın ok), unilaminar primer folikül (ok başı) germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 100 µm



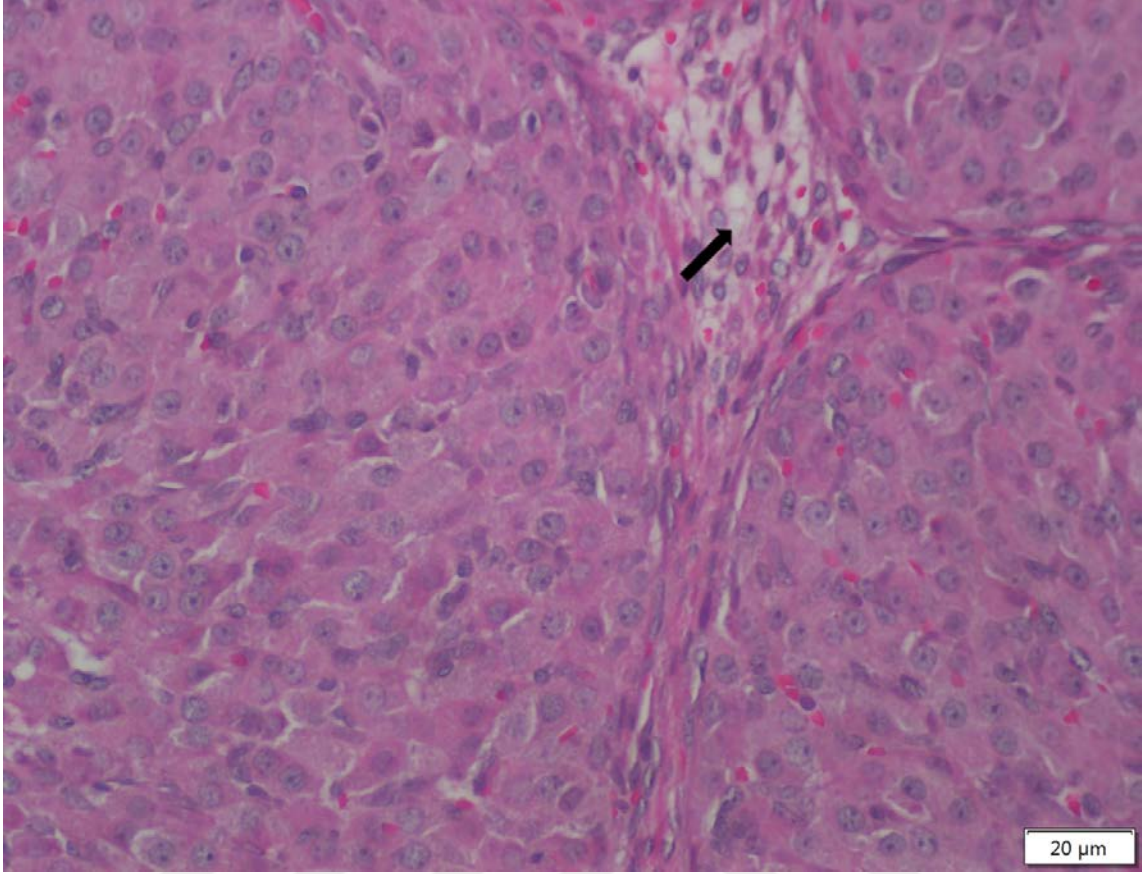
Şekil 4-10: OHSS grubu ovaryum dokusu ışık mikrosafı. Korpus luteum (asteriks) medulla (M), sekonder folikül (kalın ok), germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 200 µm.



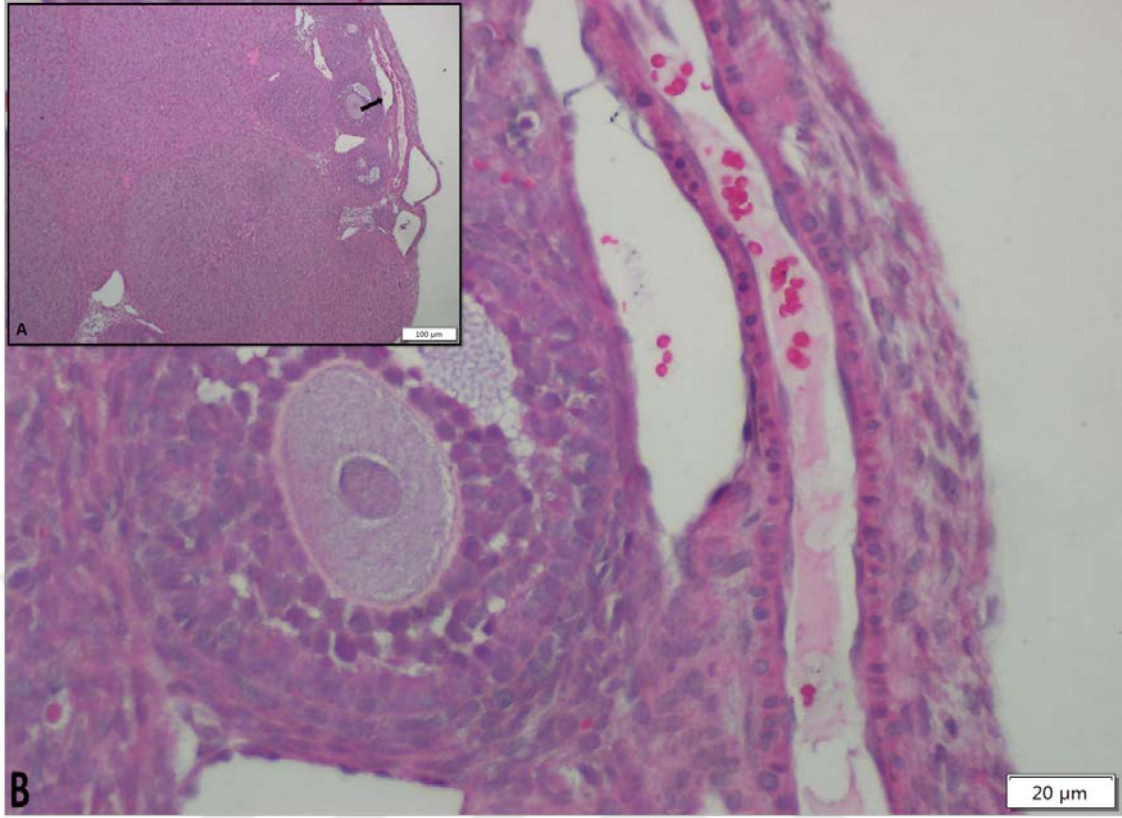
Şekil 4-11: OHSS grubu ışık mikroskopi. Korpus luteum (asteriks), Hemorajik alanlar (HA). H&E, Bar 100 μm.



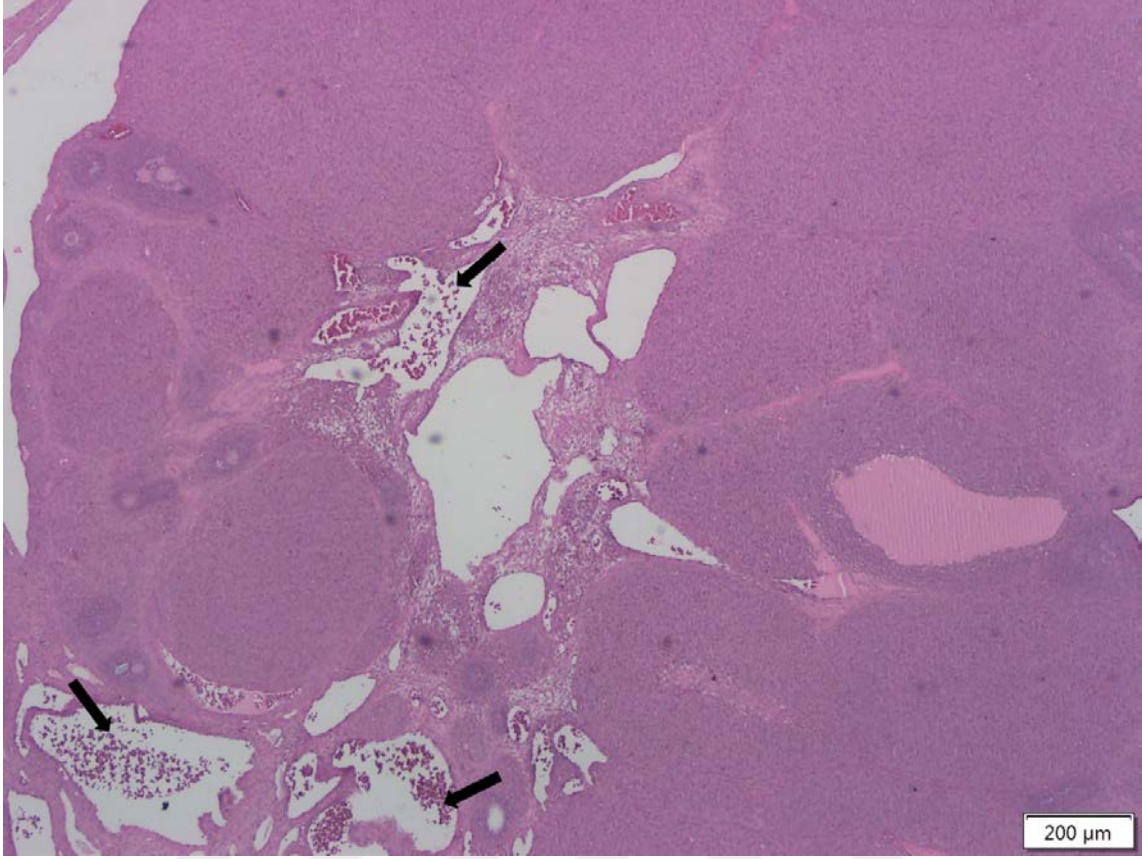
Şekil 4-12: OHSS grubu ışık mikrosafı. Hemorajik alanlar (HA, oklar). H&E, Bar 50 µm.



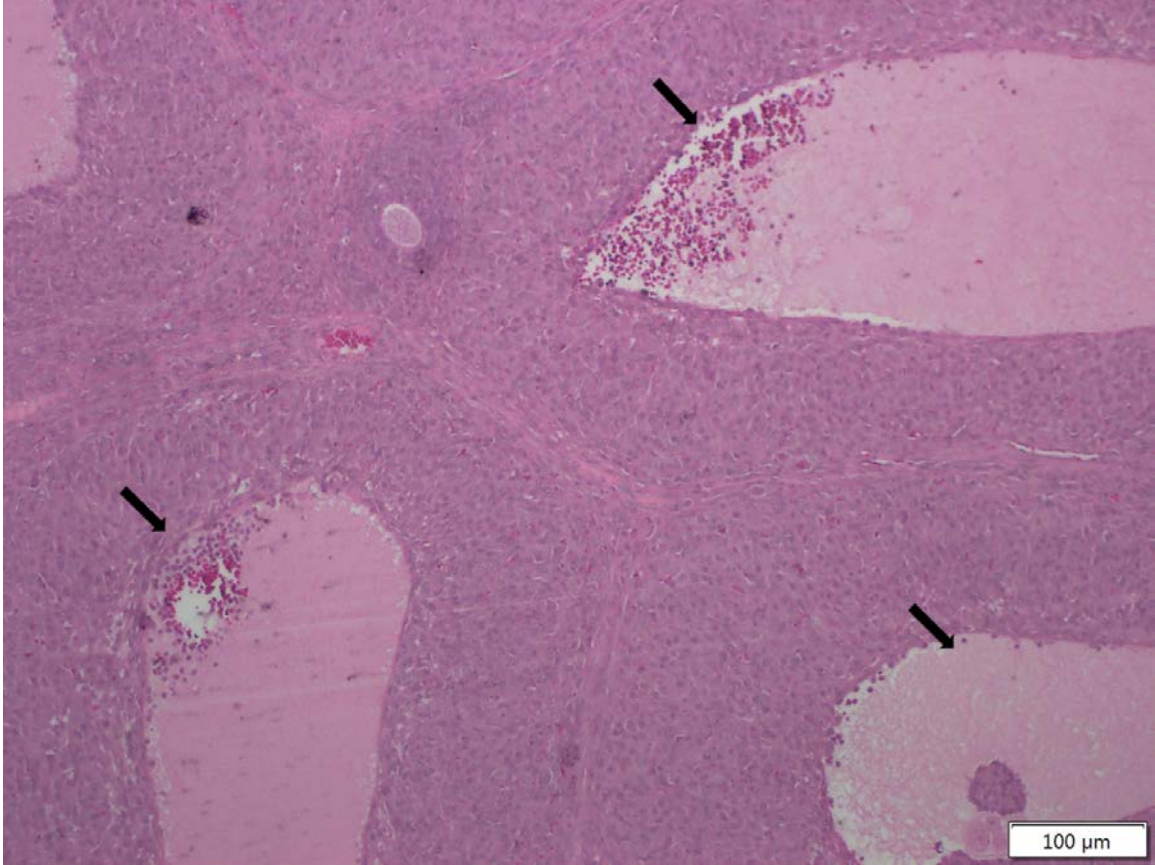
Şekil 4-13: OHSS grubu ışık mikrosafı. İntertistiyal alanlarda ödem. H&E, Bar 20 µm.



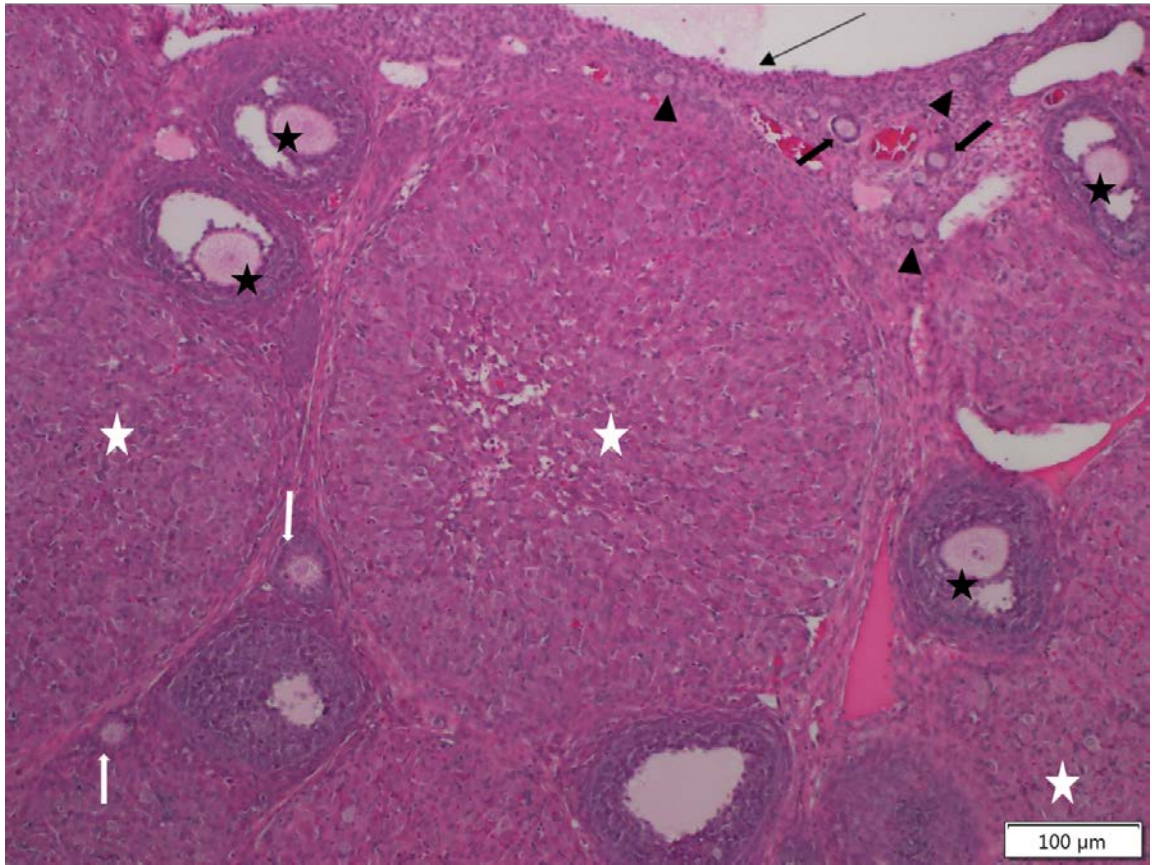
Şekil 4-14: OHSS grubu ışık mikrografı. A- Kortekste vasküler dilatasyon ve korpus luteum yapıları 100 Bar μm . B- Vasküler dilatasyonun büyük büyütmede gösterimi. H&E, Bar 20 μm .



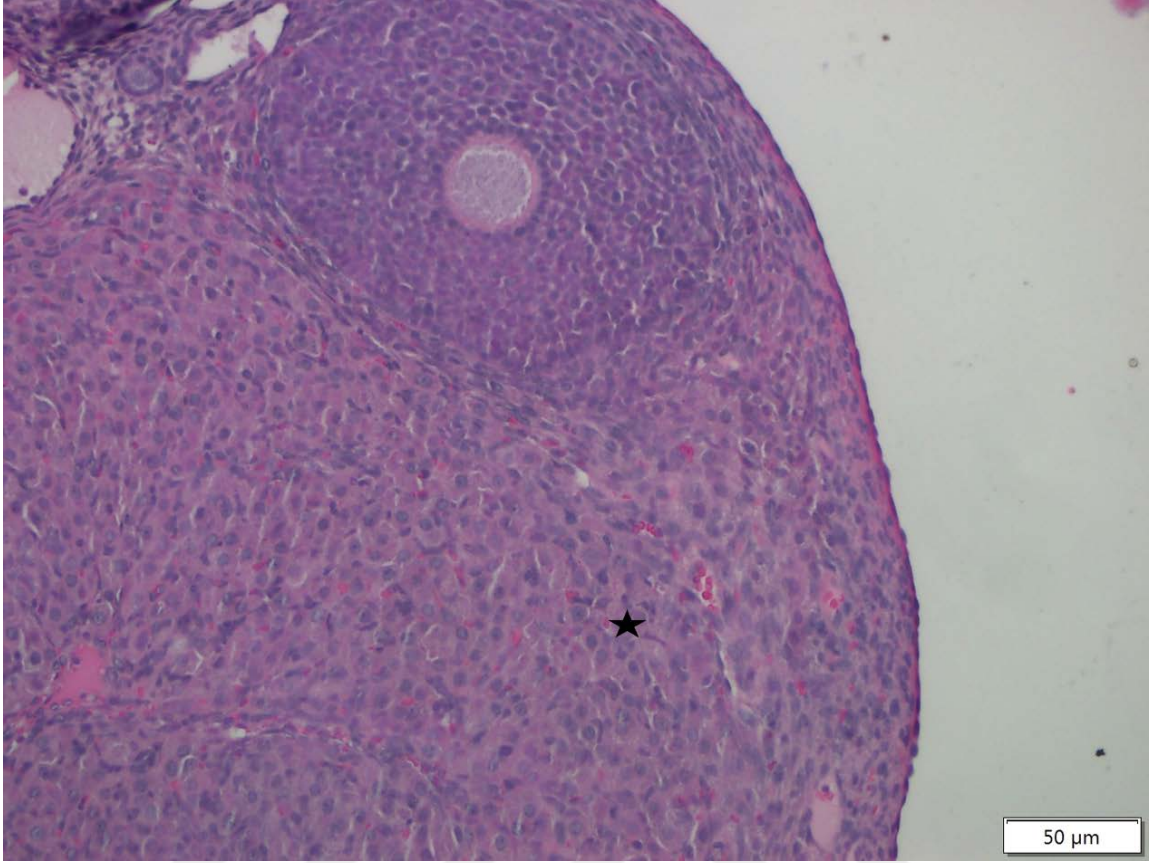
Şekil 4-15: OHSS grubu ışık mikrofrafı. Medullada vasküler dilatasyon. H&E, Bar 200 µm.



Şekil 4-16: OHSS grubu ışık mikroskopi. Atretik foliküller; folikül sıvısı içerisinde apoptoza uğramış granüloza hücreleri ve hemorajik alanlar. H&E, Bar 100 µm



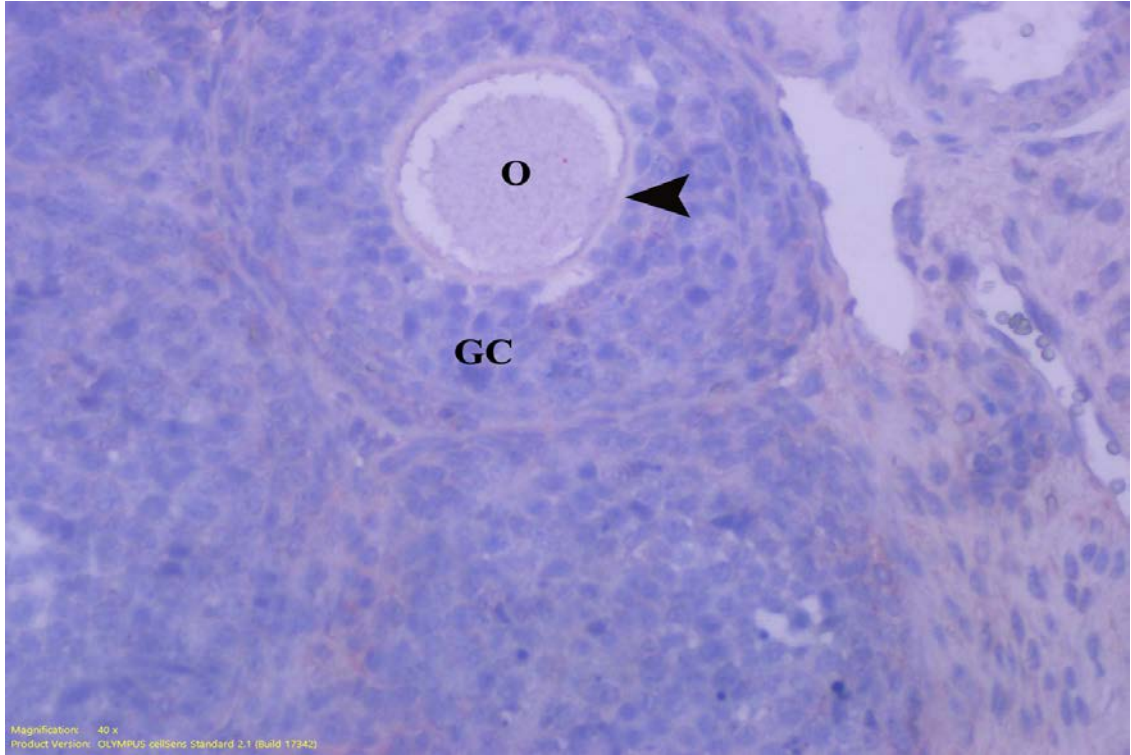
Şekil 4-17: OHSS+MKH grubu ovaryum dokusu ışık mikrosafı. Sekonder folikül (siyah asteriks), multilaminar primer folikül (beyaz ok), unilaminar primer folikül (kalın ok), primordial folikül (ok başı), korpus luteum (beyaz asteriks), germinal epitel (ince ok). H&E, Bar 100 μm.



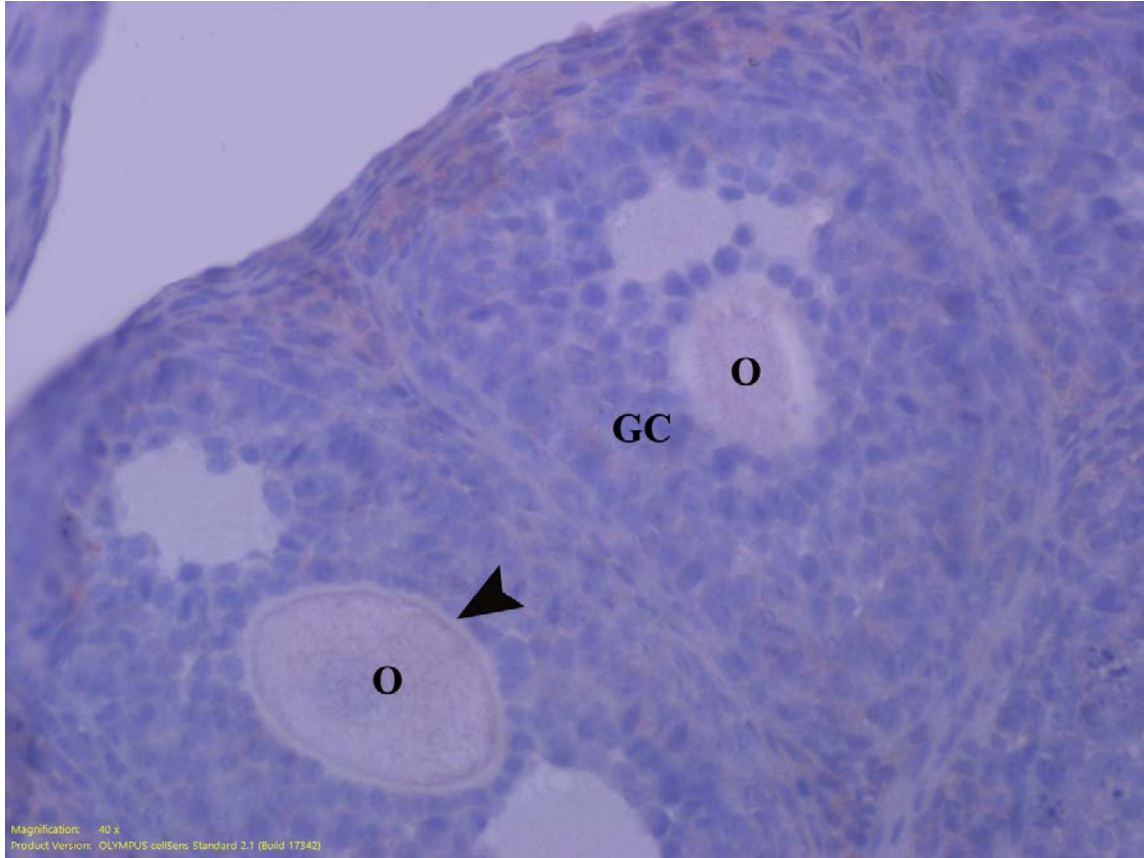
Şekil 4-18: OHSS+MKH grubu ovaryum dokusu ışık mikrografı. Korteks, hemorajik alanlarda azalma (asteriks). Bar 50 µm.

4.3.2. VEGF İmmünohistokimyasal Boyama

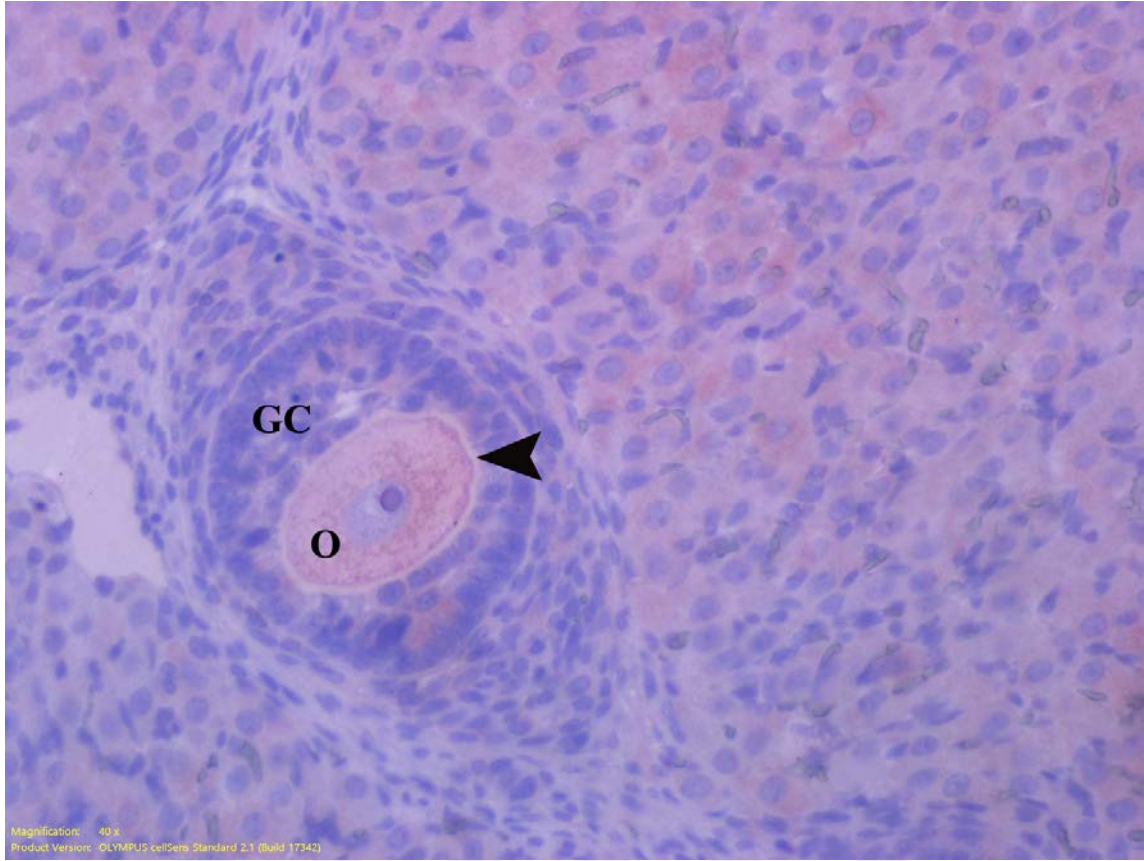
ImageJ görüntü analiz programıyla VEGF antikorunun boyanma miktarına bakıldığında, kontrol ve MKH gruplarının granüloza hücrelerinde VEGF immünohistokimya boyanması zayıftı (Şekil 4-19,20). Kontrol, MKH ve OHSS grupları arasındaki VEGF antikor boyanmasına bakıldığında aralarındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.001$, Tablo4-1). OHSS grubunun VEGF immünohistokimya boyanma şiddetinin kontrol, MKH ve OHSS+MKH gruplarına göre daha koyu ve yaygın bir boyanma göstererek arttığı gözlemlendi (Şekil 4-21). OHSS grubunda VEGF immünohistokimyasal boyanmasında oosit ve zona pellusida ile özellikle korpus luteumdaki granüloza hücrelerinde diğer gruplara göre daha güçlü bir boyanma gözlemlendi. Kapillerlerin stromada ve korpus luteumda granüloza hücre tabakasına doğru penetre olmasıyla boyanmanın daha yoğun olduğu gözlemlendi. OHSS+MKH grubu ile OHSS grubu arasındaki VEGF antikor boyanmasına bakıldığında aralarındaki fark anlamlıydı ($p<0.001$, Tablo4-1). OHSS+MKH grubunda VEGF antikor boyanma yoğunluğu OHSS grubuna göre daha zayıftı (Şekil 4-22). OHSS+MKH grubu ile kontrol ve MKH gruplarının VEGF antikor boyanmasına bakıldığında arasındaki fark anlamlı değildi.



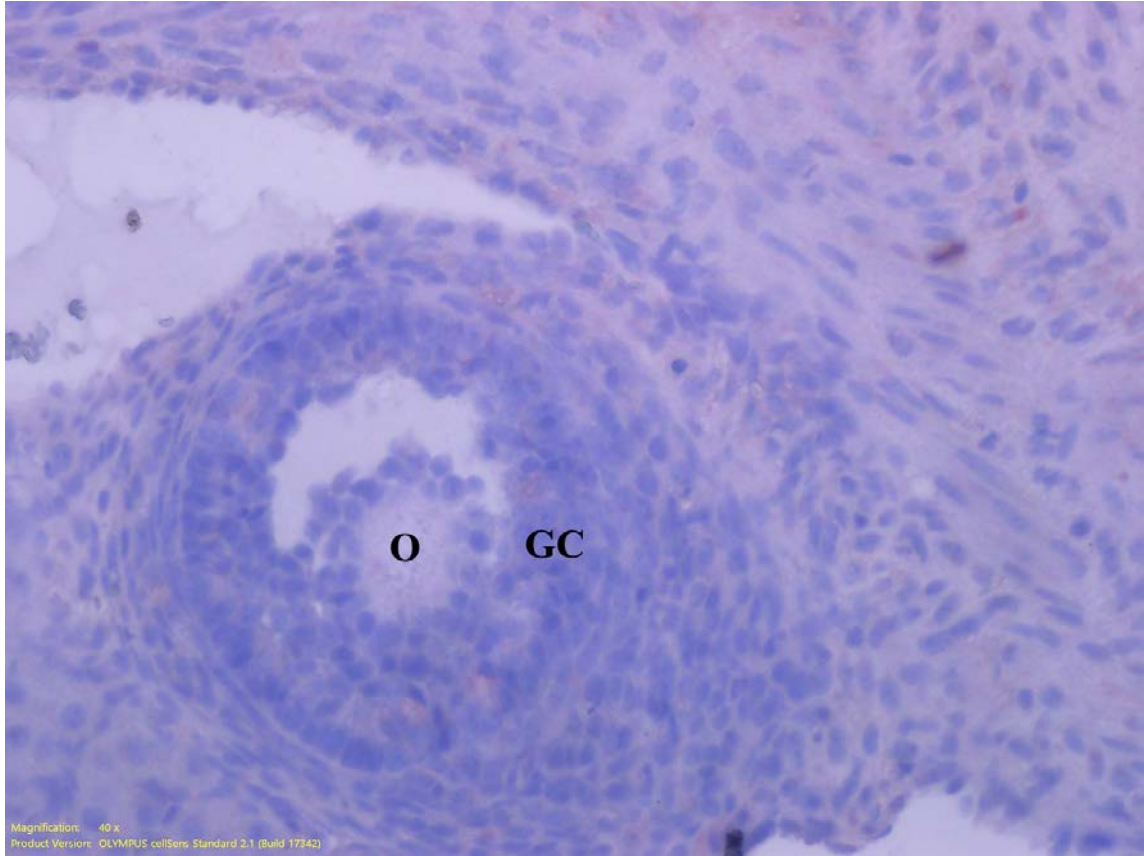
Şekil 4-19:Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikrografı görülmektedir. Oosit (O), granüloza hücreleri (GC) ve zona pellusida ok başı ile gösterilmiştir. Bar 40 µm.



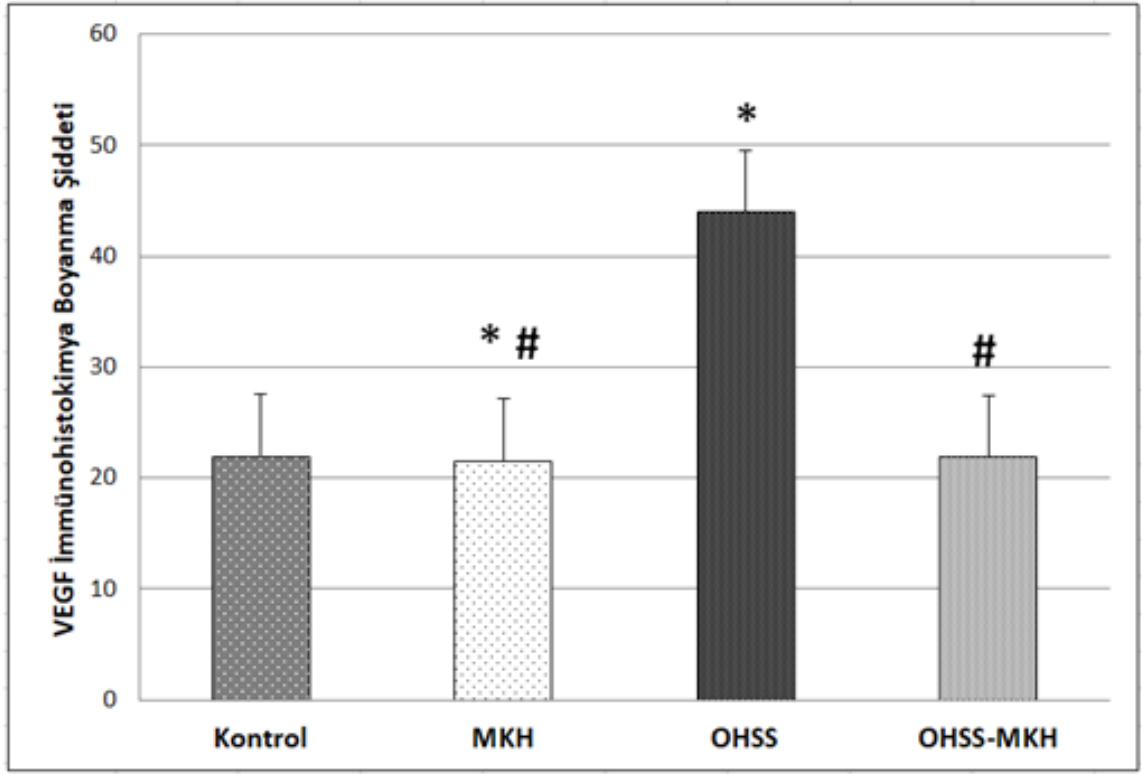
Şekil 4-20: MKH grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikroskobu ile görüntülenmesi. Oosit (O), granüloza hücreleri (GC) ve zona pellusida ok başı ile gösterilmiştir. Bar 40 µm.



Şekil 4-21: OHSS grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikrografı görülmektedir. Oosit (O), granüloza hücreleri (GC) ve zona pellusida ok başı ile gösterilmiştir. Bar 40 µm.



Şekil 4-22: OHSS+MKH grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF immünohistokimya boyanmasının ışık mikrosafı görölmektedir. Oosit (O) ve granöloza hücreleri (GC) gösterilmiştir. Bar 40 µm.



Tablo 4-1: Kontrol, MKH, OHSS ve OHSS+MKH gruplarının, ImageJ görüntü analiz programı kullanılarak, VEGF immünohistokimya boyanma şiddetini gösteren tablo görülmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar * işareti, OHSS grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar # işareti ile belirtilmiştir ($p < 0,001$).

4.3.3. Folikül Sayımı Sonuçları

Bütün deney gruplarının ovaryum dokularından 60 μ m aralıklarla olacak şekilde 3 μ m'lik kesitler alınarak primordial, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graff, atretik folikül ve korpus luteum sayıları değerlendirildi. Primordial, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graff foliküller için yapılan değerlendirme sonuçları şu şekildeydi; Kontrol grubu ve MKH grubu arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmadı ($p > 0.05$); OHSS ve OHSS+MKH gruplarında, bütün folikül sınıflarında Kontrol grubu ve MKH gruplarına kıyasla anlamlı bir azalış gözlemlendi ($p < 0.0001$); OHSS+MKH grubunda, OHSS grubuna kıyasla folikül sayılarında artış meydana gelse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (sırasıyla p değerleri $p = 0,5680$, $p = 0,9599$, $p = 0,9864$, $p = 0,2518$, $p = 0,1172$). Korpus luteum ve atretik folikül sayısı Kontrol ve MKH gruplarına kıyasla OHSS ve OHSS+MKH gruplarında anlamlı derecede arttı ($p < 0,0001$). OHSS+MKH grubunda MKH uygulaması korpus luteum ve atretik folikül sayısını azaltsada, OHSS grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak

anlamlı bulunmadı (sırasıyla p değerleri $p=0,7586$, $p=0,4551$). Kontrol ve MKH grupları arasında korpus luteum ve atretik folikül sayılarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$), (Tablo4-1).

	KONTROL	MKH	OHSS	OHSS+MKH
Primordial F.	170,5 ± 7,215	166,2 ± 5,492 ^b	53,33 ± 8,269 ^a	66 ± 6,055 ^{a,d}
Unilaminar Primer F.	46,5 ± 3,041	45,33 ± 2,848 ^b	15,5 ± 4,87 ^a	17,83 ± 1,956 ^{a,d}
Multilaminar Primer F.	78,17 ± 3,361	61 ± 4,775 ^c	28,33 ± 2,716 ^a	26,67 ± 2,716 ^{a,d}
Sekonder F.	60,83 ± 0,8333	59,83 ± 1,352 ^b	19,5 ± 4,039 ^a	26,67 ± 3,007 ^{a,d}
Graaf F.	12,17 ± 0,4773	12,17 ± 0,6009 ^b	2,5 ± 0,8466 ^a	5 ± 0,9661 ^{a,d}
Atretik F.	15,67 ± 1,647	10,83 ± 0,3073 ^b	47,83 ± 4,028 ^a	42,67 ± 2,155 ^{a,d}
Korpus Luteum	7 ± 1,342	8 ± 0,2582 ^b	207,8 ± 27,85 ^a	187,3 ± 9,265 ^{a,d}

Tablo 4-2 : Deney gruplarına ait ovaryum folikül sayıları. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. (n=6), F: folikül. ^a $p < 0,0001$, ^b $p > 0.05$, ^c $p \leq 0.05$ Kontrol grubuna göre, ^d $p > 0.05$ OHSS grubuna göre. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir (n=6).

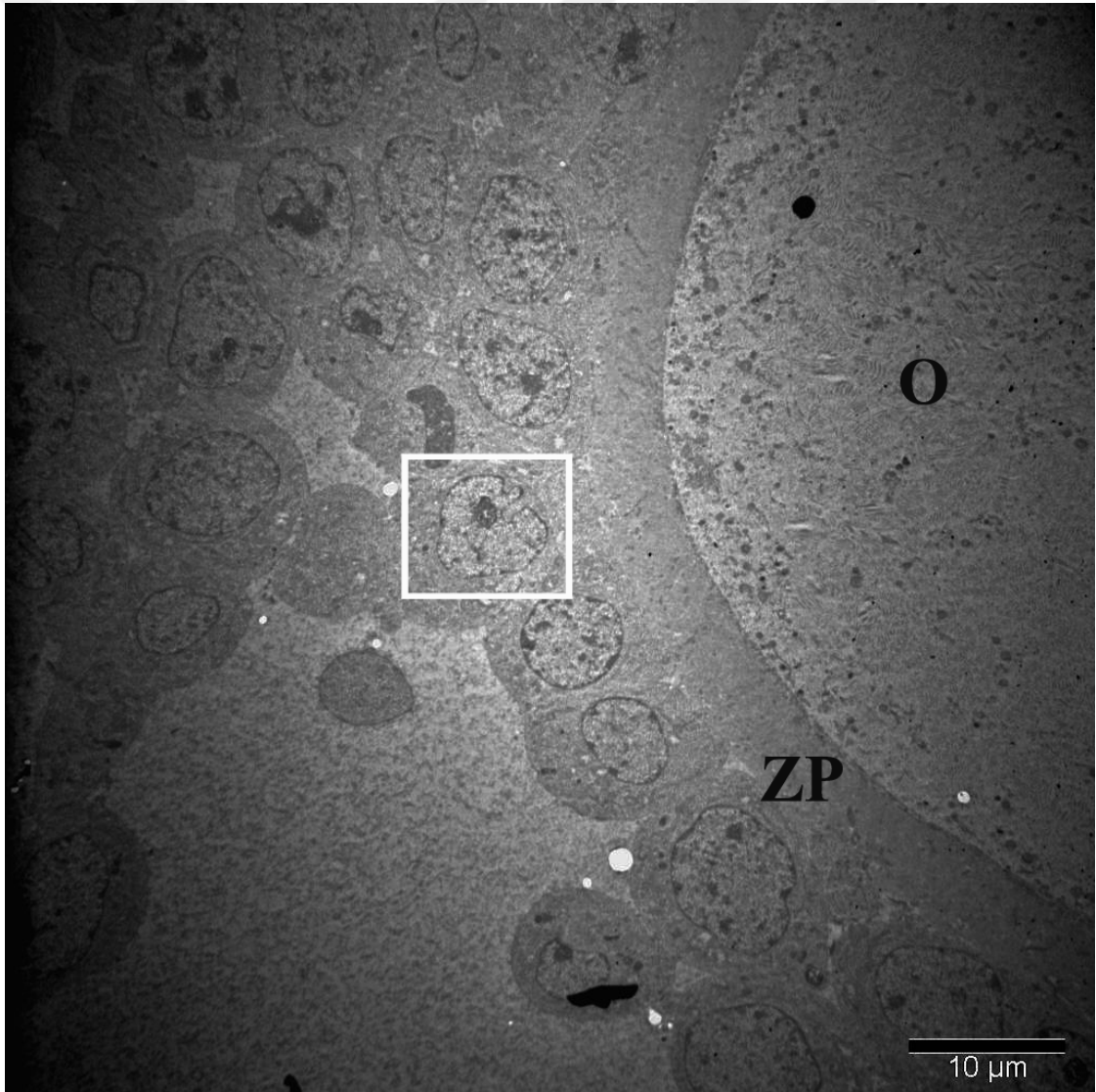
4.4. Elektron Mikroskopi Bulguları

Her grupta oosit içeren elektron mikroskop kesitlerinde, oositi çevreleyen küboid granüloza hücrelerinin ultrastrüktürel yapıları incelendi (Şekil 4-23). Kontrol grubu elektron mikroskopik incelemesinde granüloza hücrelerinin yer yer derin invajinasyonlar içeren oldukça büyük bir nukleusa ve bir veya birden fazla nukleolusa sahip oldukları gözlemlendi. Sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum sisternaları, ribozomlar, lipid damlacıkları ve veziküller gözlemlendi (Şekil 4-24).

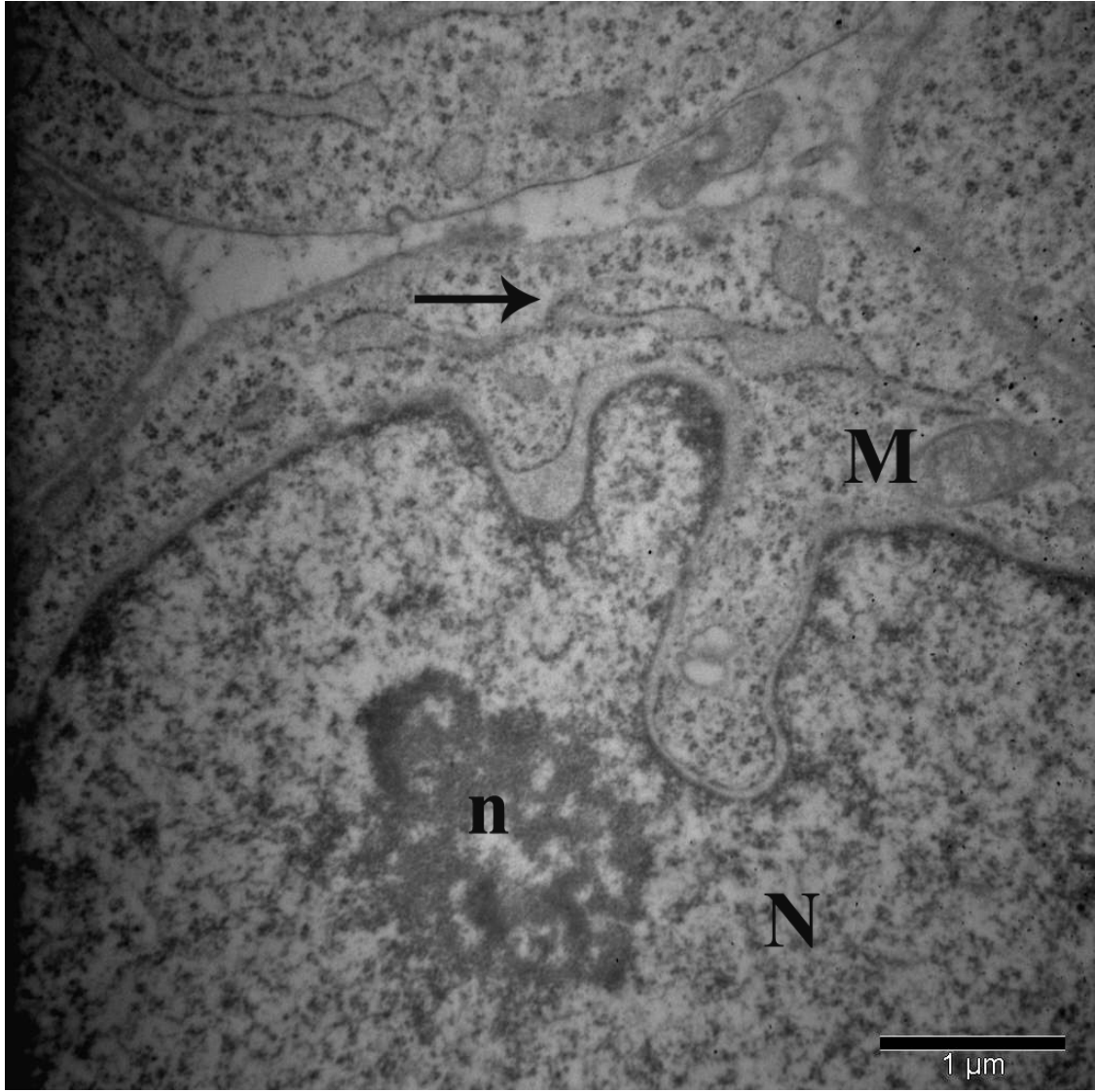
MKH grubuna ait elektron mikroskopik incelemede granüloza hücrelerinin büyük bir nukleus ve bir veya birden fazla nukleolusa sahip oldukları gözlemlendi. Sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum, ribozom, lipid damlacıkları ve veziküller gözlemlendi (Şekil 4-25).

OHSS grubu elektron mikroskopik incelemesinde granüloza hücrelerinin bir nükleus ve bir veya daha fazla nükleolusa sahip oldukları gözlemlendi. Sitoplazmalarında az sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum sisternaları, ribozomlar ve veziküller gözlemlendi. Granüloza hücrelerinin sitoplazmasının büyük bir bölümünü kapsayan yer yer materyalle dolu büyük çaplı vakuoller olduğu gözlemlendi (Şekil 4-26).

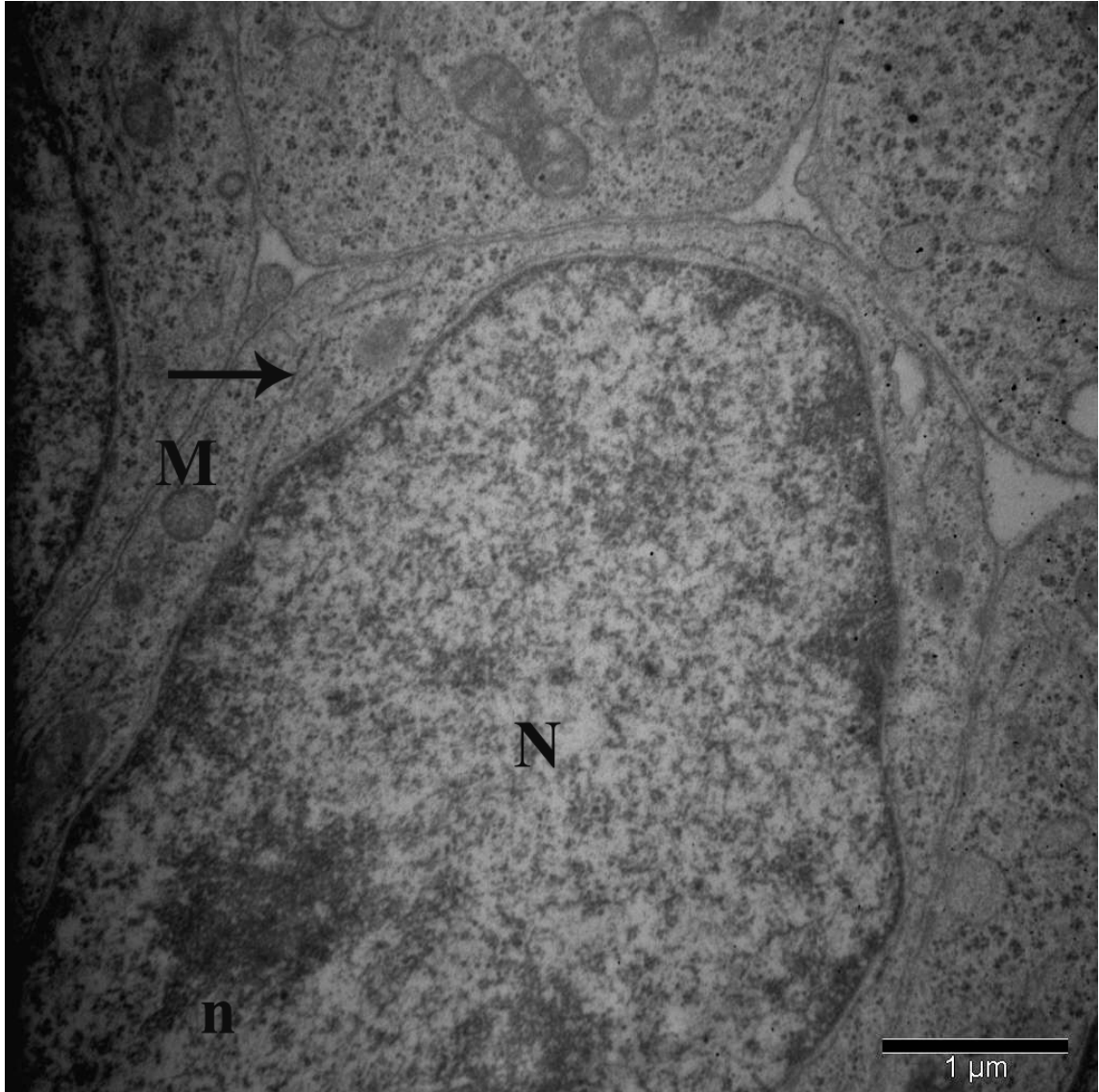
OHSS+MKH grubunda granüloza hücrelerinin büyük bir nükleus ve çok sayıda nükleoluslara sahip oldukları gözlemlendi. Sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum sisternaları, ribozomlar ve veziküller gözlemlendi. Granüloza hücrelerinin sitoplazmasında OHSS grubundaki gibi büyük vakuoller gözlenmedi (Şekil 4-27).



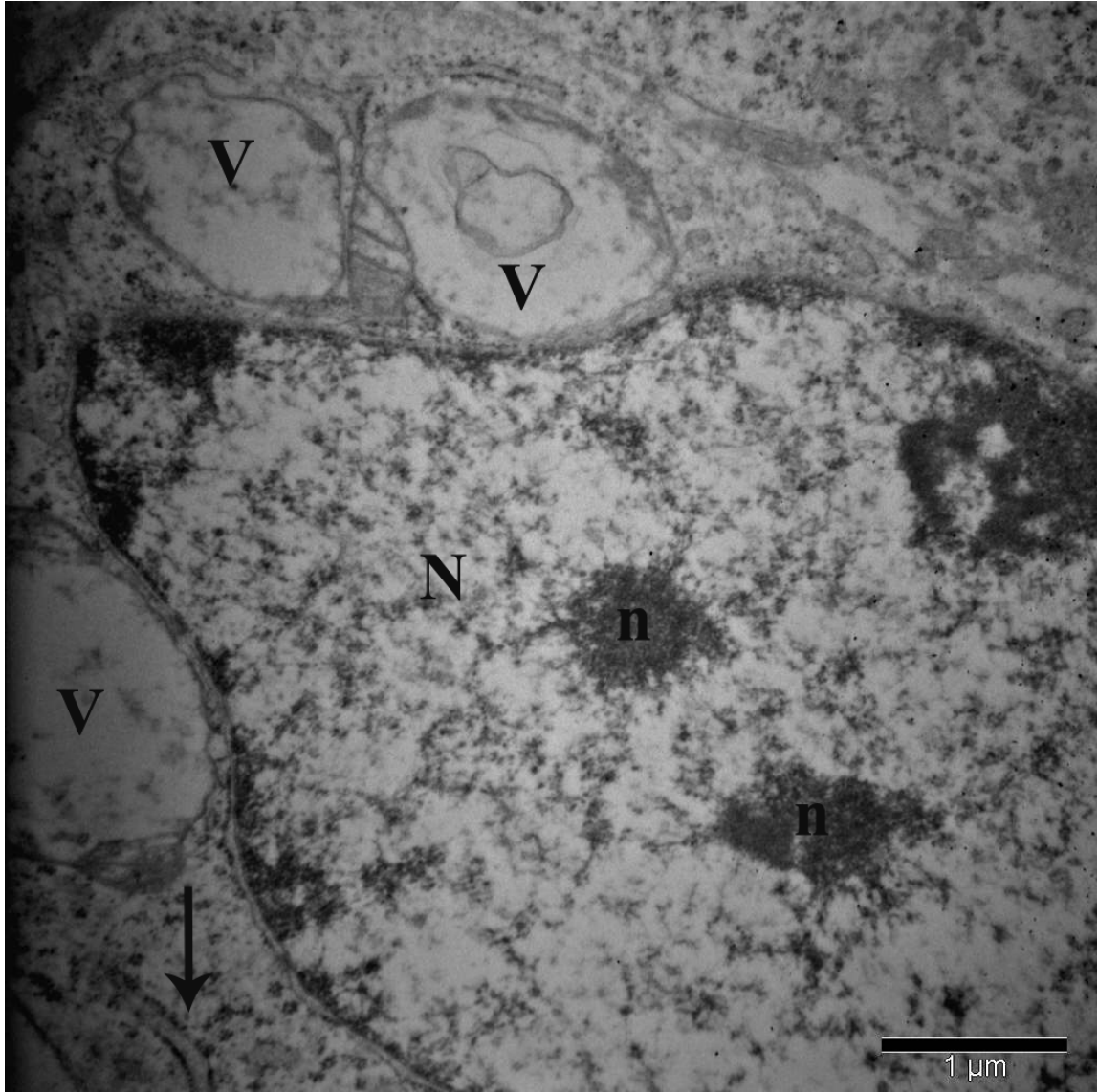
Şekil 4-23: Kontrol grubuna ait elektron mikrografında oosit (O), zona pellusida (ZP), ve kare ile işaretlenen alanda inceleme için seçilen granüloza hücresi görülmektedir. Bar 10 µm.



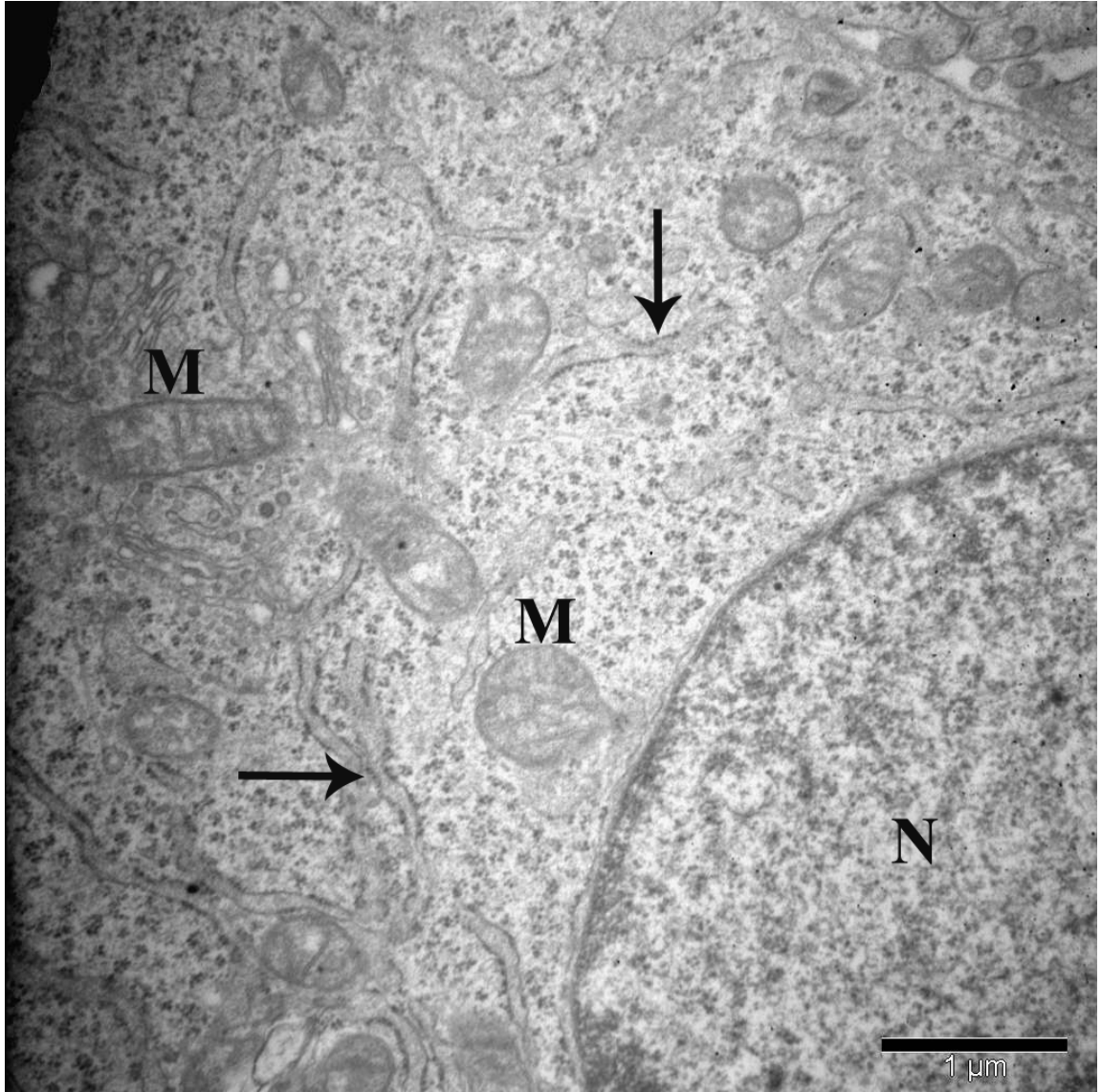
Şekil 4-24: Kontrol grubuna ait granüloza hücresinin elektron mikrografı görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), mitokondri (M) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.



Şekil 4-25: MKH grubuna ait granüloza hücresinin elektron mikrografı görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), mitokondri (M) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.



Şekil 4-26: OHSS grubuna ait granüloza hücresinin elektron mikrografı görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), vakuol (V) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.

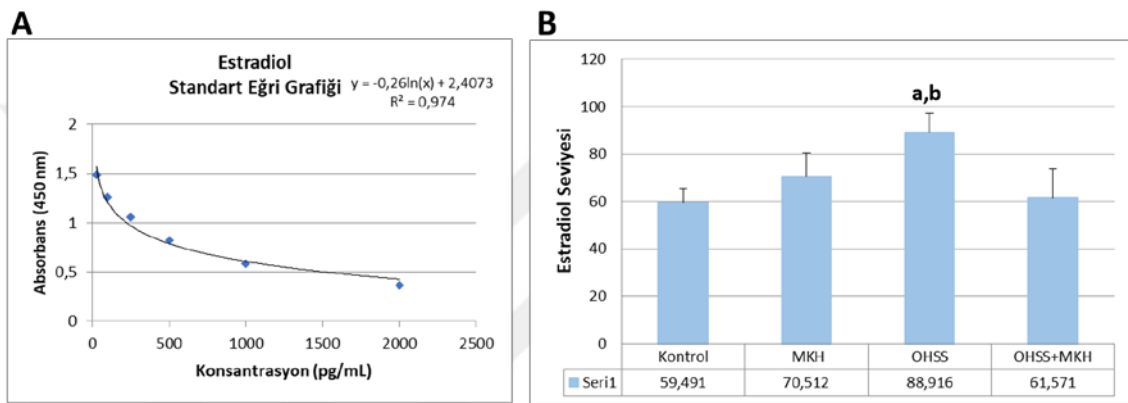


Şekil 4-27: OHSS+MKH grubuna ait granüloza hücresinin elektron mikrografı görülmektedir. Nukleus (N), nukleolus (n), vakuol (V) ve endoplazmik retikulum ok ile gösterilmiştir. Bar 1 µm.

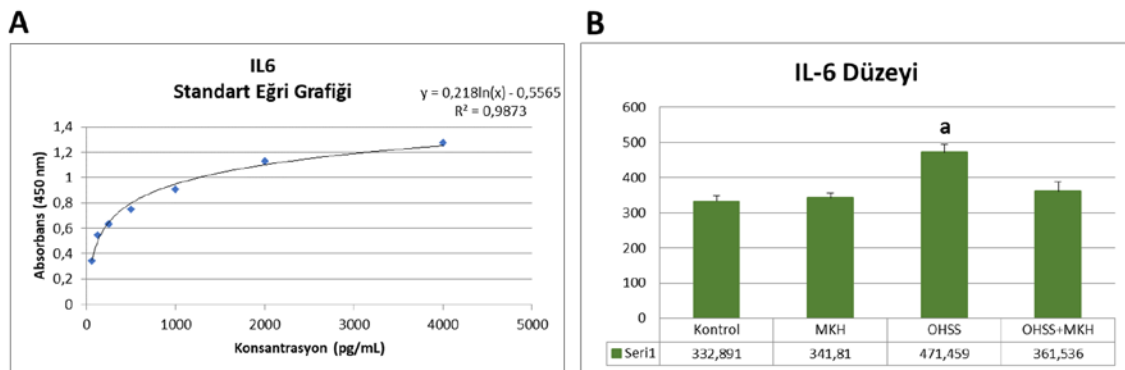
4.5. Estradiol ve IL-6 ELISA Sonuçları

Sakrifikasyon öncesi hayvanlardan alınan kanların santrifüj edilmesiyle toplanan serumlarda, E2 hormonu ve IL-6 sitokin seviyelerine ELISA yöntemiyle bakıldı. Standartlardan elde edilen absorbans değerleri baz alınarak absorbans/konsantrasyon eğrisi oluşturuldu ve R^2 değerleri bulundu (E2 $R^2 = 0,974$, IL-6 $R^2 = 0,9873$). Serumlardaki E2 ve IL-6 konsantrasyonları bu denklemler üzerinden pg/ml hesaplandı. Şekil 4-28’de gösterilen sonuçlar analiz edildiğinde E2 seviyelerinde; Kontrol ve MKH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$) OHSS grubunda

E2 seviyesi Kontrol ve MKH grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttı ($p < 0.001$). OHSS+MKH grubunda MKH uygulamasının, E2 seviyelerini OHSS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görüldü ($p < 0.001$). IL-6 için yapılan analiz sonuçları ise şu şekildeydi; Kontrol ve MKH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, OHSS ve OHSS+MKH gruplarında IL-6 seviyesi Kontrol ve MKH grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttı. OHSS+MKH grubunda, MKH uygulamasının OHSS oluşumu ile artan IL-6 seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi ($p < 0.05$), (Şekil 4-29).



Şekil 4-28: A- Estradiol ELISA kiti absorbans/konsantrasyon grafiği. B- Gruplara ait ortalama serum Estradiol seviyeleri, ^a $p < 0,001$, Kontrol ve OHSS+MKH gruplarına göre, ^b $p < 0.05$, MKH grubuna göre. Analiz verileri ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir (n=6)



Şekil 4-29: A- IL-6 ELISA kiti absorbans/konsantrasyon grafiği. B- Gruplara ait ortalama serum IL-6 seviyeleri, ^a $p < 0.05$ Kontrol, MKH ve OHSS+MKH gruplarına göre. Analiz verileri ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir (n=6).

5. TARTIŞMA

İnfertilite insidansı her geçen gün artarken ekonomik, sosyal ve psikolojik bir çok problemi de beraberinde getirmektedir. Yardımcı üreme tedavileri bu bağlamda infertil bireyler için umut vadetmektedir. İlk canlı doğumun gerçekleştiği 1978 yılından günümüze kadar geçen kırk yılda en az 8 milyon IVF bebeği dünyaya gelmiştir (70). Ancak her tedavide olduğu gibi yardımcı üreme tedavileri sırasında da çeşitli komplikasyonlar gelişebilmektedir. OHSS, in vitro/vivo fertilizasyon uygulamaları sırasında hCG ile yapılan ovulasyon indüksiyonu sonucu gelişen en ciddi iatrojenik komplikasyonlardan biridir (1). Daha fazla oosit eldesi için yapılan eksojen gonodotropin uygulamaları ovaryum boyutunda, korpus luteum oluşumunda, serum E2 seviyelerinde ve vasküler permeabilitede artışa neden olmaktadır. Artan vasküler permeabilite ile birlikte hipovolemi, asit, hidrotoraks, hidroperikardiyum, tromboz ve akut respiratuar distres sendromu gibi yaşamı tehdit eden durumların ortaya çıkabildiği OHSS oluşmaktadır (5, 6).

Farklılaşma potansiyelleri, yüksek proliferasyon hızları, migrasyon yetenekleri ve salgıladıkları sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri gibi parakrin etkiler sayesinde MKH'ler, günümüzde güçlü bir terapötik ajan olarak pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (71). Bu çalışmada ilk kez, OHSS modeli oluşturduğumuz ratlarda MKH'nin ovaryum dokusu üzerindeki terapötik etkileri incelenmiştir. Hoescht 3342 ile DNA işaretlemesi yapılan insan göbek kordonu MKH'leri OHSS modeli oluşturulan ratlara intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

MKH'lerin hasarlı dokuya migrasyonu ve yerleşmesinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar MKH migrasyonunda bir çok farklı parametrenin rol aldığını göstermektedir (72, 73). Dokunun vaskülarizasyon düzeyi ve dokuda meydana gelen hasar derecesi migrate olan MKH sayısını etkilemektedir. Transplantasyon sonrası kan damarlarından zengin, yoğun hasarlı dokulara MKH'lerin daha fazla yerleştiği rapor edilmiştir (73). MKH'lerin migrasyon sürecinin stromal kaynaklı faktör-1 (SDF-1), kemokin reseptörü (CXCR4), VEGF, HGF, IGF-1, TGF- β , temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerinin etkisi altında gerçekleştiği gösterilmiştir. Bir çok çalışmada özellikle SDF-1-CXCR4 aksının transplantasyon sonrası MKH'lerin hasarlı dokuya

migrasyonunda önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Kemoterapi, inflamasyon gibi patolojik süreçlerde ekspresyonu artan ve çeşitli hücreler tarafından salgılanan SDF-1, CXC kemokin alt ailesinin bir üyesidir. Hematopoietik, endotelial, nöronal, progenitor hücreler ve kök hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde eksprese olan CXCR4 ise SDF-1 için birincil kemokin reseptörüdür. MKH'den eksprese olan CXCR4, bu hücrelerin SDF-1 gradyanları boyunca migrasyonunu ve hasarlı dokuya yerleşimini sağlar (72, 74). Prematür ovarian yetmezlik oluşturulmuş sıçanlarda, amniyotik membrandan izole edilen kök hücrelerinin ovaryum dokusuna migrasyonunun SDF-1-CXCR4 aksı üzerinden gerçekleştiği ve bu aks üzerindeki yollarda oluşturulan inhibisyonların ovaryum dokusuna göç eden hücre sayısında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (72). VEGF ve reseptörü VEGFR, çeşitli hücre tiplerinin büyümesi, gelişmesi ve migrasyonunda önemli rol oynar (75). Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda artan VEGF seviyelerinin SDF-1 ekspresyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir (76). OHSS patogenezindeki en önemli süreçlerden biri vasküler permeabilitedeki artış ve buna bağlı olarak artan VEGF ekspresyon seviyeleridir (1).

Kalhor ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Hoescht 3342 işaretlenmiş Kİ-MKH, PKOS modeli oluşturulmuş sıçanlara transplante edilmiş ve bu hücrelerin ovaryum dokusuna yerleştiği gözlemlenmiştir (17). Jalalie ve arkadaşları ise siklofosfamid kullanarak POF modeli oluşturdukları sıçanlara CM-DiI ile işaretledikleri İGK-MKH hücrelerini transplante etmiş ve bu hücrelerin ovaryum dokusunda korteksten ziyade medulla bölgesinde lokalize olduğunu belirtmişlerdir (77). Biz de çalışmamızda Hoescht 3342 ile işaretlediğimiz MKH'lerin transplantasyon sonrası ovaryum dokusunda korteksten ziyade medulladaki vasküler alanda daha yoğun bir şekilde lokalize olduğunu gözlemledik.

OHSS patogenezinde artan vasküler permeabilite, ovaryum boyutunda artışa ve üçüncü boşluklarda asit birikimine neden olmaktadır. Artan ovaryum boyutu ve asit miktarı ile birlikte doku ve vücut ağırlıklarında da belirgin bir artış meydana gelmektedir (32, 78). Cheng ve arkadaşları, hCG uygulaması sonucu OHSS oluşturdukları ratlarda, hayvan vücut ve ovaryum ağırlıklarında artış gözlemlemişlerdir (45). Biz de çalışmamızda deney protokolünün ilk günü ve son günü yaptığımız ağırlık ölçümlerini değerlendirdiğimizde literatürdeki çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde ettik. OHSS grubunda kontrol grubuna kıyasla hayvan vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış gözlemlendi. Sakrifikasyon sonrası ölçülen ovaryum ağırlıklarında da kontrol grubuna

kıyasla OHSS grubunda belirgin bir artış izlendi. MKH'lerin ağırlık değişimi üzerindeki terapötik etkileri oluşan hasar tipine bağlı olarak değişebilmektedir. PKOS modeli oluşturulmuş ratlarda MKH uygulaması ile birlikte hayvan ağırlıklarında azalma olduğu rapor edilmiştir (79). Çalışmamızda MKH uygulaması, OHSS sonucu artan ovaryum ağırlıklarında bir değişiklik oluşturmadi. Hayvan vücut ağırlıklarında ise MKH uygulaması bir azalma oluşturdur fakat bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Ovulasyon indüksiyonu sırasında yapılan uygulamalar, artan vasküler permeabilite ve korpus luteum sayılarının etkisiyle ovaryum dokusunda, interstisyel ödem ve hemorajik alanlar oluşmaktadır (32, 80). Darabi ve arkadaşları OHSS modeli oluşturdukları ratlarda, ovaryum korteks ve medullasında hemorajik alanlar gözlemlemişlerdir (78). Yapılan literatür çalışmaları ile uyumlu olarak biz de çalışmamızda OHSS grubunda kortekste, intertistiyel ödemin vasküler dilatasyonların ve hemorajinin yoğun olduğu alanlar gözlemledik. Korpus luteum yapılarındaki artış nedeniyle korteks tabakası daha geniş bir alanda yer alırken, medulla bölgesi vasküler dilatasyonların ve hemorajik alanların belirgin olduğu daha dar bir alan olarak izlendi. Bazı atretik folikül kavitelerinde çok sayıda nekrotik granüloza hücrelerinin meydana getirdiği debris yapısı izlendi. Literatürde MKH'nin OHSS üzerindeki iyileştirici etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, OHSS patogenezinde olduğu gibi inflamatuvar süreçlerin rol aldığı, bir çok hastalık modelinde, MKH'in ovaryum dokusu üzerindeki terapötik etkileri gösterilmiştir. PKOS ve POF modeli oluşturulmuş rat modellerinde MKH uygulamasının parakrin faktörler aracılığıyla ovaryan anjiyogenezi arttırdığı ve ovaryum hasarını anlamlı derecede iyileştirdiği bir çok çalışma ile gösterilmiştir (73, 81). Lu ve arkadaşları MKH transplantasyonu sonrası POF modeli oluşturdukları ratların ovaryum dokularında, intertistiyel hiperplazi ve fibrozisin azaldığını belirtmişlerdir (82). Biz de çalışmamızda, MKH uygulamasının OHSS+MKH grubunda, OHSS grubuna kıyasla ovaryum dokusunda; interstisyel ödemi, hemorajik alanları ve vasküler dilatasyonları azalttığını gözlemledik. OHSS patogenezi sonucu oluşan ovaryum hasarı üzerine MKH'lerin terapötik etkilerini parakrin faktörler aracılığı ile göstermiş olabileceğini düşünmekteyiz.

OHSS, ovaryum boyutunda, korpus luteum oluşumunda artışa neden olurken, foliküler gelişimi de etkileyerek, folikül rezervinde azalmaya neden olmaktadır (78, 83) Luo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada OHSS modeli oluşturdukları ratlarda kontrol

grubuna kıyasla, korpus luteum ve atretik folikül sayılarında artış, primordial, primer, sekonder ve antral folikül sayılarında ise azalma olduğunu belirtmişlerdir (3). Çalışmamızda yukarıdaki bigiler ile uyumlu olarak OHSS grubunda korpus luteum ve atretik folikül sayılarında anlamlı bir artış, primordial, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graaf folikül sayılarında ise azalış gözlemlendi.

Bir çok çalışmada, MKH'lerin ovaryum hasarı üzerindeki terapötik etkilerinin germ hücrelerine farklılaşmadan ziyade; teka, granüloza, vasküler endotelial hücreler gibi oosit ve folikül gelişimini destekleyen hücrelere farklılaşma yetenekleri ve salgıladıkları IGF-1, HGF, LIF, VEGF, TGF- β 1, Bcl-2, gibi parakrin faktörler aracılığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir (62, 84). POF modeli oluşturulan ratlara transplante edilen MKH'lerin gelişen tüm folikül tiplerinde iyileştirici etki göstererek folikül rezervini arttırdığı bir çok çalışma ile rapor edilmiştir (10). Xie ve arkadaşları DHEA kullanarak ratlarda oluşturdukları PKOS modelinde, MKH uygulamasının PKOS sonucu azalan korpus luteum ve folikül sayılarını arttırdığını rapor etmişlerdir (59). Çalışmamızda MKH uygulaması ile birlikte primordial, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graaf folikül sayılarında artış, korpus luteum ve atretik folikül sayılarında ise azalış gözlemlendi fakat bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ağır form OHSS modeli oluşturduğumuz OHSS gruplarında deney protokolü gereğine uygun olarak hayvan kaybı olmaması için deney süresi kısa tutulmuş ve MKH transplantasyonundan sonra hayvanlar 5. günde sakrifiye edilmiştir. Protokole uygun olarak hücre transplantasyonundan kısa bir süre sonra deneyin sonlandırılmış olmasının, MKH'in OHSS histopatolojisi üzerindeki terapötik etkilerini göstermesini sınırlandırmış olabileceğini düşünüyoruz. MKH'lerin ağır form OHSS modeli oluşturulan ratlarda folikül sayıları üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, folikül sayılarındaki artış, yukarıda belirtilen ve OHSS patogeneziyle benzer inflamatuvar süreçlerin yer aldığı literatür çalışmalarındaki iyileştirici etkilerle uyumludur.

IL-6, OHSS patogenezinde rolü olan en önemli sitokinlerden biridir. Endotel hücreleri, makrofajlar, lenfositler gibi birçok hücre tarafından sentezlenen IL-6, VEGF ekspresyonunu arttırarak vasküler permeabilityi arttırır (1, 6, 85). Sitokin kaynaklı meydana gelen vasküler permeabilityedeki akut artış inflamatuvar yanıtların gerçekleşebilmesi için gereklidir. Bununla birlikte vasküler permeabilityedeki uzun süreli artış doku ve organlarda hasar meydana getirerek birçok hayati fonksiyonun aksamasına sebep olmaktadır (85). OHSS hastalarının asit, serum ve folikül sıvılarında IL-6

seviyelerinin arttığı birçok klinik çalışmada rapor edilmiştir (6, 29). Chen ve arkadaşları OHSS modeli oluşturdukları ratlarda serum IL-6 seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla arttığını gözlemlemişlerdir (86). Wei ve arkadaşları ise OHSS oluşturdukları ratlarda IL-6 ekspresyonunda görev alan trans sinyal yolağını bloke ettiklerinde VEGF ekspresyonunda azalma olduğunu belirtmişlerdir (8). Biz de çalışmamızda ratlarda alınan serum örneklerini ELİSA yöntemi ile analiz ettiğimizde IL-6 seviyesinin OHSS grubunda belirgin bir şekilde arttığını gözlemledik.

MKH'lerin en önemli parakrin etkilerinden biri immunmodulator özelliklere sahip olmalarıdır. Hasarlı bölgedeki inflamatuvar faktörlerin salgılanma seviyelerine göre, MKH'ler pro-inflamatuvar ya da anti-inflamatuvar fonksiyon sergilerler. Düşük interferon gama ($IFN-\gamma$) ve $TNF-\alpha$ seviyelerinde, MKH'ler makrofaj inflamatuvar protein alfa/ beta ($MIP-1\alpha/\beta$) ve kemokin 9-10-11 ($CXCL9-10-11$) gibi faktörler salgılayarak proinflamatuvar fonksiyon gösterirler. Yüksek $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-6 seviyelerinde ise MKH'ler regülatör T hücrelerinin aktivasyonunu indüklemek üzere $TGF-\beta$, HGF indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO), prostaglandin E2 (PGE2) ve nitrik oksit sentaz (NO) gibi faktörler salgılayarak anti-inflamatuvar süreçlerde rol alır ve terapötik etkilerini gösterirler (87). Kalhori ve arkadaşları PKOS modeli oluşturdukları ratlarda artan serum IL-6 ekspresyon seviyesinin MKH transplantasyonu sonucu azaldığını rapor etmişlerdir (17). Çalışmamızda, OHSS sonucu artan serum IL-6 seviyeleri MKH uygulaması ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı. OHSS+MKH grubunda meydana gelen IL-6 seviyelerindeki anlamlı azalmanın MKH'lerin bir çok hastalığın tedavisinde kanıtlanmış olan anti-inflamatuvar etkilerinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Ovulasyon indüksiyonu sırasında yapılan hCG uygulamasının hemen öncesinde ve sonrasında yükselen serum E2 seviyeleri OHSS erken tanısı için önemli bir belirteçtir. Hem klinik uygulamalardan elde edilen hasta verilerinde, hem de oluşturulan OHSS hayvan modellerinde serum E2 seviyeleri yüksek bulunmuştur (5, 45) Ajonuma ve arkadaşları eksojen gonadotropin uygulaması sonucu artan E2 seviyelerinin, epitelyal klor (Cl) kanal proteinini kodlayan kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) gen ekspresyonunu arttırdığını, bunun da vücut boşluklarında iyon ve sıvı retansiyonuna ve sonuçta hipovelemi plevral efüzyona neden olduğunu rapor etmişlerdir (88). Zhai ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada, hCG uygulayarak OHSS modeli oluşturdukları ratlarda serum E2 seviyelerinin arttığını belirtmişlerdir (4). Yukarıda belirtilen literatür

çalışmaları ile uyumlu olarak çalışmamızda OHSS grubu serum E2 seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlendi. OHSS+MKH grubunda ise MKH uygulamasının E2 seviyelerini anlamlı derecede azalttığı izlendi. OHSS+MKH grubunda meydana gelen E2 seviyelerindeki anlamlı azalmanın MKH'lerin ovaryum üzerindeki parakrin etkilerinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

OHSS patogenezi içindeki en önemli mediatörlerden biri VEGF'dür. Heparin bağlayıcı bir glikoprotein olan VEGF'in, foliküler gelişim, korpus luteum fonksiyonu ve ovaryum anjiyogenezi içinde bütünleyici bir rol oynadığı bilinmektedir. Anjiyogenezisdeki bozukluklar, anovülasyon ve infertilite, gebelik kaybı, OHSS ve ovaryum neoplazmi dahil olmak üzere çeşitli bozukluklara yol açabilir (89, 90). VEGF'nin baskın folikül seçimi ve atrezi için önemli bir düzenleyici molekül olabileceği ileri sürülmüştür (91). Yang ve arkadaşları, granüloza hücrelerindeki VEGF ekspresyonunun, muhtemelen oosit tarafından salgılanan faktörlere bağlı olarak, vasküleriteden sorumlu bir faktör olduğunu rapor etmişlerdir (92). Sığır foliküllerinde yürütülen başka bir çalışmada gösterildiği gibi, foliküler vaskülarite, folikülün baskın hale gelmesinde de çok önemli görünmektedir, çünkü östrojen-aktif foliküller ile VEGF ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (93, 94). Ayrıca VEGF'in memeli ovaryumunda granüloza hücre apoptozundan kaynaklanan foliküler atreziyi de inhibe ettiği belirtilmiştir (95).

VEGF'ün aşırı ekspresyonu ve artan damar yoğunluğu ovaryum granüloza hücre tümörlü hastalarda önemli bir anjiyogenik özellik olarak belirtilmiştir (96, 97). VEGF, vasküler endotel hücreleri için güçlü bir mitojendir ve tümör anjiyogenezinin anlaşılmasında önemli bir parametredir (98). PKOS'lu hastaların hem granüloza hem de teka hücrelerinde güçlü VEGF immün boyanması bildirilmiştir (89, 99). Gonadotropin stimülasyonuna aşırı yanıt veren PKOS hastalarında OHSS tetiklenebilir (100). Elde edilen bulgular OHSS, ovulasyon bozukluğu, fertilite ve endometriozis gibi PKOS'un çeşitli patolojik durumlarında anormal ovaryum anjiyogenezinin rol oynadığını göstermektedir (101, 102). Özellikle, Xie ve arkadaşları PKOS'un ilerlemesi ile anjiyogenik faktörlerin düzensizliği arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (103). VEGF, PKOS hastalarında da yüksek oranda ekspresse edilmektedir. Bu alandaki literatürlerin büyük bir kısmı, VEGF'ün OHSS'nin çok önemli bir aracısı olabileceğini vurgulamıştır (99, 100, 104, 105). Ayrıca anjiyogenezi hedeflemenin PKOS'u tedavi etmek için umut verici bir terapötik seçenek olabileceğini ileri sürülmüştür (106, 107).

Ovulasyon indüksiyonu için yapılan eksojen hCG uygulaması ile birlikte granüloza hücrelerinde VEGF mRNA seviyeleride artış meydana gelmektedir. VEGF endotel hücreleri üzerinde bulunan VEGFR2'ye bağlanarak fosforile etmekte ve klaudin 5, kadherin gibi endotel bağlantı proteinlerini yeniden düzenleyerek kapiller permeabilitede artışa neden olmaktadır (6, 32). Yapılan klinik çalışmalarda OHSS hastalarının folikül ve serumlarında VEGF ekspresyonun arttığı gösterilmiştir (1).

Gomez ve arkadaşları OHSS modeli oluşturdukları ratlarda ovaryum VEGF ekspresyonlarının arttığını saptamışlardır (108). Zhang ve arkadaşları OHSS oluşturdukları rat ovaryum dokusunda VEGF ekspresyonlarının arttığını gözlemlerken Ginkgo biloba uygulamasından sonra VEGF ekspresyonlarının azaldığını bulmuşlardır (83). Bu nedenle, çalışmamızda OHSS'de anjiyogenez üzerine potansiyel bir tedavi kriteri olarak VEGF ekspresyonunu araştırmamıza dahil ettik. Çalışmamızda OHSS grubunda ovaryum dokusunda immünohistokimya analizlerimiz sonucunda VEGF ekspresyonunda artış gözlemlerken MKH+OHSS grubunda ise anlamlı bir azalma olduğunu saptadık. Yapılan çalışmalarda OHSS patogenezinde artan IL-6 seviyelerinin VEGF ekspresyonunu arttırarak vasküler permeabilite de artışa neden olduğu rapor edilmiştir (8). Çalışmamızda MKH uygulamasının IL-6 seviyesinde azalmaya sebep olarak ovaryum dokusu VEGF ekspresyonunu azalttığını düşünmekteyiz.

Son yıllarda artan infertilite insidansına bağlı olarak IVF uygulamalarına olan talep her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda IVF uygulamaları sırasında oluşan OHSS gibi komplikasyonlar üzerine bir çok çalışma yapılmıştır (1, 30). Fakat yaptığımız literatür araştırmalarında OHSS sonucu ovaryum dokusunda meydana gelen ultrastrüktürel değişiklikleri inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte PKOS gibi OHSS için yüksek risk barındıran hastalık modellerinde ovaryum dokusundaki morfolojik değişiklikler elektron mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Çelik ve arkadaşları PKOS modeli oluşturdukları ratlarda, granüloza hücreleri üzerine yaptıkları elektron mikroskopik incelemelerde, granüloza hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinde azalma, dejenere mitokondri, lipid birikimi ve vakuol sayısında artış gözlemlemişlerdir (109). Çalışmamızda, OHSS grubu elektron mikroskopik incelemesinde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında mitokondri, endoplazmik retikulum ribozom ve vezikül sayılarında azalma olduğu gözlemlendi. Ayrıca granüloza hücrelerinin sitoplazmasında yer yer materyalle dolu büyük çaplı vakuoller gözlemlendi. MKH uygulaması ile birlikte OHSS+MKH grubunda organel ve vezikül sayılarında

artış gözlenirken, büyük vakuol sayılarında ise azalma olduğu tespit edildi. Bu durum bize MKH uygulamasının granüloza hücre morfolojisi üzerine olumlu etkileri olduğunu düşündürdü.

Sonuç olarak bu çalışma, MKH uygulamasının OHSS modeli oluşturulmuş ratlarda VEGF immünoaktivitesi, serum E2 ve IL-6 seviyelerini azaltarak ovaryum hasarı üzerinde iyileştirici etkileri olduğunu göstermektedir. Ağır form OHSS rat modeli protokolüne uygun olarak MKH transplantasyonundan kısa bir süre sonra deneyin sonlandırılmış olmasının MKH'in azalan folikül rezervi ve artan korpus luteum sayıları üzerindeki terapötik etkilerini göstermesini kısıtlamış olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde MKH'in OHSS patogenezinde yer alan mediatörler üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız özgün bir nitelik taşımaktadır. Bununla birlikte MKH'lerin OHSS patogenezi üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizmaların açığa kavuşması için daha kapsamlı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Blumenfeld Z. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Vitamins and hormones*. 2018;107:423-51.
2. Scotti L, Di Pietro M, Pascuali N, Irusta G, Zúñiga Id, Gomez Peña M, et al. Sphingosine-1-phosphate restores endothelial barrier integrity in ovarian hyperstimulation syndrome. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2016;22(12):852-66.
3. Luo J, Qi Q, Chen Y, Wang Y, Xie Q. Effect of GnRH-antagonist, mifepristone and letrozole on preventing ovarian hyperstimulation syndrome in rat model. *Reproductive BioMedicine Online*. 2021;42(2):291-300.
4. Zhai J, Liu J, Cheng X, Li S, Hong Y, Sun K, et al. Zinc finger gene 217 (ZNF217) promoted ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) through regulating E2 synthesis and inhibiting thrombospondin-1 (TSP-1). *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
5. Humaidan P, Nelson S, Devroey P, Coddington C, Schwartz L, Gordon K, et al. Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials. *Human Reproduction*. 2016;31(9):1997-2004.
6. Prakash A, Mathur R. Ovarian hyperstimulation syndrome. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2013;15(1):31-5.
7. Shi S-L, Peng Z-F, Yao G-D, Jin H-X, Song W-Y, Yang H-Y, et al. Expression of CD11c+ HLA-DR+ dendritic cells and related cytokines in the follicular fluid might be related to pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(11):15133.
8. Wei L-H, Chou C-H, Chen M-W, Rose-John S, Kuo M-L, Chen S-U, et al. The role of IL-6 trans-signaling in vascular leakage: implications for ovarian hyperstimulation syndrome in a murine model. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(3):E472-E84.
9. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem cells international*. 2012;2012.
10. Zhao Y-x, Chen S-r, Su P-p, Huang F-h, Shi Y-c, Shi Q-y, et al. Using mesenchymal stem cells to treat female infertility: an update on female reproductive diseases. *Stem cells international*. 2019;2019.
11. Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert opinion on biological therapy*. 2015;15(9):1293-306.
12. Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, Ouyang W, Yang C, et al. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *BioMed research international*. 2013;2013.
13. Bongso A, Fong C-Y. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2013;9(2):226-40.
14. Fong C-Y, Chak L-L, Biswas A, Tan J-H, Gauthaman K, Chan W-K, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011;7(1):1-16.

15. Li J, Mao Q, He J, She H, Zhang Z, Yin C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):1-11.
16. Kilic S, Pinarli F, Ozogul C, Tasdemir N, Naz Sarac G, Delibasi T. Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow-derived mesenchymal stem cells during puberty. *Gynecological Endocrinology*. 2014;30(2):135-40.
17. Kalhori Z, Azadbakht M, Mehranjani MS, Shariatzadeh MA. Improvement of the folliculogenesis by transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells in mice with induced polycystic ovary syndrome. *Cytotherapy*. 2018;20(12):1445-58.
18. Thomsen L, Humaidan P. Ovarian hyperstimulation syndrome in the 21st century: the role of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger and kisspeptin. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2015;27(3):210-4.
19. Micheal H. Ross WP. *Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 7 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016.
20. Can A. *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*. 2 ed: Akademi Kitabevi; 2021.
21. Mescher AL. *Junqueira Basic Histology Text and Atlas*. 14 ed: McGraw-Hill; 2019. 460-89 p.
22. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Demir R, editor: Palme Yayınları; 2006. 565-72 p.
23. Delibasşı L. *A' dan Z' Tüp Bebek Laboratuvar*. 1 ed: Veri Medikal Yayıncılık; 2008.
24. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. . 11 ed: Lippincott William & Wilkins.
25. *Üremeye yardımcı tekniklerde laboratuvar*. 1 ed: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri; 2019.
26. Keith L. Moore TVNP, Mark G. Torchia. *The Devolving Human Clinically Oriented Embryology*. 10 ed: Elsevier; 2016.
27. Timmons D, Montrieff T, Koyfman A, Long B. Ovarian hyperstimulation syndrome: a review for emergency clinicians. *The American journal of emergency medicine*. 2019;37(8):1577-84.
28. Golan A, RON-EL R, HERMAN A, SOFFER Y. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstetrical & gynecological survey*. 1989;44(6):430-40.
29. Nastri CO, Ferriani RA, Rocha IA, Martins WP. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2010;27(2):121-8.
30. Nastri C, Teixeira D, Moroni R, Leitão V, Martins W. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, staging, prediction and prevention. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015;45(4):377-93.
31. American Society for Reproductive medicine B, Alabama. Prevention and treatment of moderate and sever ovarian hyperstimulation syndrome: A guideline. *Fertility and Sterility*. 2016;106:1634-47.
32. Kwik M, Maxwell E. Pathophysiology, treatment and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2016;28(4):236-41.
33. Braat D, Schutte J, Bernardus R, Mooij T, Van Leeuwen F. Maternal death related to IVF in the Netherlands 1984–2008. *Human reproduction*. 2010;25(7):1782-6.
34. Abramov Y, Barak V, Nisman B, Schenker JG. Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*. 1997;67(2):261-5.

35. Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, et al. Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(11):1978-85.
36. Naredi N, Talwar P, Sandeep K. VEGF antagonist for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: current status. *Medical Journal Armed Forces India*. 2014;70(1):58-63.
37. Wang T-H, Horng S-G, Chang C-L, Wu H-M, Tsai Y-J, Wang H-S, et al. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(7):3300-8.
38. Ferrero H, García-Pascual CM, Gómez R, Delgado-Rosas F, Cauli O, Simón C, et al. Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in vitro: implications for treatment of ovarian hyperstimulation syndrome with dopamine receptor 2 agonists. *Fertility and Sterility*. 2014;101(5):1411-8. e2.
39. Gómez RL, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*. 2002;143(11):4339-48.
40. Soares SR. Etiology of OHSS and use of dopamine agonists. *Fertility and sterility*. 2012;97(3):517-22.
41. Sharkey AM, Catalano R, Evans A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Novel antiangiogenic agents for use in contraception. *Contraception*. 2005;71(4):263-71.
42. Borthakur A, Prabhu YD, Gopalakrishnan AV. Role of IL-6 signalling in polycystic ovarian syndrome associated inflammation. *Journal of Reproductive Immunology*. 2020;141:103155.
43. Garbers C, Rose-John S. Dissecting interleukin-6 classic-and trans-signaling in inflammation and cancer. *Inflammation and Cancer: Springer*; 2018. p. 127-40.
44. Scheller J, Garbers C, Rose-John S, editors. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Seminars in immunology*; 2014: Elsevier.
45. Cheng J-C, Fang L, Li Y, Wang S, Li Y, Yan Y, et al. Melatonin stimulates aromatase expression and estradiol production in human granulosa-lutein cells: relevance for high serum estradiol levels in patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *Experimental & molecular medicine*. 2020;52(8):1341-50.
46. Stocco C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*. 2008;73(5):473-87.
47. Hameid ASB, Al-Sindi TA, Allow AK, Nafie EM, Alahmad BE, Faisal GG. Substantial effect of fenugreek seeds aqueous extract on serum estradiol level in ovarian hyperstimulation syndrome rat model. *Oman medical journal*. 2019;34(3):238.
48. Delvigne A. Prediction and Prevention of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Complications and Outcomes of Assisted Reproduction*. 2017:124.
49. Miras AD, Mogford J, Wright J, Mendoza NN, Xekouki P, Lakhani A, et al. Ovarian hyperstimulation from ectopic FSH hypersecretion. *Lancet (London, England)*. 2015;385(9965):392.
50. Montanelli L, Delbaere A, Di Carlo C, Nappi C, Smits G, Vassart G, et al. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(3):1255-8.
51. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(13):2345-60.

52. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
53. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. *Expert opinion on biological therapy*. 2013;13(5):673-91.
54. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. 1966.
55. K Batsali A, Kastrinaki M-C, A Papadaki H, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current stem cell research & therapy*. 2013;8(2):144-55.
56. Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of cellular biochemistry*. 2001;82(4):583-90.
57. Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue-derived cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(1):430-8.
58. Kemp K, Gray E, Wilkins A, Scolding N. Purkinje cell fusion and binucleate heterokaryon formation in multiple sclerosis cerebellum. *Brain*. 2012;135(10):2962-72.
59. Xie Q, Xiong X, Xiao N, He K, Chen M, Peng J, et al. Mesenchymal stem cells alleviate DHEA-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) by inhibiting inflammation in mice. *Stem Cells International*. 2019;2019.
60. Kuchroo P, Dave V, Vijayan A, Viswanathan C, Ghosh D. Paracrine factors secreted by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells induce angiogenesis in vitro by a VEGF-independent pathway. *Stem cells and development*. 2015;24(4):437-50.
61. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, Al-Shehab M, Belo C, Herer E, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(1):1-13.
62. Shareghi-Oskouie O, Aghebati-Maleki L, Yousefi M. Transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells to treat premature ovarian failure. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;12(1):1-13.
63. Deng T, He J, Yao Q, Wu L, Xue L, Wu M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve ovarian function in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through inhibiting apoptosis and inflammation via a paracrine mechanism. *Reproductive Sciences*. 2021;28(6):1718-32.
64. Zhao Y, Pan S, Wu X. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit ovarian granulosa cells inflammatory response through inhibition of NF- κ B signaling in polycystic ovary syndrome. *Journal of Reproductive Immunology*. 2022;152:103638.
65. Kasap E, Turan GA, Eskicioğlu F, Cengiz H, Gur EB, Sivrikoz ON, et al. Comparison between resveratrol and cabergoline in preventing ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Gynecological Endocrinology*. 2016;32(8):634-40.
66. ŞANLI C, Atilgan R, Kuloğlu T, Şehmus P, TÜRK BA, Keser HB, et al. Transient receptor potential melastatin 2 ion channel activity in ovarian hyperstimulation syndrome physiopathology. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2021;51(2):787.
67. MacGillivray C, Sylvan J, Lee RT, Huang H. Time-saving benefits of intravital staining. *Journal of histotechnology*. 2008;31(3):129-34.

68. Dorostghoal M, Mahabadi MK, Adham S. Effects of maternal caffeine consumption on ovarian follicle development in wistar rats offspring. *Journal of reproduction & infertility*. 2011;12(1):15.
69. Köktürk S, Ceylan S, Etus V, Yasa N, Ceylan S. *Morinda citrifolia* L.(noni) and memantine attenuate periventricular tissue injury of the fourth ventricle in hydrocephalic rabbits. *Neural Regeneration Research*. 2013;8(9):773.
70. Wennerholm U-B, Bergh C. Perinatal outcome in children born after assisted reproductive technologies. *Upsala journal of medical sciences*. 2020;125(2):158-66.
71. Fan X-L, Zhang Y, Li X, Fu Q-L. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and molecular life sciences*. 2020;77(14):2771-94.
72. Ling L, Hou J, Liu D, Tang D, Zhang Y, Zeng Q, et al. Important role of the SDF-1/CXCR4 axis in the homing of systemically transplanted human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) to ovaries in rats with chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency (POI). *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):1-19.
73. Li Z, Zhang M, Tian Y, Li Q, Huang X. Mesenchymal stem cells in premature ovarian insufficiency: Mechanisms and prospects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021:2126.
74. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*. 2019;8(8):784.
75. Langer HF, Stellos K, Steingen C, Frohofer A, Schönberger T, Krämer B, et al. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;47(2):315-25.
76. Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2002;99(8):2703-11.
77. Jalalie L, Rezaie MJ, Jalili A, Rezaee MA, Vahabzadeh Z, Rahmani MR, et al. Distribution of the CM-Dil-labeled human umbilical cord vein mesenchymal stem cells migrated to the cyclophosphamide-injured ovaries in C57BL/6 mice. *Iranian biomedical journal*. 2019;23(3):200.
78. Darabi Z, Basir Z, Tabandeh MR, Ghotbeddin Z. Coenzyme Q10 improves ovarian histology and attenuates the expression of angiogenesis-associated proteins in the ovary of rats with experimental hyperstimulation syndrome. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2022;25(8).
79. Chugh RM, Park H-s, El Andaloussi A, Elsharoud A, Esfandyari S, Ulin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10. *Stem cell research & therapy*. 2021;12(1):1-19.
80. Karabulut S, Korkmaz O, Altun CE, Keskin I. A histopathological evaluation of ovarian hyperstimulation syndrome on reproductive and vital organs and the role of the VEGF-PKA pathway in a mouse model. *Cells Tissues Organs*. 2021;210(3):218-38.
81. Esfandyari S, Chugh RM, Park H-s, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal stem cells as a bio organ for treatment of female infertility. *Cells*. 2020;9(10):2253.
82. Lu X, Cui J, Cui L, Luo Q, Cao Q, Yuan W, et al. The effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation on endometrial receptivity are associated with Th1/Th2 balance change and uNK cell expression of

uterine in autoimmune premature ovarian failure mice. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1-11.

83. Zhang J, Huang J, He X, Li N, Miao Y, Li B, et al. Ginkgo biloba extract 761 reduces vascular permeability of the ovary and improves the symptom of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Gynecological Endocrinology*. 2022;38(4):318-23.

84. Saeed Y, Liu X. Mesenchymal stem cells to treat female infertility; future perspective and challenges: A review. *International Journal of Reproductive BioMedicine (IJRM)*. 2022:709–22—22.

85. Alsaffar H, Martino N, Garrett JP, Adam AP. Interleukin-6 promotes a sustained loss of endothelial barrier function via Janus kinase-mediated STAT3 phosphorylation and de novo protein synthesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2018;314(5):C589-C602.

86. Chen L, Sun H-X, Xia Y-B, Sui L-C, Zhou J, Huang X, et al. Electroacupuncture decreases the progression of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Reproductive biomedicine online*. 2016;32(5):538-44.

87. Sarsenova M, Kim Y, Raziyeve K, Kazybay B, Ogay V, Saparov A. Recent advances to enhance the immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.

88. Ajonuma LC, Tsang LL, Zhang GH, Wong CHY, Lau MC, Ho LS, et al. Estrogen-induced abnormally high cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression results in ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(12):3038-44.

89. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertility and sterility*. 2000;74(3):429-38.

90. Fang L, Li Y, Wang S, Li Y, Chang H-M, Yi Y, et al. TGF- β 1 induces VEGF expression in human granulosa-lutein cells: a potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Experimental & molecular medicine*. 2020;52(3):450-60.

91. Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochemistry and cell biology*. 2003;120(5):383-90.

92. Yang M, Fortune J. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Molecular reproduction and development*. 2007;74(9):1095-104.

93. Dompe C, Kulus M, Stefańska K, Kranc W, Chermuła B, Bryl R, et al. Human granulosa cells—stemness properties, molecular cross-talk and follicular angiogenesis. *Cells*. 2021;10(6):1396.

94. Grazul-Bilska A, Navanukraw C, Johnson M, Vonnahme K, Ford S, Reynolds L, et al. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *Journal of animal science*. 2007;85(8):1914-22.

95. Kosaka N, Sudo N, Miyamoto A, Shimizu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;363(3):733-7.

96. Tao X, Sood AK, Deavers MT, Schmeler KM, Nick AM, Coleman RL, et al. Anti-angiogenesis therapy with bevacizumab for patients with ovarian granulosa cell tumors. *Gynecologic oncology*. 2009;114(3):431-6.

97. Schmidt M, Kammerer U, Segerer S, Cramer A, Kohrenhagen N, Dietl J, et al. Glucose metabolism and angiogenesis in granulosa cell tumors of the ovary: activation

of Akt, expression of M2PK, TKTL1 and VEGF. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2008;139(1):72-8.

98. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246(4935):1306-9.

99. Agrawal R, Conway G, Sladkevicius P, Tan SL, Engmann L, Payne N, et al. Serum vascular endothelial growth factor and Doppler blood flow velocities in in vitro fertilization: relevance to ovarian hyperstimulation syndrome and polycystic ovaries. *Fertility and sterility*. 1998;70(4):651-8.

100. Peitsidis P, Agrawal R. Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: a systematic review. *Reproductive biomedicine online*. 2010;20(4):444-52.

101. Di Pietro M, Pascuali N, Parborell F, Abramovich D. Ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2018;155(5):R199-R209.

102. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *International journal of experimental pathology*. 2002;83(4):151-64.

103. Xie Q, Cheng Z, Chen X, Lobe CG, Liu J. The role of Notch signalling in ovarian angiogenesis. *Journal of ovarian research*. 2017;10(1):1-8.

104. Garcia-Velasco JA, Pellicer A. New concepts in the understanding of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2003;15(3):251-6.

105. Almawi WY, Gammoh E, Malalla ZH, Al-Madhi SA. Analysis of VEGFA variants and changes in VEGF levels underscores the contribution of VEGF to polycystic ovary syndrome. *PloS one*. 2016;11(11):e0165636.

106. Duncan WC, Nio-Kobayashi J. Targeting angiogenesis in the pathological ovary. *Reproduction, Fertility and Development*. 2013;25(2):362-71.

107. Wei J, Zhao Y. MiR-185-5p protects against angiogenesis in polycystic ovary syndrome by targeting VEGFA. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:1030.

108. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biology of reproduction*. 2003;68(6):2164-71.

109. Çelik LS, Kuyucu Y, Yenilmez ED, Tuli A, Dağlıoğlu K, Mete UÖ. Effects of vitamin D on ovary in DHEA-treated PCOS rat model: A light and electron microscopic study. *Ultrastructural pathology*. 2018;42(1):55-64.



7. HAM VERİLER





8. FORMLAR



9. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

OVARYAN HİPERSTİMÜLASYONLU SIÇANLARDA MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN OVARYUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE ELEKTRON MİKROSKOBİK
İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 11	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 7
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
3	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.pau.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	fnkprddata.blob.core.windows.net İnternet Kaynağı	<% 1