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

RAT OVERLERİNİN HETEROTOPİK TRANSPLANTASYONUNDA OVERYAN REZERV KORUNMASI AÇISINDAN C VİTAMİNİ VE SİLDENAFİL MOLEKÜL ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

DR. MAHMUT TOLGA AYAN

DANIŞMAN
PROF. DR. AYGEN ÇELİK

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL-2021

1. İTHAF

Babam, Turgut AYAN' a ithaf ediyorum

2. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dr. Mahmut TOLGA AYAN

3. TEŞEKKÜR

“Hayattaki tüm uhdelerimi gerçekleştirdin” diyen babamın benden son isteği de olan uzmanlık eğitimimin taçlandığı tezim için;

Eğitimim sürecinde kendisini rehber edindiğim değerli hocam ve Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ’ ye;

Uzmanlık eğitimdeki ve bu tezimin hazırlanmasındaki üstün katkılarından ötürü değerli hocam Prof. Dr. Aygen ÇELİK’ e;

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında üzerimde emeği olan ve bana iyi bir hekim olmayı gösteren pek kıymetli hocam Prof. Dr. Erdin İLTER’ e;

Uzmanlık eğitim sürecimdeki katkılarından ve eğitimin hayat boyu devam edecek olan bir süreç olduğunu bana gösteren değerli hocam Prof. Dr. Berna HALİLOĞLU PEKER’ e;

Deney sonuçlarının değerlendirilmesinde, yoğun mesaisi arasında bana zaman ayırıp deneyime destek veren değerli hocam Prof. Dr. Şükrü YILDIRIM ’a;

Pek kıymetli hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Onur GÜNALDI’ ya, Dr. Öğretim Üyesi Kemal ATASAYAN’ a; Dr. Öğretim Üyesi Ali GÜRSOY’ a;

Değerli asistan arkadaşlarıma;

Deneylerime benimle katılan ve emeklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Veteriner Hekim Barış KANBUROĞLU, Veteriner Hekim Necdet ALTINER, Rana KIZILKAYA, Melike ÇAĞLAR ’a;

Zorlu eğitim sürecimde her türlü zorluklara beraberce göğüs gerdiğim, yoldaşım, hayat arkadaşım, çocuklarımın annesi eşim Neslihan’a;

Kocaman yürekleriyle her an yanımızda olarak desteklerini devamlı üzerimizde tutan annem Nejla ve kardeşlerim Gül, Tülay, Turgay’a;

Her an yanımızda olup eşime ve bana verdiği desteklerinden ötürü kayınpederim Ramazan KARAKAYA ve kayın validem Meral KARAKAYA’ ya;

Teşekkür ederim.

4. İÇİNDEKİLER

İçindekiler

1. İTHAF ..... İİ
2. BEYAN ..... İİİ
3. TEŞEKKÜR ..... İV
4. İÇİNDEKİLER V
5. ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
6. TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
7. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
8. ÖZET ..... Xİİİ
9. SUMMARY XV
10. ZUSAMMENFASSUNG / RESUME ..... XVİİ
11. GİRİŞ VE AMAÇ 1
12. GENEL BİLGİLER 6
12.1. Over 6
12.1.1. Over Histolojisi / Fizyolojisi 7
12.1.2. Over Embriyolojisi 9
12.1.3. Ovulasyon 15
12.1.4. Fizyoloji 15
12.1.5. Menstürasyon 16
12.1.6. Hormonal düzenleme 18
12.2. Rat Overi ve Diğer Genital Yapıları 20
12.2.1. Rat Overi ve Gelişimi 20
12.2.2. Ovaryumdaki Hücre Çeşitleri 21
12.2.3. Östrus Siklusu 23
12.2.4. Korpus Luteum 25
12.2.5. Vajinal Smear 26
12.3. Over Rezerv Testleri 27
12.3.1. Bazal FSH tayini 30
12.3.2. AMH (Anti Müllerian Hormon) 31
12.3.3. Antral folikül sayımı (AFC) 33

12.3.4. Estradiol (E2) ölçümü 34
12.3.5. Inhıbin B (I-b) ölçümü 34
12.3.6. Klomifen Sitrat Challenge Testi (CCCT) 34
12.3.7. Over hacmi ölçümü 35
12.3.8. Kombine ovaryan rezerv testi 35
12.4. Fertilite koruyucu yaklaşımlar 36
12.4.1. Ovaryan Stimülasyon Sonrası Oosit veya Embriyo Kriyoprezervasyonu 39
12.4.2. Ovaryan Doku Kryoprezervasyonu (OTC) 40
12.4.3. İn Vitro Oosit Olgunlaştırılması 41
12.4.4. Over Transpozisyonu 41
12.4.5. Oosit Bankası 41
13. GEREÇ VE YÖNTEM 43
13.1. Deneklerde Vajinal Smear Değerlendirilmesi 47
13.2. Cerrahi Prosedürün Uygulanması 52
13.3. Cerrahi Prosedür Sonrası Uygulanan Medikasyon 55
13.4. Çalışma Yapılan Parametreler 58
13.4.1. Deneklerin ağırlığı 58
13.4.2. Ovaryan doku ağırlığı 58
13.4.3. Ovaryal dokunun incelenmesi 58
13.4.4. Kan numunesi ve serum parametrelerinin incelenmesi 60
14. BULGULAR 62
14.1. Denek Ağırlıkları 65
14.2. Denek Over Ağırlıkları 67
14.2.1. Deneklerin Sağ Over Ağırlıkları 67
14.2.2. Sol Over Ağırlığı 69
14.2.3. Toplam Over Ağırlıkları 70
14.3. Folikül Sayıları 71
14.3.1. Primordial Folikül Sayıları 78
14.3.2. Primer Folikül Sayıları 79
14.3.3. Antral Folikül Sayıları 80
14.3.4. Graf Folikül Sayıları 82
14.3.5. Toplam Folikül Sayıları 83

14.4. Korpus Sayıları 84
14.4.1. Korpus Luteum 86
14.4.2. Korpus Albikans Sayıları 87
14.4.3. Toplam Korpus Sayıları 88
14.5. Korelasyon 89
14.6. Serum Numunelerinden FSH Ölçüm Parametresi 90
14.7. Serum Numunelerinden AMH Ölçüm Parametresi 93
14.8. Serum Numunelerinden E_2 (Estradiol) Ölçüm Parametresi 96
14.9. Serum Numunelerinden SOD (Superoksid Dismutaz) Ölçüm Parametresi 99
15. TARTIŞMA 102
16. KAYNAKLAR 115
17. HAM VERİLER 124
17.1. Denek Ağırlıkları ve Over Ağırlıkları 124
17.2. Folikül Sayım Verileri 125
17.3. Korpus Sayım Verileri 126
17.4. Laboratuvar Verileri 127
18. İNTİHAL RAPORU 128
19. ÖZGEÇMİŞ 129

5. ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 12-1 İnsan iç genitalyasının şematik gösterimi. [5].....6
Resim 12-2 Overde folikül gelişimi. Speroff' tan modifiye edilmiştir [1]. 8
Resim 12-3 Gonadal farklılaşma. [1, 2] 12
Resim 12-4 Rat overi,.....20
Resim 12-5 Rat folikül yapısı [4]. 22
Resim 12-6 Östrus siklusunda folikül olgunlaşmasını ve hormonel değişimi gösteren tablo [3]. 23
Resim 12-7 Rat overinden hazırlanmış preperattan folikül sayımı. 33
Resim 13-1 Diöstrus safhasındaki vajinal smear görünümü......48
Resim 13-2 Diöstrustan proöstrus safhasına geçiş.....49
Resim 13-3 Metöstrus safhasındaki vajinal smear görünümü.....50
Resim 13-4 Östrus safhasındaki vajinal smear örneklemesi......51
Resim 13-5 Hipokondriak bölgeden yapılan insizyon. 52
Resim 13-6 Subrenal yağ dokusu içine gömülü over fibriya tuba ve uterus gözlenmektedir. 53
Resim 13-7 Overin trasplante edildiği ciltaltı dokudaki görünümü......54
Resim 13-8 Ooferektomi ile elde edilen doku numuneleri......59
Resim 13-9 Laboratuvara iletilen doku örnekleri. 61
Resim 14-1 Sham grubuna ait deneklerden örnek bir preparat......73
Resim 14-2 Kontrol grubuna ait temsili rat over preparatı.....74
Resim 14-3 Sildenafil grubundaki deneklerdeki temsili over preparatı......75
Resim 14-4 C vitamini uygulanan deneklerdeki over görüntüsü......76
Resim 14-5 Sildenafil ® ve c vitamini birlikte uygulanan deneklerdeki temsili bir over dokusu preparatı. 77
Resim 14-6 Elisa analizi için sipariş edilen FSH kitleridir......90
Resim 14-7 Elisa analizi için sipariş edilen AMH kitleridir......93
Resim 14-8 Elisa analizi için sipariş edilen E_2 kitleridir. 96
Resim 14-9 ELISA için sipariş edilen SOD kitleridir......99
Resim 15-1 Ortamdan oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasını gösterir şema......113
Resim 18-1 Etik Kurul Proje Onay Formu .....***Hata! Yer işareti tanımlanmamış.***
Resim 19-1 İntihal raporu ilk sayfası 128

6. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 12-1 Reprodüktif ve çocukluk çağı kadın kanserlerinde uygulanan medikal tedavilerin gonadotoksik etkileri [40]. 28
Tablo 12-2 Çocukluk çağında veya reprodüktif dönemde kadın bedenine uygulanacak radyoterapinin gonadotoksisitesini gösterir tablo [41]. 29
Tablo 12-3 Serum AMH değerlerini etkileyen durumlar araştırılmıştır. 32
Tablo 12-4 Türkiye`de üreme hücreleri ve gonad dokularının saklanmasını gerektiren tıbbî zorunluluk halleri [41]. 37
Tablo 12-5 Türkiye'deki yönetmelikler kapsamında yumurtalık dokusu, oositi, spermi, testis dokusu veya embriyosu saklanabilecek hastalıklar [41]....38
Tablo 12-6 Kadın ovaryan rezervini korumak için günümüzde kullanılan yöntemler [43]. 38
Tablo 12-7 Fertilite koruyucu yaklaşımların özeti [41]. 42
Tablo 14-1 Denek ağırlıklarını gösterir tablo. 65
Tablo 14-2 Deneklerin sağ over ağırlık ortalamalarını gösterir tablo. 68
Tablo 14-3 Deneklerin sol over ağırlık ortalamalarını gösterir tablo. 69
Tablo 14-4 Deney gruplarının toplam over ağırlıkları ortalamalarını gösterir tablo. 70
Tablo 14-5 Folikül sayıları açısından grupların dağılımı. 71
Tablo 14-6 Folikül sayılarını grup ortalamalarına göre gösterir tablo. 72
Tablo 14-7 Primordial folikül sayı ortalamalarını gösterir tablo. 78
Tablo 14-8 Primer folikül sayılarını gösterir tablo. 79
Tablo 14-9 Antral folikül Sayı ortalamalarını gösterir tablo. 81
Tablo 14-10 Graf folikül sayı ortalamalarını gösterir tablo. 82
Tablo 14-11 Toplam folikül sayı ortalamalarını gösterir tablo. 83
Tablo 14-12 Ortalama korpus sayılarını gösterir tablo. 84
Tablo 14-13 Grupların korpus sayı ortalamalarını gösterir grafik. 85
Tablo 14-14 Korpus luteum ortalamalarını gösterir grafik. 86
Tablo 14-15 Korpus albikans sayım ortalamalarını gösterir grafik. 87
Tablo 14-16 Toplam korpus sayım ortalamalarını gösterir grafik. 88
Tablo 14-17 Gruplarda saptanan bulguların korelasyonunu gösteren tablo. 89
Tablo 14-18 FSH analizinde denek ortalamalarını gösterir tablo. 92
Tablo 14-19 Grupların AMH değer ortalamalarını gösterir tablo/grafik. 95
Tablo 14-20 Grupların E_2 değer ortalamalarını gösterir tablo/grafik. 98
Tablo 14-21 Grupların SOD değer ortalamalarını gösterir tablo/grafik. 101
Tablo 17-1Denek ağırlıkları ve over ağırlıkları. 124

Tablo 17-2 Folikül sayımı verileri *125*
Tablo 17-3 Korpus sayım verileri *126*
Tablo 17-4 Laboratuvar verileri. *127*

7. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

POF	Premature Ovarian Failure
DOR	Diminished Ovarian Reserv (Azalmış Over Rezervi)
PKOS	Polikistik Ovarian Sendrom
OHSS	Ovarian Hyper Stimulation Syndrome
BMI	Body Mass Index (Vücut Kitle İndeksi)
IVF	In Vitro Fertilization
AFC	Antral Follicule Count (Antral Folikül Sayımı)
CCCT	Clomiphene Citrate Challenge Test
TDF	Testis Belirleyici Faktör
AMH	Anti Müllerian Hormon
hCG	Human Corionic Gonadotropin
FGF-9	Fibroblast Büyüme Faktörü 9
PGF2α	Prosto Glandin F2 Alfa
TGF-β	Transforming Growth Faktör- Beta
IGF	Insulin like Growth Factor
T	Testesteron
E	Östrojen
I	Inhibin
I-a	Inhibin – A
I-b	Inhibin – B
R	Relaksin
P	Progesterone
PRL	Prolaktin
GH	Growth Hormone
ACTH	AdrenoCorticoTropic Hormone
DHT	Dihidro Testesteron
LH	Luteinizan Hormon

FSH	Folikül Stimülan Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
NO	Nitrik Oksit
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz (NOS1)
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (NOS2)
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentetaz (NOS3)
cGC	Ciclic Guanilat Cyclase
GTP	Guanosine Tri Phosphate
cGMP	Cyclic Guanosine Mono Phosphate
PDE5	Phospho Di Esterase 5
MDA	Malonyl Di Aldehyde
CL	Korpus Luteum
CA	Korpus Albikans
FP	Fertility Preservation
OTC	Ovarian Tissue Cryopreservation
KOS	Kontrollü Ovaryan Sitimülasyon
OPU	Oocyte Pick Up
IP	Intra Peritoneal
ÜYTE	Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Merkezleri
MENS	Menstrüasyon periyodu
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
EU	Avrupa Birliği (European Union)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
MÜHADYEK	Maltepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

8. ÖZET

Tezimde; rat overlerinin heterotopik transplantasyonunda over rezervlerinin korunması açısından C vitamini ve sildenafil moleküllerinin etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu sayede çocukluk çağı kanserleri, otoimmün hastalıklar, endometrioma gibi nedenlerle tedavi altına alınan ve bir sebeple prematür ovaryan yetmezlik gelişmesi muhtemel kadınlarda, over rezervini over dokusunun re-transplantasyonundan sonra koruyabilmek için önerilebilecek tedavi modaliteleri deneylenmiştir.

30 Adet 12 haftalık wistar albino cinsi dişi rat altışarlı gruplara ayrıldı. Gruplar, sham, kontrol, sildenafil, C vitamini, sildenafil ve C vitamini olacak şekilde belirlendi. Her bir grubun özellikleri; 1. Grup: Sadece overler görülüp dokunulmadan kapatıldı. 2. Grup: Overlere otolog transplantasyon yapıldı ve farelere herhangi bir medikasyon yapılmadı; 3. Grup: operasyonun ardından sadece sildenafil 15 mg/kg/gün günde iki kerede gavaj yoluyla verildi. 4. Grup: operasyon sonrası sadece C vitamini 500 mg/kg günde bir kere gavaj yoluyla verildi. 5. Grup: Operasyon sonrası farelere hem C vitamini 500 mg/kg günde bir kez hem de sildenafil 15 mg/kg/gün günde iki kerede gavaj yoluyla uygulandı. İlk operasyondan 3 hafta sonra denekler yeniden opere edildi. Over dokuları transplante edilen her iki taraf hipokondriyak cilt altı bölgeden alındı. Aynı operasyonda her denekten intrakardiyak 5 cc kan alındı. Ardından denekler sakrifiye edildi. Kanlar serumlarına ayrılarak -20 C^o de saklandı. Over dokuları patolojik inceleme için formol solüsyonu içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Her over dokusundan 5 er kesit hazırlandı. Hemotoksilen- eosin ile boyanarak ışık mikroskobu altında 50/100/400'lük bakı altında incelendi. Her over için hazırlanan preparatların en çok primordial folikül içerenleri seçildi. Her grup için toplam primordial folikül, primer folikül, antral folikül, graf folikül, korpus luteum, korpus albikans ve nekroz oranları, belirlendi. Gruplar arasında morfolojik fark incelendi.

Ayrılan serumlardan "FSH, E2, SOD, AMH hormon" analizi yapıldı. "MIS/AMH BT-LAB Kit (Cat.No:E0456Ra)" ile AMH analizi, yine aynı firmanın "FSH BT-LAB Kit (Cat.No:E0182Ra)" ile FSH analizi, yine aynı firmanın "Rat Super Oxidase Dismutase ELISA Kit (Cat.No:E0168Ra)" ile SOD analizi ve "Elabscience firmasının Rat/Porcine E2(estradiol) ELISA Kit (Cat.No:E-EL-0152)" ile niceliksel veri elde edildi. Grup ortalamaları arasında farkların anlamlılığı "Kruskal-wallis, mann-whitney u" test kullanıldı. Korelasyon

analizinde “spearman korelasyon analizi” kullanıldı. Çalışmamda, “IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı” kullandım. P<0,05 kabul edildi.

Elde ettiğimiz verilere göre ovaryan dokunun transplantasyonu sonrası herhangi bir medikasyon yapılmazsa rezervinde %90’lara varan kayıp olmaktadır. Bu bulgumuz literatürle uyuşmaktadır. Ancak güçlü bir antioksidan olan C vitamini ile medikasyon sağlandığında bu kayıplar yarı yarıya azalmaktadır. En fazla rezervin korunması C vitamini ve sildenafil ® molekülünün birlikte kullanımı ile sağlanmıştır. “cGMP” Üzerinden etki göstererek NO birikimi yapan ve bu sayede vasküler permeabilite artışı, düz kas gevşemesi ve doku kapiller kanlanmasını artıran Sildenafil’® in tek başına kullanımı over rezervini koruma açısından tek başına C vitamini kadar etkili bulunuştur. Bu açıdan bakıldığında bulgularımız literatür verileri ile örtüşmektedir.

Sonuç olarak otolog over dokusu transplantasyonunda Sildenafil ve C vitamini moleküllerinin birlikte kullanımı over rezervini korumak için oldukça etkili bir yaklaşım olabilmektedir. Medikasyon yapılmadan bu rezervin %80-90 kadarı hipoksi ve sonrasındaki oksidatif stres hasarı gibi nedenlerle kaybedilirken sildenafil ® ile C vitamini birlikte kullanımı bu rezerv kaybını %30 – 10 ile sınırlandırabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Rat, over rezervi, sildenafil, C vitamini, Prematür Ovaryan Yetmezlik, over transplantasyonu

9. SUMMARY

The study is performed to evaluate the effect of vitamin C sildenafil citrate on preservation of ovarian reserve after heterotopic transplantation of rat ovary.

In this way, treatment modalities that can be recommended to preserve ovarian reserve after re-transplantation of ovarian tissue in women who are under treatment for reasons such as childhood cancers, autoimmune diseases, endometrioma and who are likely to develop premature ovarian failure for some reason have been tested.

Adult 30 Wistar albino rats at eustrous phase are divided into 6 groups randomly.

G1 (n=6); Only laparotomy done. G2 (n=6): Autolog bilateral ovarian transplantation without medication. G3 (n=6):): Sildenafil citrate group (sildenafil citrate per oral administered 15 mg/kg/twice a day) after autolog bilateral ovarian transplantation G4 (n=6): Vitamin C group (vitamin C per oral administered 500 mg/kg/once a day) after autolog bilateral ovarian transplantation G5 (n=6) Mix group: Both vitamin C (per oral 500/mg/kg/once a day) and sildenafil citrate (per oral15 mg/kg/twice a day) administered after autolog bilateral ovarian transplantation.

Subjects were re-operated 3 weeks after the first operation. Transplanted bilateral ovarian tissues were excised from the hypochondriac subcutaneous region. 5 cc of intracardiac blood sample was taken from each rat synchronously with operation and then all are sacrificed. The blood was separated into serum and stored at -20°C. Ovarian tissues were delivered to the laboratory in 10% formaldehyde solution for fixation and pathological examination. They are embedded into paraffin block and sliced into 5 slice sections from each ovarian tissue. We stained the materials with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope at 50/100/400. Of the preparations prepared for each ovary, those containing the most primordial follicles were selected. For each group, the total primordial follicle,

primary follicle, antral follicle, graphite follicle, corpus luteum, corpus albicans and necrosis rates were determined. The morphological difference between the groups was examined.

Serum analyzed for FSH, E2, SOD, AMH hormone levels. AMH analysis done with MIS/AMH BT-LAB Kit (Cat.No: E0456Ra), FSH analysis done with FSH BT-LAB Kit (Cat.No: E0182Ra) of the same company, Rat Super Oxidase Dismutase analysis done with ELISA Kit (Cat. No) of the same company: E0168Ra) and quantitative data were obtained with the Rat/Porcine E2(estradiol) ELISA Kit (Cat.No: E-EL-0152) from Elabscience. Significance of differences between groups were analysed statistically by using Kruskal-wallis, Mann-whitney u test. Spearman correlation analysis was used in the correlation analysis. SPSS 27.0 program was used. $P<0.05$accepted as statistically meaningful.

According to the data we have obtained, the ovarian tissue loss was nearly 90% if no medication is administered after the transplantation. This finding is consistent with the literature. However, these losses are reduced by half when medication is provided with vitamin C, a powerful antioxidant. Protection of the maximum reserve is provided by the use of vitamin C and sildenafil ® molecule together. The use of Sildenafil® alone, which accumulates NO by acting on "cGMP" and thus increases vascular permeability, smooth muscle relaxation and tissue capillary blood supply, has been found to be as effective as vitamin C alone in terms of preserving ovarian reserve.

As a conclusion, combination of Sildenafil and vitamin C molecules in autologous ovarian tissue transplantation can be a very effective approach to preserve ovarian reserve. They limit the reserve loss up to 30-10 %. However, more prospective randomized trials needed for future.

Key Words: Rat, ovarian reserve, sildenafil, vitamin C, Premature Ovarian failure, ovarian transpalntation

10. ZUSAMMENFASSUNG / RESUME

In meiner Abschlussarbeit/These soll die Wirksamkeit von Vitamin C- und Sildenafil-Molekülen im Hinblick auf die Erhaltung der Ovarialreserven bei der heterotopen Transplantation von Ratten-Ovarien verglichen werden.

Auf diese Weise wurden Behandlungsmodalitäten geforscht, um die Eierstockreserve nach Retransplantation von Eierstockgewebe bei Frauen zu schützen, die sich aus Gründen wie Krebs im Kindesalter, Autoimmunerkrankungen, Endometriom in Behandlung befinden und die aus irgendeinem Grund wahrscheinlich ein vorzeitiges Eierstockversagen entwickeln werden.

Dreißig 12 Wochen alte weibliche Wistar-Albino-Ratten wurden in sechs Gruppen eingeteilt. Die Gruppen wurden als Sham-, Kontroll-, Sildenafil-, Vitamin-C-, Sildenafil- und Vitamin-C-Gruppen bestimmt. Eigenschaften jeder Gruppe

Gruppe 1: Eierstöcke wurden unberührt nur gesehen

Gruppe 2: Eierstöcke wurden autolog transplantiert und die Ratten erhielten keine Medikamente

Gruppe 3: Nach der Operation wurde nur zweimal täglich Sildenafil 15 mg/kg/Tag per Schlundsonde verabreicht.

Gruppe 4: Nach der Operation wurde nur einmal täglich Vitamin C 500 mg/kg per Schlundsonde verabreicht.

Gruppe 5: Postoperativ wurde Ratten sowohl Vitamin C 500 mg/kg einmal täglich als auch Sildenafil 15 mg/kh/Tag zweimal täglich per Schlundsonde verabreicht.

Die Ratten wurden 3 Wochen nach der ersten Operation erneut operiert. Das Ovarialgewebe wurde aus der hypochondrischen subkutanen Region von beiden transplantierten Seiten entnommen. Wâhrend der Operation wurden jeder Ratte 5 ml intrakardiales Blut entnommen. Darafhin wurden die Ratten geopfert. Das Blut wurde in Serum aufgetrennt und bei –20°C gelagert. Ovarialgewebe wurde in Formellösung zur pathologischen Untersuchung an das Labor geliefert.

Von jedem Ovarialgewebe wurden 5 Schnitte hergestellt. Diese wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und unter einem Lichtmikroskop bei 50/100/400 Vergrößerung untersucht. Von den Präparaten, die für jeden Eierstock hergestellt wurden, wurden diejenigen ausgewählt, die die meisten Urfollikel enthielten. Für jede Gruppe wurden Gesamtprimordialfollikel, Primärfollikel, Antrumfollikel, Graphitfollikel, Corpus luteum, Corpus albicans und Nekroseraten bestimmt.

Morphologische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden untersucht. Von den getrennten Seren wurden Fsh-, E2-, SOD-, AMH-Hormonanalysen durchgeführt. Es wurden, AMH-Analyse mit MIS/AMH BT-LAB Kit, FSH-Analyse mit FAH BT-LAB Kit der gleichen Firma, SOD-Analyse mit Rat Super Oxidase Dismutase ELISA Kit der gleichen Firma und Rat/Porcine E2 ELISA Kit mit der Firma Elabscience, quantitative Daten ermittelt.

Kruskal-wallis, Mann-withney-u-Tests wurden für die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten verwendet. In der Korrelationsanalyse wurde eine Spearman-Korrelationsanalyse verwendet. Das Programm IBM SPSS 27.0 wurde verwendet. $P < 0,05$ wurde akzeptiert.

Wenn nach der Transplantation des Eierstockgewebes keine Medikamente verabreicht wird, kommt es nach den uns vorliegenden Daten zu einem Verlust von bis zu 90 % der Eierstockreserve. Dieser Befund stimmt mit der Literatur überein. Diese Verluste werden jedoch um die Hälfte reduziert, wenn Medikamente mit Vitamin C, einem starken Antioxidans, versorgt werden. Der Schutz der maximalen

ovariellen Reserve wurde durch die kombinierte Anwendung von Vitamin C und Sildenafil-Molekül erreicht.

Die alleinige Anwendung von Sildenafil, das durch Einwirkung auf cGMP NO akkumuliert und somit die Gefäßpermeabilität, die Entspannung der glatten Muskelzellen und die Blutversorgung der Gewebekapillaren erhöht, erwies sich hinsichtlich des Schutzes der ovariellen Reserve als ebenso wirksam wie Vitamin C allein. Aus dieser Sicht stimmen unsere Ergebnisse mit den Literaturdaten überein.

Daher kann die kombinierte Anwendung von Sildenafil und Vitamin C-Molekülen bei der autologen Transplantation von Ovarialgeweben ein sehr effektiver Ansatz sein, um die Ovarialreserve zu erhalten. Ohne Medikamente gehen 80-90% dieser Reserve durch Hypoxie und nachfolgende oxidative Stressschäden verloren, und die kombinierte Anwendung von Sildenafil und Vitamin C kann diesen Reserveverlust auf 30-10% begrenzen.

Stitchwort: Ratte, Ovarialreserve, Sildenafil, Vitamin C, Primâre Ovarialinsuffizienz, Ovarialtransplantation

11. GİRİŞ VE AMAÇ

Her kadın üreme çağı boyunca ortalama 400 menstürasyonu için yaklaşık 400 bin primordial folikül rezervine sahiptir[2]. Çeşitli hastalıklar nedeniyle doğrudan veya iatrojenik nedenli rezervler kaybedilir ve erken ovaryan yetmezlik (premature ovaryan failure – POF) gelişebilir. Çocuk sahibi olma isteğini her ne sebeple olursa olsun öteleyen rezervlerini korumak isteyen bu kadınlar için bir çözüm yöntemi, overlerinin dondurulması ve bu dokunun gelecekteki bir zamanda yeniden oto-transplantasyonunun yapılmasıdır. Bu sayede yeniden üreme sağlanabilecektir[6].

Ovaryan rezervin korunması ve gelecek bir tarih için saklanıp yeniden transplante edilmesi veya fresh transplantasyonun gerekli olduğu durumlar Tablo 11.1 de gösterilmiştir.

Çocukluk çağı kanserlerinde alkilleyici ajan içeren kemoterapi alacak hastalar, bölgesel radyoterapi tedavisi uygulanması düşünülen hastalar over rezervi saklanması için adaydırlar. Bununla birlikte malignite dışı nedenlerle kemoterapi, radyoterapi maruziyeti olabilecek hastalar, kemik iliği transplantasyonu hastaları yine fertilite koruyucu tedavilere ihtiyaç duyabilirler. Ayrıca ekonomik veya kariyer edinme gibi nedenlerle birtakım kadınlar çocuk edinme beklentisini ileri yıllara kadar muhafaza etme isteği taşıyabilirler. Bunun dışında etik bir tartışma konusu olmakla birlikte değerlendirilmesi gereken bir başka durum da sadece kadının isteği de yine fertilite koruyucu işlemlerin endikasyonları arasında sayılmalıdır (Tablo 11.1) [6].

Fertilizasyonun korunması için hastalardan erkek partneri olan bir kısmı, doğrudan embriyo, diğer bir kısmı da oosit saklanması işlemini tercih edebilseler de ovaryan dokunun saklanması ve oto-transplantasyonunun mutlak endike olduğu durumlar da mevcuttur (Tablo 11.2)

2004 Yılından itibaren mevcut yöntemlerle yapılan oto-transplantasyonlarda defalarca fekundite sağlanmıştır [7-9]. Ancak kadın fertilizasyonun korunması için yapılan ovaryan dokunun saklanması ve sonrasındaki oto-transplantasyonunda fertilitenin geri gelmesinde birtakım sorunlar mevcuttur. Transplantasyon sonrası ovaryan dokuda oksidatif stres hasarı ve sonrasında hızlıca rezerv tüketilmesi (Burn-out etki) nedeniyle üreme, süre açısından bekleneni tatmin etmez (5).

MALİGNİTELER	BENIGN HASTALIKLAR	SOSYAL NEDENLER
Non-Hodgkin's Lenfoma	Otoimmün hastalıklar	Çocuk isteğinin ileri yıllara ertelenmesi
Hodgkin's Lenfoma	Bilateral overyal tümörler	Yaş
Lösemiler	İleri düzeyde endometriyozis	Kadının isteği
Meme kanserleri	Over torsiyonu	
Pelvik maligniteler	POF Aile Öyküsü	
Sarkomlar	Turner Sendromu	
	Kemik İliği Transplantasyon	

Tablo 11.1 Ovaryan rezervin korunması gerekli durumlar [6].

Kadın fertilizasyonunun korunma endikasyonları içerisinde özellikle bazı durumlar vardır ki mutlak ovaryan dokunun saklanmasını ve re-transplantasyonunu zorunlu kılar. Bunlar hızlı ve agresif tedavi gerektiren maligniteler, çocukluk çağı kanserleri, tedavi sonrası fertilizasyonun geri geldiğinde adet görme gibi normal fizyolojinin geri gelmesinin istenmesi, ciddi endometriyozis, bilateral ovaryan tümörler, over torsiyonu, ayrıca virgin kalma isteği olanlar (*). Bu gruptakiler transvajinal işleme onay vermediklerinden oosit pickup (yumurta toplanması) işleminin de transvajinal yapılmasına izin vermemektedirler. Ayrıca oosit rezerv havuz oluşturmak için defalarca transabdominal girişimi de kabul etmemektedirler. Bu yüzden tek seferde yapılan, öncesinde ilaç kullanmayı gerektirmeksizin laparaskopik olarak ovaryan dokunun eksizyonunu talep etmektedirler (Tablo 11.2) (2).

Endikasyon
Hızlı ve agresif tedavi gerektirebilecek maligniteler;
Çocukluk çağı kanserleri
Virgin kalma isteği*
Tedavi sonrası yeniden adet görmeye devam etmek istenmesi
Ciddi endometriyozis
Bilateral ovaryan tümörler
Over torsiyonu

Tablo 11.2 Mutlak ovaryan dokunun sağlanması gerekli olan durumlar (2).

Bu yöntemlerde karşılaşılan en büyük sorun, ovaryan rezervin neredeyse %90'lara varan oranlarda azalmasıdır [10]. Azalan over rezervi sebebi ile beklenen üreme gerçekleşmeyebilir. Planlanan IVF tedavi için graf olgunluğa ulaşmış tek folikül bazen yeterli olabilirken doğal yöntemlerle gebelik planlayan kadın için olası birkaç siklus beklentiyi karşılamaktan uzak olabilecektir. Çalışmalar over rezervinin 18 ay boyunca hızlıca azaldığını ortaya koymaktadır [11]. Bu açıdan bakıldığında otolog over transplantasyonunda over rezervinin korunması son derece önem arz etmektedir [12].

Over dokusu cryo-preservasyonundan sonra otolog transplantasyonu ile oluşturulmuş ilk gebelik 2004 yılında bildirilmiştir [7]. O tarihten günümüze kadar bu yöntemle 130'un üzerinde başarılı doğum gerçekleşti [13]. Yapılan çalışmalarda over dokusunun saklanması

sonrası yeniden transplante edilen dokunun rezervini muhafaza edebilmesi için tedavi yöntemleri geliştirildi;

Ortotopik veya heterotopik transplantasyonlar denendi. Bunlar arasında ortotopik oto-transplantasyonun en başarılı olduğu sonucuna varıldı [14].

Over dokusu epitelinden alınan kesitlerin 0.5 mm kalınlığında zar şeklinde saklanması ve transfer edilmesinin daha başarılı sonuçlar doğurduğu tespit edildi [14].

Transfer sonrası verilen asetilsistein, C vitamini gibi antioksidanların over rezervinin korunması açısından etkin olduğuna dair kanıtlar bulundu [16-20].

Yine sildenafil molekülünün iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasındaki etkinliği test edilmiştir [17]. Buna benzer etki ile tadalafil molekülünün yine iskemi reperfüzyon modeli olan over torsiyonu ile denemesi yapılarak etkinliği incelenmiştir [20].

Yine over dokusu transplante edilen ratlarla yapılan deneylerde tek başına benfotiamin ve asetilsitein karşılaştırılması yapılmış. Bu moleküller rezerv muhafazasında eşit derecede etkili ancak kontrol grubuna kıyasla etkisi son derece zayıf olarak bulunmuştu [15].

Tadalafil, sildenafil, vardanafil gibi cGMP üzerinden etki eden moleküllerin rat over oto-transplantasyonu üzerindeki etkileri incelenmesi gibi çeşitli iskemi reperfüzyon hasarı modellerinde de çalışma etkinlikleri karşılaştırılmıştı [21].

Bütün bu çalışmalar göstermiştir ki over dokusu oto-transplantasyon sonrası ovaryan rezerv kaybının yaşandığı en önemli iki dönem bulunmaktadır.

İlki, transplantasyonun yapılığı ilk an olan dokunun çözünüp biyolojik faaliyet kazandığı ilk anda oluşan oksidatif stresin oluşturduğu hasardır [9]. Bu hasarın oluşmasından serbest oksijen radikalleri sorumludur. Doğrudan hücrelerin membranları üzerindeki lipit yapılarla reaksiyona giren $H_2O_2^{\sim}$, $O_2^{\sim}$ gibi serbest oksijen radikalleri hücrelerin membran bütünlüğünü bozmaktadır. Membran yapıları bozulan hücreler yıkılırlar. Yıkılan her primordial folikül hücresi fonksiyon dışı kalır. İster granülosa hücreleri ister doğrudan germ hücreleri dejenere olsun, bu durum folikülü tamamen işlevsiz hale getirecektir.

İkinci en hızlı rezerv kaybının yaşanma durumu da artan FSH etkisine yanıt olarak normalin üstünde gelişmeye başlayan primordial folikül sayesinde ortaya çıkmaktadır [22]. Her ne kadar FSH seviyesi baskılansa da foliküllerin hormona yanıt kapasiteleri bir şekilde birbirlerine yakın hale gelmekte ve sonuçta foliküller FSH için oldukça duyarlı hale gelmektedir. Her bir siklusta aynı anda çok sayıda folikülde granülosa hücre sayısı artışı başlamaktadır.

Biz çalışmamızda, sildenafil molekülü ve daha önce oksidatif hasarı önlemede etkili olduğu saptanmış C vitamini molekülünü birlikte kullanarak test ettik [16].

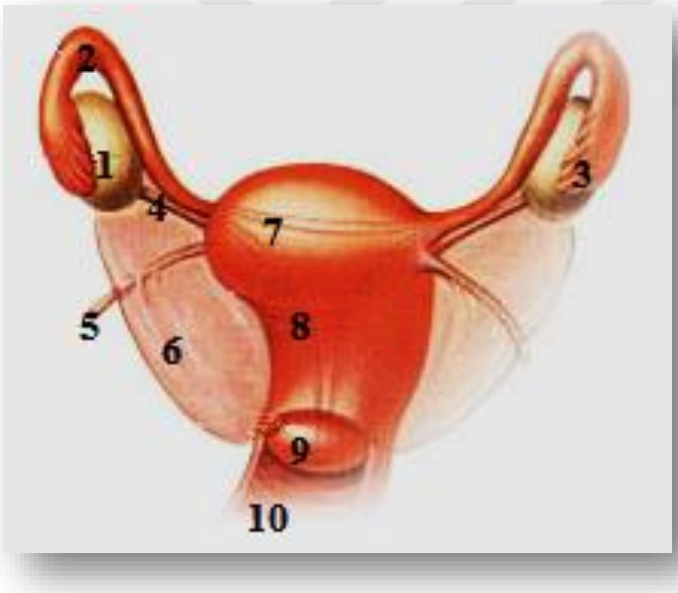
Bulgularımıza göre over rezervinde en büyük kaybı kontrol grubunda yaşadık. Kontrol grubunda ilk operasyon sonrası 21 gün boyunca herhangi bir medikasyon yapılmamıştır. Bizim için kıyas verilerini oluşturacak Sham grubunda ise overlere herhangi bir şekilde doğrudan müdahale edilmemiştir. Ancak deneyde optimal koşulların sağlanabilmesi için deneyin diğer gruplarında olduğu gibi aynı stres koşullarına uygun gavaj ile normal su uygulanmış olup plasebo etkisini oluşturmaya çalıştık. Deneyimizde c vitamini verilen 4. grup ile sildenafil ® verilen 3. grup over rezervi saptamada kriter olarak kullandığımız verileri birbirine yakın bulduk. Çoğu parametrede istatistiksel olarak bu iki grup verileri arasında anlamlı fark yoktu. Ancak Sham grubuna en yakın verileri sildenafil ® ve c vitamininin birlikte verildiği 5. gruptan elde ettik. Bu sonuca göre over rezervinin %90'ına yakınının korunabilmekte olduğunu gördük.

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde "ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri" kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı "kolmogorov simirnov test" ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde "kruskal-wallis, mann-whitney u test" kullanıldı. Korelasyon analizinde "spearman korelasyon analizi" kullanıldı. Çalışmamızda, "IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı" kullanılmıştır.

12. GENEL BİLGİLER

12.1. Over

Over, pelvik boşlukta, her iki taraf tuba uterinalarının uç kısmında bulunan gonadal yapılardır. Her iki over, infindibulopelvik ligamentler ile pelvik yan duvarlara, ovari proprium ile uterusa doğru mediale asılırlar. Overin yüzey epiteli visseral periton olarak devam eder ve mesoovarium yapısıyla broad ligament yapısına karışır. Her iki over, tuba uterinaların uç kısmı olan infindibulum tarafından adeta abluka altına alınmış gibidir. Buradaki komşuluk sayesinde over tarafından üretilen ovumları yakalayıp sperm ile buluşturmaktadırlar. Yani periton boşluğunun dış ortama tek açıklığı tuba uterinalar sayesindedir [1].



1. Over
2. Tuba uterina
3. Fimbria / İnfindibulum
4. Lig. Ovari proprium
5. Round ligament
6. Broad ligament
7. Fundus uteri
8. Korpus uteri
9. Serviks uteri
10. Vajina

Resim 12-1 İnsan iç genitalyasının şematik gösterimi. [5]

Overlerin hilus bölgesinden damar, lenf ve inervasyonunu sağlayan yapılar giriş yapar. Bu damarlardan arterler, her iki renal arterin aortadan ayrıldığı yere yakın olarak çıkarlar. Topografisi gereği sol ovarian arter sağ taraftakine göre daha kısa seyreder. Ovaryan dokunun kanlanması sadece arteria ovarica' lar ile yapılmaz.

Uterin arterin tubal ve ovaric dalları da broad ligament içerisinde oluşan pleksuslar aracılığı ile mesoovariumlara katılırlar. Aynı şekilde venöz dolaşımları da arterleri takip eder. Ancak sağ taraftaki yakınlığı nedeniyle sağ vena ovarica doğrudan inferior vena kavaya dökülmektedir. Sol venöz drenaj ise sol renal artere komşu gider ve sol renal vene drene olur (resim 12-1) [1].

İnervasyonunu ovaryen pleksus, uterovajinal pleksus (frankenhauser ganglion) yapar. Sempatik inervasyon T10 – L1 kaynaklı paraaortik pleksus aracılığı ile gelirken parasempatik inervasyonu S2-4 arası lif kaynaklıdır. Duysal sinirler parasempatik lifleri takip ederler. Her iki gangliondan gelen lifler overlerin hilus bölgesinden içeri girerler ve over dokusu içerisinde kortekse kadar dağılırlar. Overler, yüzeyel gerilme kuvvetine ve iskemiye son derece duyarlı organlardır. Bu sayede over kaynaklı patolojilerde ağrı alt kadran ağrısı olarak hissedilir. Rebound ve hassasiyet oluşturarak muayene bulgusu verir. Bu sebeple özellikle sağ over kaynaklı patolojilerin komşuluğundaki appendiks patolojilerinden ayırt edilmesi önem arzeder [1].

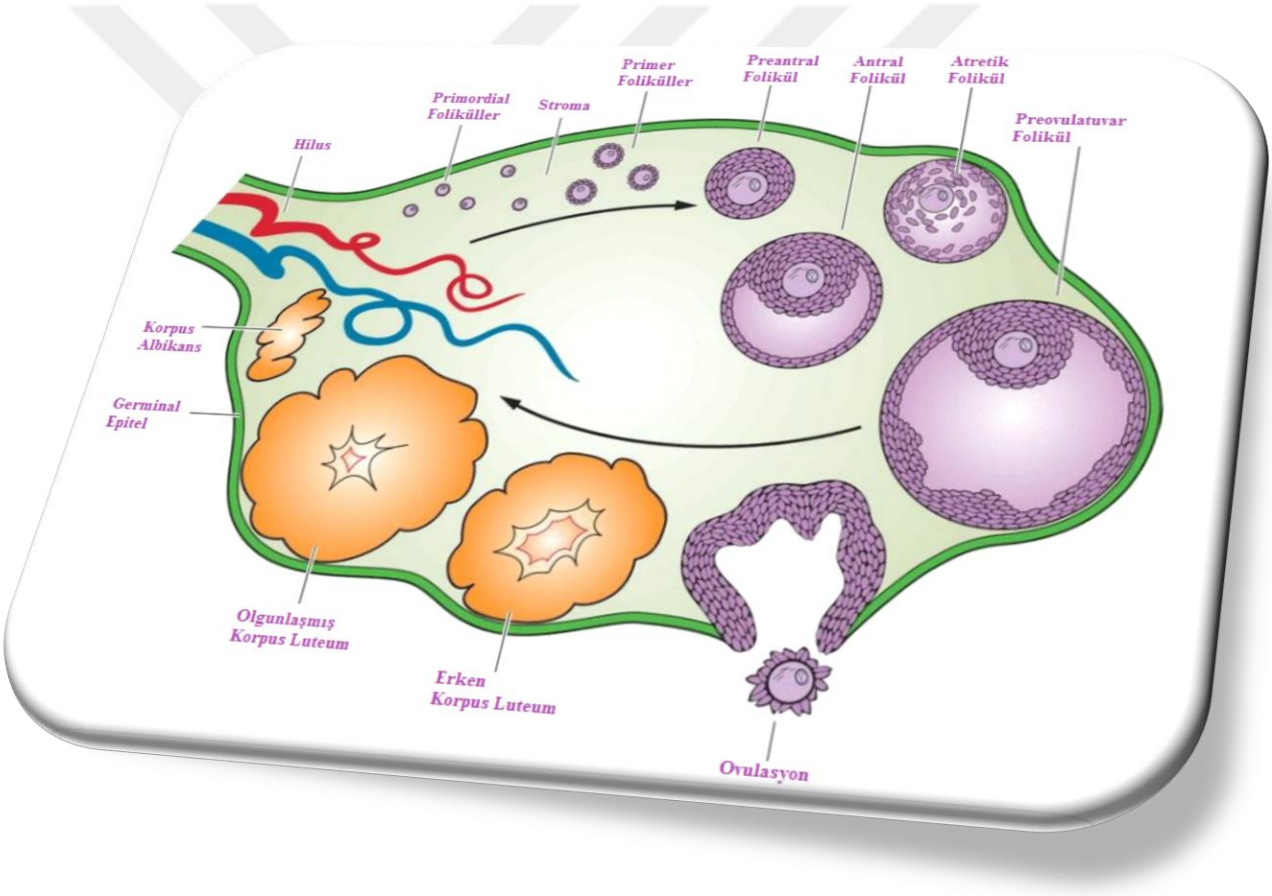
Lenfatik drenaj internal ve eksternal iliak lenf nodları, common ilak lenf nodları ve paraaortik lenf nodlarına direne olurlar. Bu yapılar onkolojik cerrahi açısından son derece önemlidir. Sentinel lenf nodu tayini yapılarak lezyonların muhtemel gidebileceği ilk durak tespit edilebilmektedir (resim 12-2) [23].

12.1.1. **Over Histolojisi / Fizyolojisi**

Damar sinir yapıları overe adına hilus da denilen rete ovarii'den girer. Kuboidal epitel yapısında olan germinal epitel overin dış yüzeyini kaplar. Bu tabakaya tunika albuginea adı da verilmektedir. Medulla overin iç kısmıdır. Overin fonksiyonel en küçük parçası olan ve içinde olgunlaşacak ovumu bulunduran folikül yapılarından daha fakirdir. Hormonal uyarıya cevap olarak primordiyal foliküllerden primer folikül yapısı daha çok kortekste gelişim gösterir [1].

Over, endojen ve ekzojen hormonal uyarılara son derece duyarlı bir organdır. Reprodüktif dönemde boyutlarında ciddi bir artış olmakla birlikte ortalama 5x3x3 cm civarındadır. Postmenapozal dönemde atrofik görünüm kazanır ve boyutları da oldukça küçülür[1].

Foliküller, korteksin alt tabakasında yoğunlaşmışlardır. Burada stroma içerisinde yer alırlar. Folikül yapısı bir oositin etrafına sıralanmış granülosa hücrelerinden oluşmuştur. Stroma denilen yapı daha çok mezenşimal hücrelerden farklılaşan interstisyal hücreler ve konnektif doku barındırır. Bu interstisyal hücreler granülosa hücrelerinden farklı olarak Luteinizan Hormon (LH) etkisine maruz kalarak androjen sentezlemektedirler [1].



Resim 12-2 Overde folikül gelişimi. "Speroff's Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility" ' den modifiye edilmiştir [1].

Medulla over dokusunun iç kısmıdır. Burada daha çok mezonefrik hücrelerden farklılaşmış stromal yapı bulunmaktadır.

Over korteksinin derin tabakasında foliküller yer alır. Her bir folikül yapısı bir ovum üretir. Primordiyal folikül, primer folikül, preantral folikül, antral folikül, graff veya preovulatuvar folikül safhalarına gelişim gösterirler. Ayrıca yine bu folikül yapısının akıbeti korpus luteum ve en nihayetinde korpus albikans olabilmektedir. Luteal korpusa dönüşemeyen ve gelişimi sırasında bir nedenle bozunan foliküller de atretik hale gelir ve atretik folikül adını alırlar[1].

12.1.2. **Over Embriyolojisi**

Fetal hayatta over gelişiminin dört ana safhası vardır [1].

- Farklılaşmamış gonadlar safhası
- Farklılaşma safhası
- Oogonial çoğalma ve oosit oluşum safhası
- Folikül oluşum safhası

12.1.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar Safhası

Bu aşama, gebeliğin 5. haftasında 7-10 gün süren bir aşamadır. Bu safhada gonadlar erkek veya dişi yapısı şeklinde ayırt edilemez.

Daha sonra üriner traktı oluşturacak olan mezonefronlar ve mezonefronları örten çölemik yüzey epiteli formasyonundaki genital kabartı halinde oluşmaya başlar. Gonad çölemik yüzey epiteli hücreleriyle iç içe geçmiş öncü germ hücrelerinden ve medüller mezenşimal dokunun iç çekirdeğinden oluşur.

İlkel gonadal hücrelerin çölom epiteli veya mezonefrik hücrelerin gonadlara göç edip somatik gonad dokusu içine gömülmeleri erkek ve dişi yapıları için farklı düzenlenmiştir.

Erkeklerde bu göçü SPRY2 geninin kodladığı Fibroblast Büyüme Faktörü 9 (FGF-9) adlı protein sağlamaktadır. Eğer bu gen eksprese olmazsa mezonefrik hücreler de göç etmeyeceklerdir.

Primitif germ hücreleri ilk olarak fertilizasyondan sonraki 3. haftanın sonunda görülmeye başlanmaktadır. Embriyo kaudalinde yolk sac bitişiğindeki dorsal tabakada ve arka barsak splanknik mezodermde ayırt edilen primitif gonad hücreleri gonadal çıkıntıya göç etmek zorundadırlar. Bu göçleri amiboid hareketlerle olur. Bu göçün fibronektin ve laminin gibi kemotaktik ve adheziv proteinlerle düzenlendiğine dair şüpheler olsa da net olarak bilinmemektedir.

Gebeliğin 6. haftası sonunda gonadal çıkıntıya göç etmiş ve buraya yerleşerek mitoz ile çoğalmış yaklaşık 10.000 ilkel germ hücresi tespit edilebilmektedir [1].

12.1.2.2. Farklılaşma Safhası

Yolk sak' ın dorsal komşuluğundaki yüzey epitelinden dönüşen ve splanknik mezodermden hareket eden ilkel germ hücrelerinin mezonefrik kanal üzerindeki gonadal kabartıya göçlerini tamamlamaları ve sayılarının yaklaşık 10.000'e ulaşmasından sonra gonadal değişim aşaması başlayacaktır.

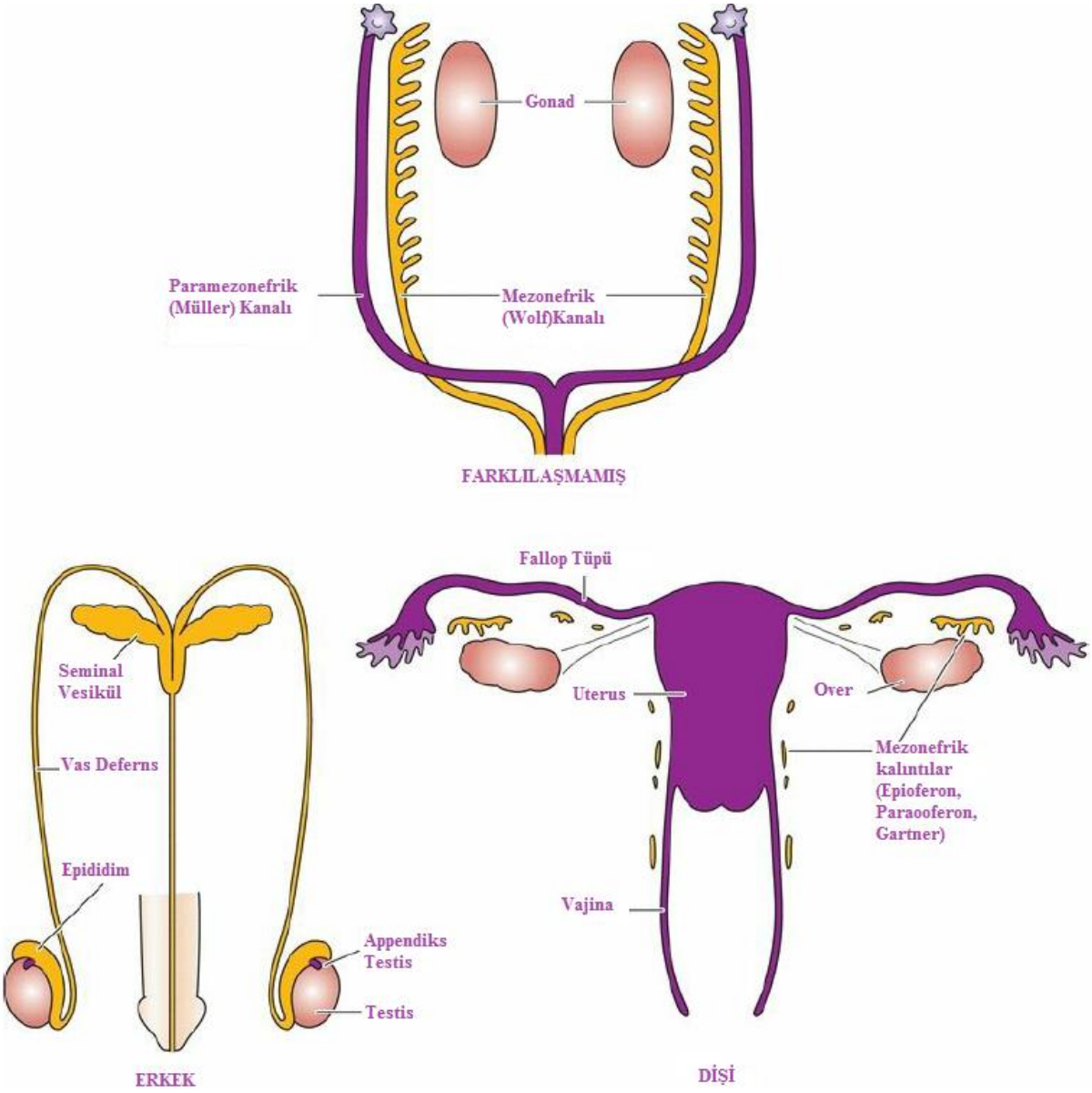
Gebeliğin 6-9. haftaları sırasında gerçekleşir.

Çalışmalar yüzden fazla genin erkek-dişi farklılaşması safhasında etkili olduğunu göstermektedir. Gonad farklılaşması aslında erkek gonadının oluşma veya oluşmama durumudur. Y kromozomu üzerinde bulunan testes determinig faktor (TDF-Testis Belirleyici Faktör) olan SRY gen kompleksi varlığında gonadal yapı stromasında Sertoli hücreleri belirmeye başlar. SRY gen grubu yokluğunda dişi gonadında folikül hücreleri olarak kalacak olan bu grup hücreler daha sonradan erkek gonadı oluşumunda kritik değerde görevi olacaktır. SRY gen kompleksinin etkisiyle bir dizi gen kompleksi de aktifleşecektir. Bunlar farklılaşmanın erkek cinsiyet şekline dönmesine neden olur. Bu hücreler, 19.p13.3. lokasyonunda bulunan AMH (Anti Müllerian Hormon) salgılanmasını sağlayacaktır. AMH etkisini doğrudan müller kanalının regresyonu üzerine gösterecektir. Ayrıca erkek gonadında

primitif kord hücreleri etrafında Leydig hücrelerinin şekillenmesine de sebep olacaktır. Sonuçta mezonefrik kanalın (diğer adıyla Wolfian kanal) sebat etmesi ve paramezonefrik kanalın (diğer adıyla Müllerian kanal) regrese olması ayrıca daha önceden gonadal hücrelerin yine Y kromozomu üzerinde buluan SPRY-2 gen kompleksi sayesinde mezonefrik girintilere göç etmesi ile erkek gonadı şekillenecek diferansiasyon erkek yönüne kayacaktır [2].

Genel ifadeyle Y kromozomu, özelde ise SRY gen kompleksi olmadığında dişi fenotipine dönüşüm gerçekleşir. AMH sayesinde Müller kanalı regrese olur. AMH yoksa, iç genitalya, paramezonefrik kanal olan Müller kanalı sebat eder. Fallop tüpleri uterus ve vajen üst bölümü oluşur. AMH varsa, mezonefrik kanal varlığını koruyacak, epididim, vas afferens, vas deferens, ductus ejakulotorius, seminal vezikül gibi yapılar şekillenecek, Müller kanalı apopitozla varlığını sonlandıracaktır. AMH' nın bir diğer etkisiyle de 8. haftadan itibaren spermatik kord etrafında mezenşim hücresinden gelişim gösteren Leydig hücrelerinden testesteron sentezi başlayacaktır. Bu durum erkek fetüste hCG (Human Corionic Gonadotropin) tarafından da stimüle edilir. T (Testesteron), erkek fetüste ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone), hCG, etkisiyle üretilir. Bu hormon yetişkinde LH / FSH kontrolünde iken intrauterin dönemde fetal ACTH tarafından da üretimi sağlanmaktadır. Testesteronun aromataz enzimi ile dönüşümü sayesinde en güçlü testesteron formu olan dihidro testesteron (DHT) oluşturulur. Bu molekül erkek dış genitalyanın şekillenmesini ve maskülizasyonunu sağlar. Erkek üregenital traktı, üretra, prostat gibi yapıların gelişimi DHT varlığına bağlıdır [1].

Başlangıçta farklılaşmamış gonad yapısı aşamasında hem erkek hem dişi fetüse ait yapılar aynı anda mevcuttur (resim 12.3). Y Kromozomu üzerindeki bir gen kompleksi olan SRY geni sayesinde bir takım gen grupları aktiflenir. Somatik hücrelerden köken alan sertoli hücreleri belirirse AMH sentezlenir ve Müller kanalı regrese olur. Mezonefrik kanal varlığını persiste eder. Leydig hücreleri gelişir. Testesteron sentezlenir. Spermatik kord gelişimi düzenlenir. Testesteronun Di Hidro Testesterona (DHT) dönüşümü sonrası erkek fetüse dış genitalyada da farklılaşım gerçekleşir. Aksi durumda, yani Y kromozomu -SRY gen kommplesi- yoksa Wolf kanalı varlığını koruyamaz. Müller kanalı persiste olur. Gonad yapısındaki germ hücreleri göç etmez, gonadlar internal ve eksternal iliak arterlerin arasında Waldayer'in ovaryan fossasında kalırlar. Müller kanalı persiste olur. Tubal yapılar, uterus, serviks, vajen üst bölümünü oluşturur [1, 2].



Resim 12-3 Gonadal farklılaşma. [1, 2]

Dişi diferansiasyonunda wolf kanal sistemi testesteronun yokluğu sayesinde regrese olur. Müller kanalı persiste olur. Karşılıklı sağ ve sol her iki müllerian kanallar orta hatta bir araya gelir açıkta kalan kısımları tubal yapıları oluştururken, orta hatta birleşen bölgede uterus, serviks, vajen üst kısmı gelişir [2].

12.1.2.3. Oogonial Çoğalma ve Oosit Oluşma Aşaması

Erkek genitalyasının gelişiminin SRY ve SOX9 gibi TDF gen sinyallerine bağlı olduğu gibi dişi fenotipinin oluşumu ve gelişimi de bazı gen grupları tarafından aktiflenen bir takım hücresel sinyallere gereksinim duyar. WNT4 ve RSPO1 genleri bu safhada oldukça önemlidir. WNT4 gen kompleksi etkisini birbirleriyle β-catenin sayesinde yakın ve bağlantılı duran germ hücreleri üzerinde gosterir. Sonunda primordial germ hücrelerinin ayrılmaları gerçekleşir. RSPO1 gen grubu doğrudan somatik SOX9 ekspresyonunu baskılayarak erkek diferansiasyonu engeller [1].

Erkek germ hücreleri mayoz bölünmeye puberteden önce girmezler. Sadece mitozla çoğalma gerçekleşecektir.

Dişi primordiyal germ hücreleri (oogonia) farklı bir gelişim paterni gösterir. Sayıları 9. haftada yaklaşık 10 bin iken, 20. haftaya kadar yaklaşık 6-7 milyon oogonia oluşturacak şekilde mitoz bölünmeyle çoğalırlar. Oogonia hücreleri oosite dönüşümü için mayoz bölünmeye girmeleri gerekmektedir. Doğuma kadar tüm oogonia hücreleri oositlere dönüşmüş olacak ve doğumdan sonra da hemen hemen hiç oogonia kalmayacaktır.

Oogonia, mayoz bölünmeye girmeye başlayınca ismi artık oosit olacaktır. Oogoniaların oosite dönüşümü 11-12. haftalarda başlamaktadır. Sonuçta ikinci trimester sonuna kadar yaklaşık 7 milyon oosit gelişecektir. Bu sayı kadınların reprodüktif rezervi demek olacaktır. Her kadın, bundan sonraki yaklaşık 50 yıl boyunca bu rezervini tüketerek sonrasında da menopoza girecektir. Çeşitli faktörlerle rezerv, olması gerekenden daha hızlı da kaybedilebilir. İlk önemli katastrofik erime doğuma kadarki dönemde gerçekleşecektir. Doğumda yaklaşık bu rezerv 2 – 3 milyon oosite kadar inecektir. Kız çocuğu puberte öncesi gelişimi aşamasında mevcut rezervini yaklaşık olarak 400.000'e kadar düşürür. İkinci büyük rezerv kaybı dönemi de bu aşamadır. Söz konusu bu rezerv kayıpları fizyolojik kabul edilmektedir [2].

12.1.2.4. Foliküler Gelişim Aşaması

Oluşan her oosit etrafında çölom epiteli kökenli pregranülosa hücreleri tek sıra halinde bir araya gelirler. Oluşan bu yapılar primordial folikül öncülleridir. Bu yapılar ilk 20. hafta civarında görülmeye başlanmaktadır. Tek sıra halinde 13 yassı pregranülasa hücresi primer folikül haline geldiğinde kübik yapıya dönüşür.

Doğumda 500.000 ila 2 milyon civarında kalacak olan primordial folikül sayısı ilk mensin başlangıcına kadar azalmaya devam eder. Yaklaşık 400 bin folikül rezervi ile kadın üreme çağı başlar. Her ovulasyonda bine yakın folikül, gelişim sürecine girer ve sonrasında tam olgun hale gelemeden atreziye uğrarlar. Ancak her mens periyodunda çoğunlukla tek ovum 1. mayozunu tamamlayarak döllenebilme yeteneği kazanacaktır [1].

12.1.3. **Ovulasyon**

Pubertede gonadotropin supresyonu nedeni ile foliküler gelişme durmuştur. İlk menstürasyonu ile kadın üreme çağının başladığı kabul edilmektedir.

Başlangıçta döngüsel olarak düzenli olmayan bu süreç zamanla belirli bir periyot haline dönüşür. Her periyotta çoğunlukla bir ovum olgunlaşır ve 1. mayozunu tamamlayarak folikül dışına periton boşluğuna atılır.

Primer folikülün tam olarak olgun folikül haline gelerek ovulasyon olması için gerekli süre yaklaşık 85 gündür. Bu süre çoğunlukla hormonal uyarılardan bağımsız gelişir. Hangi folikülün seçime gideceği içeriğindeki granüloza hücrelerinin I. mayozunun diploten safhasında bekleyen oositle olan iletişim başarısına bağlı olduğu düşünülmektedir. Kadın üreme çağında ovumun döllenebilmesi ve bu safhaya hazırlık ve döllenmeyen ovumun atılarak iç genital yapının yenilenmesi süreçlerini kapsayan dönemsel döngülere menstrüasyon periyodu (kısaca mens diye anılacaktır) denilir. Primer folikülün olgunlaşma sürecinde hormonal etkilerin gözlenmesi mensin başlangıcına denk gelen ilk günlerdir. Genellikle bu safhadan sonra 14 gün civarında ovulasyon gerçekleşir [2, 24, 25].

Oogonialar I. mayoza girmeye başlayınca oosit adını alır. Birinci mayoz profazında diploten evresinde duraklayan olgunlaşma süreci, foliküler gelişme başlayınca devam edecektir. Folikül olgunlaşınca graff folikül halini alır. Plazmin ve diğer birtakım proteazlar sayesinde içindeki ovumu etrafındaki granüloza hücrelerinden oluşan kumulus oophorus ile periton boşluğuna atarlar. Birinci mayoz sonunda oluşan fazla genetik materyal, polar cisim olarak hücre kenarına itilir [26].

12.1.4. **Fizyoloji**

Foliküler olgunlaşma, gonadotropin denilen ön hipofiz salgısı hormonlar olan folikül stimülan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) etkisi altındadır. Bu hormonlar da hipotalamus tarafından üretilip etkisini ritmik salınımı ile gösteren gonadotropin releasing hormon (GnRH) sayesinde kontrol edilirler. Gelişim sürecinde primordial folikül halindeyken yüzeysel gonadotropin reseptörleri belirginleşmeye başlamasıyla foliküller büyümeye başlarlar. Ancak bu aşamaya kadar gerçekleşen olaylar gizemini korumaktadır. Hangi

foliküllerin seçime gireceğine olgunlaşma sürecini tamamlayacağına dair yeterli veri yoktur. Bilinen bir gerçek gonadotropin reseptör sayısını yeterince dengeleyebilen foliküllerin başarı şansının yüksek olduğudur. Foliküler gelişim sürecinde ektili olacak östrojenik mikroçevrenin muhafaza edilebilmesi ancak bu cevabın azalan FSH etkisine rağmen devam ettirilebilmesine bağlı olduğu bilinmektedir [26].

Fimbriyalar tarafından yakalanıp follop tüplerine ve oranın ampulla bölgesine çekilen ovum ve etrafındaki kumulus oophorus ile sperm penetrasyonunu bekler. Sperm penetrasyonu gerçekleşirse ancak II. mayozunu tamamlanır. Onu da II. polar cismin atılması sayesinde gözlemleriz. Sonuçta 23 kromozoma inmiş genetik materyal ile spermden gelen diğer 23 kromozom zigotu oluşturacaktır. Zona pellisuda sayesinde zonal reaksiyon gerçekleşecek hücre içine başka bir spermden kaynaklanabilecek genetik materyal girişine engel olunacaktır.

Foliküler yapı içerisinde granülosa ve teka hücreleri görev alırlar. Granülosa hücreleri östrojen (E_2) sentezlerken teka hücreleri androjenleri sentezlerler. Granülosa hücreleri E_2 üretimini kolesterol prokürsörünü kullanarak denovo yapabildikleri gibi teka hücreleri tarafından üretilmiş androjenleri de östrojenlere "aromataz" enzimi aracılığı ile dönüştürebilmektedir. Başarılı foliküller teka hücrelerinin sentezlediği androjenik mikroçevreyi östrojenik mikro çevre haline getirebilmelerine bağlıdır. Bunu gerçekleştirebilen foliküller graff folikül haline kadar gelişir. Her menstüral siklusta yalnızca bir ovum etrafındaki zona pelisudası ile over dışına atılır. Bu sırada tuba uterinanın infindibulular parçasındaki fimbrialar göreve dahil olur. Periton boşluğuna atılmakta olan ovumu yakalayıp uterusa doğru çekebilmek onun görevidir [2].

12.1.5. **Menstürasyon**

FSH etkisi ile gelişimini sürdüren primer folikülün granülosa hücre sayısı artar. Artan granülosaları sayesinde Östrojen (E) ve İnhibin (I) sentezler. I etkisiyle FSH azalır. Büyümeye devam eden folikülde daha fazla E sentezi olurken teka hücrelerince sentezlenen androjenler (Androstenedion) sayesinde birçok folikül granülosa hücre sayısını artıramazlar. Bu da yüzeyel FSH ve LH reseptör sayısını artıramayacakları anlamına gelir. Sonuçta birçok folikül, daha az reseptör taşıyan ve miktarı azalan gonadotropinler yüzünden gelişimini durdururlar. Östrojenik

mikroçevre oluşturmayı başarabilen folikül ekstra sellüler içeriği östrojen, proteaz öncülleri gibi moleküllerden zengin hale getirir ve büyütür. Bunu folikülde antrumun gelişmesi olarak gözlemleriz. Antrum geliştikçe önce preantral folikül sonra antral folikül halini alır. Sayıları bine yakın folikül bu safhadan sonra atreziye uğrar çünkü azalan gonadotropin seviyesi sayesinde moleküler yüke cevap veremez. Antral foliküllerden çoğunlukla bir tanesi veya pek azı çapı 16-20 mm olacak şekilde graff folikül halinde matür hale gelir. İşte bu aşamada artmaya devam eden E' nin eşik konsantrasyonu aşması ve gonadotropin releasing hormonun (GnRH – Gonadotropin Releasing Hormone) konsantrasyon pulsasyonunu değiştirerek LH – FSH piklerinin oluşması gerçekleşir. Yüzeyinde yeterince gonadotropin reseptörünün varlığı sayesinde LH pikini (surge) algılayan ovum, I. mayozunu tamamlar ve I. polar cismini hücre kenarına doğru iter. Bu aşamada artan E sayesinde uterusta proliferasyon gerçekleşmiştir [25].

Dölyatağı, yavaş yavaş implantasyona hazır hale geliyordur. Prolifere olan endometrium, tam olarak implantasyona hazır hale gelip olgunlaşmak için glandüler sekresyona ihtiyacı vardır. Tam da bu aşamada ovulasyon sonrası ovumda graff folikül artığından geri kalan korpus görev üstlenir. Bu artığın adı artuk korpus luteum (CL) dur. CL, yağlı yapısı gereği sarı renklidir steroid hormon olan progesteronu (P) ve protein yapıdaki Relaksin (R) Inhibin - A sentezler [2]. Steroid yapıdaki bu hormon, kadın iç genitalyasını matür oositin döllenmesine ve sonrasında zigotun gelişmesine, gelişen blastokistin endometriuma implante olmasına, implante olan blastokistin plasental gelişimini tamamlayıp steroid hormon sentez görevini ona devredinceye kadar CL tarafından salgılanacaktır.

Ancak kadının reprodüktif fizyolojisi, kendini tamamen o amaca yönelik programlamış olsa da ne yazık ki "gebeliğin" istisna olduğunu bilmek gerekir. Bir kadının hayatı boyunca en çok literatüre geçmiş olan 27 gebeliği mevcuttur [27]. Ortalama 1,88 (TUİK – tüm reprodiktif kadın başına toplam gebelik sayısı – toplam doğurganlık hızı) olan bu sayı [28] kadının reprodüktif yaşamı boyunca 400 menstürasyonu için istisna olduğu kabul edilmelidir.

Gebe kalınmadığında tuba uterinanın ampullası içerisinde bekleyen matür oosit, artık atılmak üzere uterusa doğru taşınır. Uterus içerisinde döllenme olsa da gebeliğin devam etmesini sağlayacak olan prosedürlerin gerçekleşecek zamanı kalmadığından tam anlamıyla gebelik oluşmayacaktır. CL, tam olarak 14 gün boyunca hayatta kalır. Bu süre tamamlandığında eğer ortamda devam etmesini sağlayacak LH veya ona çok benzer olan hCG hormonu yok ise

atrofiye uğrar. Yani plasenta oluşmuşsa ve hormon salgılayabiliyorsa CL, varlığını devam ettirebilir. Aksi halde 14. gün sonunda hormon salgılamayacak ve atrofiye uğrayıp corpus albicans adını alacaktır. Ortamdan progesteron çekilmesiyle sekretuar endometrium beslenmesini kaybedecek dökülecek ve vücut dışına atılacaktır. Kadın bunu her periyotta mens kanaması şeklinde yaşayacaktır.

Her menstürasyon periyodunun süresi 22 – 35 gün arasıdır. Ortalama 28 olan bu sürenin ovum açısından foliküler olan safhası değişkenlik gösterebilir. Ancak luteal fazı sabittir. Yaklaşık 14 gün olan bu süre gebelik gerçekleşmezse korpusun regresyonu ile sonuçlanır [25].

12.1.6. **Hormonal düzenleme**

GnRH hipotalamus tarafından pulsatil olarak salgılanır. GnRH, hipofiz ön lobunca sentezlenecek gonadotropinlerin çeşidini, sentez miktarını kontrol eden orkestra şefinin elindeki baton gibidir. Hipotalamustaki ventral çekirdekler tarafından salınan GnRH, orkestra şefinin elindeki batonun yukarı aşağı hareketleri gibi hormonal salınımın pulsasyon frekansını değiştirerek hipofiz ön lobundaki gonadotrop hücreleri yönetir. GnRH 25 dakikalık pulsasyonlar yaptığında ön hipofiz buna LH üreterek, 45 dakikalık pulsasyonlarında ise FSH üreterek yanıt verir. Sürekli yüksek düzeydeki GnRH' a hipofiz gonadotropin üretimini durdurarak yanıt verir. Yine GnRH yokluğunda gonadotropinler sentezlenmez ve salınmazlar [2].

Primer foliküller, yassı formasyondaki 13 adet granülosa hücresi kuboid hale gelmiştir. Bu kübik 13 adet folikül hücrelerinin yüzeylerinde gonadotropin reseptörleri görülmeye başlamasıyla artık foliküler büyümeye gireceği anlaşılmıştır. FSH etkisindeki primordial foliküller gelişmelerini sürdürürler. İçeriğindeki granülosa hücreleri sayılarını artırırlar. Etrafındaki teka hücreleri de sayıca çoğalmaya başlayacaktır. Ortalarındaki oosit hormon duyarlıdır ve folikülün diğer hücreleriyle gap junctionlar aracılığı ile ilişki içerisindedir.

Büyüyen folikül hücrelerinden E, Inhibin-B sentezlenir. Bu durum FSH üzerinde baskıya neden olur. E düzeyi eşik değeri aştığında ki bu yaklaşık olarak ovulasyondan 24 – 36 saat öncesine denk gelir LH surge gerçekleştirir. LH surge ovulasyondan 10 – 18 saat öncesinde gerçekleşir. LH piki ile folikül içerisindeki proteazlar prekürsörlerinden sentez edilir ve folikül

duvarı yırtılarak matür oosit folikülden expulsiyon ile dışarı fırlatılır. Çevresini saran granülosa hücrelerinden oluşmuş kumulus ooforus ile matür oosit dışarı atıldıktan sonra folikül içerisinde geriye daha az granülosa ve daha çok teka hücrelerinden zengin korpus luteum kalır. Stoplasmalarındaki lipid vakuolleri nedeniyle sarı renk ağırlıklı olduğundan sarı cisimcik adını alan bu yapıdan P (Progesterone) gibi steroid hormonlar ve Inhibin (özellikle Inhibin -A), Relaksin, IGF gibi bir çok protein hormonlar sentezlenir. Ta ki gebelik oluşup bu hormon sentez görevini plasentaya devredinceye kadar varlığını korur. Gebelik oluşmazsa 14. günde tamamen etkisiz hale gelmiş olacak ve hormon sentezini corpus albikans haline dönüşerek durduracaktır.

Inhibin B baskısından E etkisiyle kurtulan LH pik seviye ulaştıktan sonra bazal düzeyine geri döner. Corpus luteum tarafından salgılanan Inhibin – A sayesinde de varlığını devam ettirdiği 14 gün boyunca FSH ve LH düzeyleri artmaz [2].

12.2. Rat Overi ve Diğer Genital Yapıları

Yaklaşık 0,5 X 0,3 cm boyutlarında fossa ovaricada adipoz doku içerisinde gömülü şekilde bulunur. Ratlarda overlere ulaşım için iki çeşit insizyon yaklaşımı vardır. Birincisi abdominal yaklaşım, ikincisi lateral subkostal yaklaşım. Biz çalışmamızda ikinci yöntemi postop bakım kolaylığı ve kısa operasyon süresi avantajları nedeniyle tercih ettik (Resim 12-4) [29].



Resim 12-4 Rat overi,

12.2.1. Rat Overi ve Gelişimi

Rat overi yaklaşık 0,5 X 0,3 cm boyutlarında her iki böbrek alt ucuna yakın yerleşimli yer alan fossa ovaricalarda adipoz doku içine gömülü olarak bulunur. Her iki follop tüpü overlere orta hatta yakın kutuptan yaklaşarak komşuluk eder. Fimbrial uçtan over dokusuna temas eden fallop tüpleri orantısal olarak insanlardakinden farklıdır. Uterus collumuna yakın sonlanan fallop tüpleri 0,5 cmlik kısa bir bölgede birliktelik gösterirleri. Sonrasında servikal uçla sonlanırlar. Forniks oldukça yüzeye yakındır. Vajen derinliği çok kısadır [29].

Böbreklerin kranial kısmında yer alan overler yeni doğan dişiden 4 haftada olgunlaşır. Tıpkı insanlarda olduğu gibi ratlarında over gelişimi 4 bölüme ayrılmıştır;

i. Neonatal dönem (doğumdan sonraki ilk 7 gün);

ii. İnfantil dönem (doğumdan sonraki 8-21 gün arası dönem);

iii. Juvenil dönem (doğumdan sonraki 21 – 32 gün arası);

iv. Pubertal dönem (Juvenil dönem sonrasındaki 3 gün).

Neonatal dönemde, hipotalamo hipofizer aks düzgün çalışmaz. Gonadotropin sentezlenmez. İlk gonadotropinler infantil dönemde ortaya çıkarlar. FSH ve LH sentezlenmeye başlar. Bu sayede aslında bir miktar foliküler gelişim de görülmektedir. Ancak ovaryan gelişimin tamamlanması ancak pubertal dönem sonunda olacaktır. Çünkü rat ovaryumun tam olarak olgunlaşması için PRL (Prolaktin) ve GH (Growth Hormon) da gerekecektir. Onlar da ilk olarak 28. günden itibaren sentezlenmeye başlayacaktır [29].

12.2.2. **Ovaryumdaki Hücre Çeşitleri**

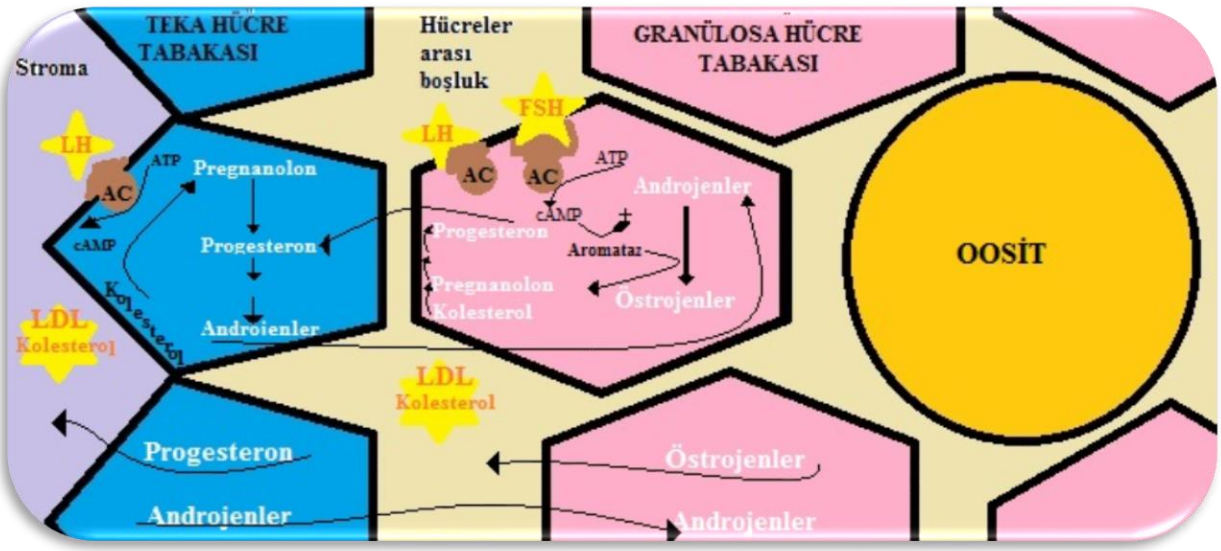
Ovaryumda 32-35. günlere gelmiş rat overi gelişimini tamamlamıştır. İçerisinde primordial foliküller yer almaktadır. Bu foliküller her bir ovumu çevreleyen ve üzerinde ağırlıklı olarak FSH reaseptörü barındıran granüloza hücrelerinden ve onun da dışında yer alan teka hücrelerinden oluşur. Teka hücreleri ağırlıklı olarak LH reseptörü içermektedir. Yine az mikarda FSH reseptörü de bulundururlar. Overde stromal yapılar arasında fibroblastlar damar ve lenfatik yapılar da yer alır. Stroma, foliküller dışında kalan alandır.

Granüloza hücreleri ağırlıklı olarak içerdikler FSH sayesinde gelişirler ve E2 üretmeye başlarlar. Ovulasyondan hemen önce de E2 ye ek olarak progesteron ve Inhibin üretirler.

Teka hücreleri de ağırlıklı olarak LH etkisiyle progesteron ürretmekle birlikte daha sonra granüloza hücrelerince E2 ye dönüştürülmek üzere androjen üretirler [29].

İnsanlardaki gibi “iki hücre iki gonadotropin teorisi” geçerlidir [30, 31].

Rat ovaryumunda foliküler yapılar ve stroma yer almaktadır. Dışarıdan içeriye doğru bir folikülün yapısında çok sıralı "Teka hücre tabakası" ve oositin etrafına sıralanmış tek sıralı "Granülosa hücre takabası" yer almaktadır. Granülosa hücre grubu FSH reseptörleri ağırlıkla olmak kaydıyla gonadotropin reseptörlerini içerir. Her iki reseptör de Adenozin Siklaz aktivitesine sahiptir. Bu enzim Adenozin Tri Fosfat (ATP) molekülünden siklik Adenozin Mono Fosfat (cAMP) üretir. cAMP, Kolesterolün Pregnanolon üretim basamağı altında hız kısıtlayıcı basamakta görev alır ve enzim sayesinde Pregnanolon üretimi artırılır. Steroit hormon sentezinde son ürüne doğru akış gerçekleşir. Sonuç olarak LDL kolesterol yapısı içindeki kolesterolü hücre içine alıp Pregnanolon ve son basamakta Progesteron üretir. Progesteronu Teka hücresine gönderir. Teka hücreleri yine stroma üzerinden dolaşım yoluyla gelen LDL içeriğindeki kolesterolden LH etkisiyle cAMP artışı sayesinde Pregnanolon üretir. Pregnanolon devam eden basamaklar sonucunda Progesteron üretimini gerçekleşir. Hem üretilen Progesteron hem de Granülosa hücresinden edinilen Progesteron Teka hücresinde Androjenlere kadar dönüştürülür. Androjenler Granülosa hücresine dönerler. Burada androjenlerin aromataz enzimiyle aromatizasyonu sonucu Östrojenler oluşturulur. Her bir folikülde bu süreç östrus siklusu boyunca tekrarlar durur. Üretilen androjenleri yüksek oranda östrojene kadar dönüştürebilen folikül sebat ederken diğer başarısız foliküller atreziye uğrarlar. Her siklusta en fazla 10 adet matür ovum geliştir (resim 12-5) [4].



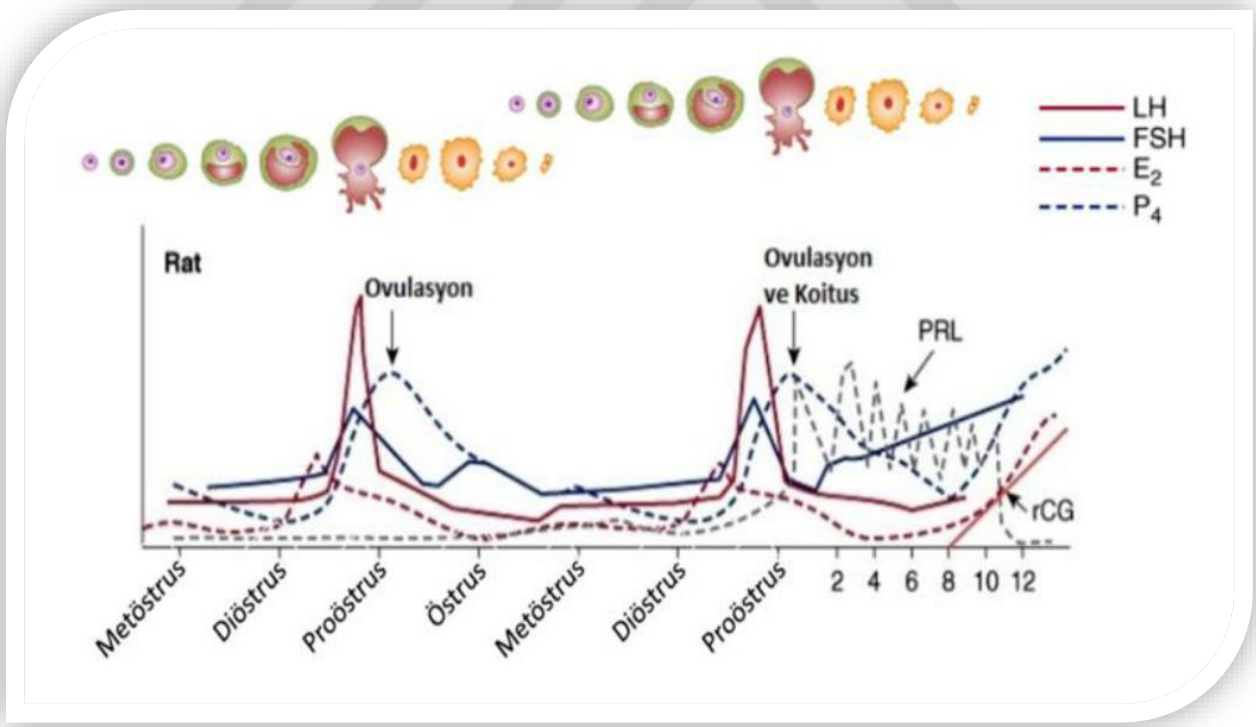
Resim 12-5 Rat folikül yapısı [4].

12.2.3. **Östrus Siklusu**

Overyal siklus ratlarda östrus siklusu olarak ifade edilir. Ratlar gebe kalmadıkları süre boyunca düzenli periyotlarla östrusa girerler. Günlük periyotlar halinde oluşan bu sikluslar her rat için yaklaşık 1 yıl kadar sürer. Ratlar yaşamları boyunca yaklaşık 15 östrus geçireceklerdir [32].

Ratlar doğumları sonrası 4 haftada puberteye ererler. Bunu takib eden 8-10 ay boyunca düzenli östrusu devam eder. Yaklaşık 15- 16. aylara kadar da düzensiz siklusları devam edecektir. Onsekizinci aydan sonra devamlı diöstrusta kalır.

Hayvanların uygun çiftleşme zamanı için kızgınlık dönemi ifadesi kullanılır. Bu durumu tetikleyen hormonal değişimler albino ratlarda en erken 32. gün itibari ile başlamaktadır.



Resim 12-6 Östrus siklusunda folikül olgunlaşmasını ve hormonel değişimi gösteren tablo [3].

Ratlar her 28 günde bir östrus gösterirler. Östrus siklusu ratlarda, yaklaşık 4-5 gün sürer. Preöstrus, östrus, metöstrus, diöstrus safhalarına ayrılır. Preöstrus 12 saat, östrus 12-24 saat, metöstrus 6-8 saat, diöstrus 52 – 60 saat sürer. Diöstrus erken ve geç diöstrus diye iki bölüme ayrılır. Korpus luteum oluşumu diöstrusun erken döneminde olur. Korpus luteum gebelik oluşmaz ise iki günde kaybolur (resim12-6) [29].

Siklusun düzenliliği aydınlık-karanlık sürekliliğinin düzenine bağlıdır. Onikişer saatlik gündüz/gece periyotunda östrus siklus süresi 4 gün sürmektedir. Eğer 18 saat aydınlık 6 saat karanlık düzeni oluşturulduğunda östrus siklusu 5 gün olmaktadır. Yirmi iki saat üzeri aydınlıkta östrrus siklusunun düzensiz olduğu gözlenmiştir [29].

Tüm foliküler gelişme, ön hipofizden salınan gonadotropinlerce düzenlenir. Foliküler gelişmeyi gerçekleştiren aslında 17β Östrojen' dir. Metöstrus ve Diöstrus safhasında hemen hemen hemen hiç 17β Östrojen üretilmezken Diöstrusun ikinci safhasından itibaren sentezlenmeye başlar ve Proöstrus ortalarında pik seviyeye ulaşır. Bu aşamada LH pikini tetikler. 17β Östrojen, pik seviyesine ulaştıktan hemen sonra tekrar düşer. Foliküler olgunlaşmanın zirvesinde LH piki sayesinde Östrus safhasının ortalarında ovulasyon gerçekleşir. Sonuçta Proöstrus ve Östrus fazında ovaryumda folikül gelişimi olurken östrus fazının ortalarında ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyondan hemen sonra da CL oluşur [33].

Progesteron düzeyi metöstrus ve proöstrus safhasında yüksektir. En yüksek seviyesi de proöstrus safhasındaki pik değeridir. Diösturus safhasında ise en düşük düzeyindedir [3].

Çiftleşme PRL düzeyleri üzerine etkilidir. Çiftleşme olduğunda PRL düzeyi artarken, bu da CL sebat etmesini sağlayacaktır. CL sebat ettiğinde de P sayesinde gebeliğin devamı sağlanacaktır. LH düşüktür. Ancak FSH artmaya devam etmektedir. FSH sayesinde folikül gelişimi devam eder. Çiftleşme olmazsa siklus boyunca PRL düzeyi hep sabit düşük kalır. Bu sayede CL en fazla 2 gün sebat edecek sonra dejenere olacaktır [34].

12.2.4. **Korpus Luteum**

Korpus Luteum (CL), ovulasyon sonrası geride kalan folikül hücrelerince oluşturulur. Prolaktin, Granüloza hücrelerinde LH reseptör ekspresyonunu uyarır. Böylece gebe CL oluşmasında Prolaktin ile tetiklenen reseptör ekspresyonu sayesinde CL büyük hücreleri granülosa hücreleri tarafından oluşturulur. Gebe kalmayan ratlarda ise PRL etkisi olmayacağından sadece 2 gün kadar varlığını koruyabilecek olan CL içerisinde daha çok küçük hücre ağırlıklı yani teka hücreleri barındıran CL izlenir. Bu hormonal dengeler göz önünde bulundurulduğunda 4 çeşit CL karşımıza çıkmaktadır [35] .

i. Siklik CL;

ii. Gebelik CL;

iii. Laktasyon CL;

iv. Yalancı gebelik CL.

Ovulasyondan sonra iç salgı bezine dönüşen CL, gebelik gerçekleşmediği taktirde 2 gün içinde regrese olur. Artık korpus albikans (CA) dönüşmüştür. Buna siklik CL adı verilir. Gebelik gerçekleştiğinde PRL nin uyardığı granülosa hücreleri üzerinde LH reseptörleri belirginleşmesiyle büyük luteal hücrelere dönüşür. Gebeliğin sonuna doğru prostaglandin F2α (PGF2α) artmasıyla CL' dan P sentezi inhibe edecektir. Laktasyonda PRL tarafından düzenlenen ve yaşamını devam ettiren bir CL vardır. Bu CL, laktasyonun ilk döneminde gelişmekte olan antral foliküllerin dejenere olmasını sağlayacaktır. Yalancı gebelik CL'u ise siklik CL den daha büyüktür. Endometriumda implantasyonu destekleyecek değişiklikleri yapmaya yeterli P üretir. Ancak gerçek implantasyon olmadığı için plasental hormon eksikliğine bağlı CL dejenerasyonu 12- 14. günlerde gerçekleşecektir [35].

12.2.5. **Vajinal Smear**

Östrus siklusunda hormonların siklik değişimleri vajinal epitel üzerinde belirgin değişiklik meydana getirir. Vajinal açıklığın gözlenmesiyle smear alınarak östrus siklusu takip edilebilmektedir. Östrus siklusunda proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus safhalarında hücresel değişiklikler hormonların etkisiyle kornifiye epitel, çekirdekli epitel hücreleri, lokosit yapıdaki çekirdekli hücreler ile mukuoid yapılar gözlenir. Bu hücrelerin orantısal durumlarına göre östrus siklusu safhası takip edilmektedir. Proöstrus safhasında nükleuslu kornifiye epitel hücreleri bolca görülür. İleri proöstrus ve östrus safhasında ise artık çekirdeklerini kaybetmiş kornifiye epitel hücreleri belirgindir. Metöstrusun başlamasıyla tüm hücre tabakaları dökülmeye başlamıştır. Bolca hücre görünümü mevcut, kornifiye hücreler çokça olmak kaydıyla her tip hücre görünümü mevcuttur. Diöstrus iki aşamalı olarak değerlendirilir. Diöstrus 1 de nükleuslu lokosit yapıdaki hücre hakimiyeti olacaktır. Bu durum metöstrusun bittiğini de gösterir. İlerleyen yaşamda gitgide bu piknotik çekirdekli hücrelerin de azaldığı mukoid fragmanların arttığı hücresel fakirlik dönemi olan diöstrus 2 safhası gerçekleşir. Böylece siklus tamamlanmış olur [36, 37]

12.3. Over Rezerv Testleri

Azalmış over rezervi (DOR) olan kadınlar; benzer yaştaki kadınlara kıyasla yumurtalık stimülasyonuna veya doğurganlığa cevabı azalmış olan adet görmekte olan üreme çağındaki kadınlar [38] olarak tarif edilmektedir. Bir takım analiz yöntemleri ile over rezervini tahmin edebilmek mümkündür. Bu sayede kadın infertilitesine yaklaşım konusunda somut bir kanıt elde edilebilecektir [39].

Kadınlarda over rezervinin kaybedilmesi sorunu öncelikle kanser tedavisi altındayken meydana gelmektedir. Kemoterapi veya radyoterapinin over rezervini azaltıcı yönündeki etkisi bilinir. Aşağıdaki tabloda (Tablo 12-1) üreme çağı ve çocukluk çağı kanserlerinde sık kullanılan kemoterapötiklerin gonadotoksik riskleri tartışılmıştır [40].

Yine çocukluk çağı ve üreme çağındaki kanser tedavisi için uygulanacak radyoterapi de over rezervini azaltmaktadırlar (Tablo 12-2) [41]

Kadınlarda DOR' a neden olabilecek kanser dışı durumları da şu şekilde özetleyebiliriz [41, 42];

i. Ailevi erken menopoz öyküsü

ii. Genetik nedenler (turner sendromu, FMR-1 gen mutasyonu, musküler distrofi, BRCA-1 taşıyıcılığı, BMP-15 mutasyonu)

iii. Otoimmün hastalıklar (tiroid, adrenal, otoimmün poliglandüler sendromlar, diğer)

iv. Metabolik hastalıklar (galaktozemi, diabetus mellitus)

v. Medikal risk faktörleri (endometriozis)

Kemoterapötik Gruplar	Kemoterapötik ajanlar	Etki Mekanizması	Gonadotoksik Etki
Alkilleyici Ajanlar	Siklofosfamid Metkloretamin Klorambusil Melfalan İsofosfamid Busulfan	Hücre siklusuna özgü olmayan ilaçlardır. En fazla "G1" ve "S" dönemine etkilidir. DNA'nın nükleofilik gruplarına irriversible bağlanırlar. DNA transkripsiyon ve replikasyonunu bozarlar	Yüksek
Antimetabolitler	Metotreksat 5-Fluoraurasil	"S" dönemine, bölünen hücrelere etkilidir. Primidin ve pürin sentezini bozar. DNA ve RNA sentezi bozulur	Düşük
Vinka alkaloidleri	Vinblastin Vinkristin	"M" dönemine etkilidirler. Mitozun metafaz döneminde mitoz iğciklerinin oluşmasını engellerler. Mikrotubullerin yapıtaşı olan tübülin moleküllerine bağlanarak biraraya gelmelerini engellerler.	Düşük
Platinyum deriveleri	Sisplatin Karboplatin	Hücre siklusuna özgü olmayan ilaçlardır. DNA çift zincirinde çapraz bağlanma yapar.	Orta
Antibiyotikler	Daunorubisin Bleomisin	Döneme özgü değildir. DNA çift zincirinde komşu guanin-sitozin baz çiftleri arasına yerleşerek (interkalasyon) DNA sentezini ve mRNA sentezini (transkripsiyon) bozar.	Düşük (Adriamisin: Orta)

Tablo 12-1 Reprodüktif ve çocukluk çağı kadın kanserlerinde uygulanan medikal tedavilerin gonadotoksik etkileri [40].

Radyoterapi Protokolü	**Dozu**	**Yaş Grubu**	**Gonadotoksik Etki**
Tüm vücut ışınlanması (Kemik iliği trans-plantasyonu ya da kök hücre nakli için)			Yüksek
Pelvik ya da tüm abdomen ışınlanması	≥ 6 Gy	Erişkin	Yüksek
Pelvik ya da tüm abdomen ışınlanması	≥10 Gy	Postpubertal kızlar	Yüksek
Pelvik ya da tüm abdomen ışınlanması	≥15 Gy	Postpubertal kızlar	Yüksek
Pelvik ya da tüm abdomen ışınlanması	5-10 Gy	Postpubertal kızlar	Orta
Pelvik ya da tüm abdomen ışınlanması	10-15 Gy	Postpubertal kızlar	Orta
Kraniospinal radyoterapi	≥25 Gy		Orta

Tablo 12-2 Çocukluk çağında veya reprodüktif dönemde kadın bedenine uygulanacak radyoterapinin gonadotoksisitesini gösterir tablo [41].

Over rezervi overin taşımakta olduğu primordial folikül sayısıyla doğru orantılıdır. Üreme çağındaki kadın, doğumunda dünyaya getirdiği yaklaşık 3-4 milyon primordial folikülün önemli bir kısmını adelosan çağa gelinceye kadar kaybedecek normal şartlarda 300 ila 400 bin primordial folikül ile adet görmeye başlayacaktır. Yaşamının bundan sonrasında da karşılaşacağı çevresel şartlar ve/veya sağlık sorunları ile rezervlerini menapoza kadar hızlıca tüketecektir. Bir kadın yaşamı boyunca en çok 400 kez adet olabileceği bilinmektedir Bu sebeple yaklaşık sayı değişmekle birlikte ortalama her ay bin civarı folikül kaybı gerçekleşecektir [42].

Kadın fertilizasyonunu korumak bu rezervin miktarını bilmekle ilişkilidir. Rezervin öngörülmesi için uygulanabilecek yöntemler tarif edilmiştir [43];

i. Bazal FSH tayini,
ii. AMH (Anti Müllerian Hormon) ölçümü;
iii. Antral folikül sayımı (AFC);
iv. Estradiol (E2) ölçümü;
v. Inhibin B (I-b) ölçümü;
vi. Clomiphene Citrate Challenge test (CCCT)
vii. Over hacim ölçümü;
viii. Kombine ovaryen rezerv testleri.

12.3.1. **Bazal FSH tayini**

Folikülogenezisin erken aşamasında yapılan FSH hormonu testidir. Bu değer FSH hormonunun bazal yani en az seviyesini ortaya koyar. Bilinmelidir ki folikül sayısı azaldıkça yani gonadotropinlere verilen foliküler yanıt (Inhibin B ve E2) azaldıkça hipotalamustan daha çok gonadotropin üretimi için hipofize talimat gönderilir. Sonuçta siklus sonunda FSH ın bazal seviyesi, reprodüktif dönemdeki akranlarına göre DOR olan kadında daha fazla olacaktır [44].

Bazal FSH değeri siklustan siklusa değişkenlik gösterebilmektedir. Bu durum yüksek spesifite (%45-100) ancak zayıf sensitivite (%11-86) olarak nitelendirilir [45]. Testin negatif olması durumunda yani FSH değerlerinin 10 IU/L (10-20 IU/L) un altında olduğunda DOR un olmadığını söyleyebiliriz. Ancak belirlenen sınır değerler aşılsa dahi DOR olduğuna kanaat gelinemeyebilir (yüksek özgüllük zayıf duyarlılık). Bu test 40 yaş altında bir kez anlamlı gelmesi DOR tanısı koyabilmek için yeterli olmayabilir [46].

12.3.2. **AMH (Anti Müllerian Hormon)**

AMH, Transforming Growth Factör Beta (TGF-β) ailesinden glikoprotein yapıda bir hormondur. 19. Kromozomun kısa kolunda 13.3 lokasyonunda (19P13.3.) loküle gen aracılığı ile eksprese olur yani somatik kaynaklıdır. Erkeklerde sertoli hücrelerince embriyogenez safhasında oldukça aktif olarak çalışsa da üreme çağındaki kadınlarda küçük ve büyük preantral foliküllerde, küçük antral foliküllerden granülosa hücrelerince sentezlenirler. Sentezi siklusun hangi aşamasında olursa olsun stabildir. Foliküller aktif olduğu müddetçe ve gelişmekte olan folikül sayısı kadar üretilir. Folikül sayısı azaldıkça sentez miktarı da azalır, belli bir düzeyden sonra sınırlanma eşik değeri olarak belirlenebilecek bir sınır değeri mevcuttur (3,36 – 5 ng/mL). Bu değerlerde sensitivitesi %90 lara, spesifitesi de %94 lere kadar çıkmaktadır [2, 47].

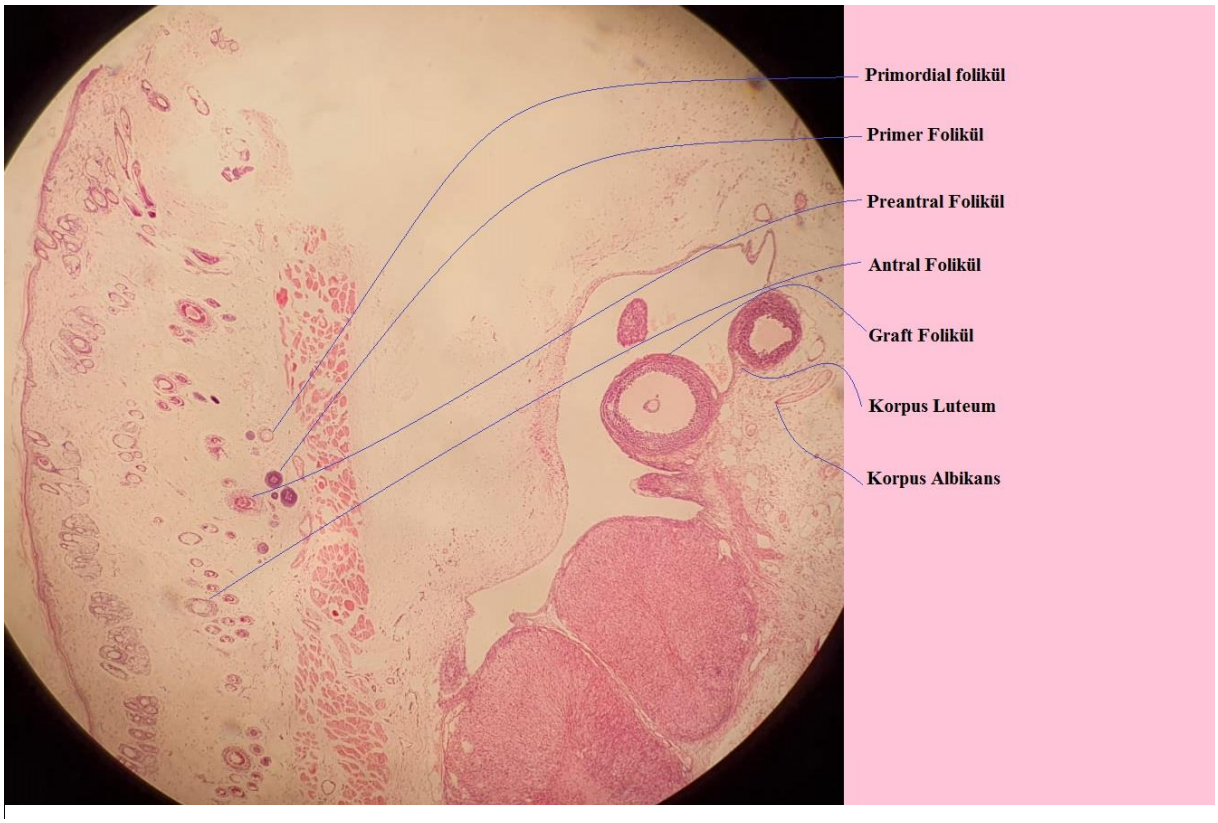
Bu testin referans değeri arasında fark, piyasadaki AMH kitlerinin iki farklı firma tarafından farklı standartlarda sonuç vermesinden kaynaklanır. ABD ve EU standartı farklılıkları testin genel bir aralık belirlemede etkisiz bırakmaktadır. Bunun yanında PKOS (Polikistik Over Sendromu) gibi hastalıklarda hatalı negatif sonuç verebilmektedir (AMH beklenenden yüksek ölçülebilir). Yine oral kontraseptif ilaçlar, GnRH agonist ilaçları, minipiller, sigara, içki obezite aşırı yağlı diyet gibi yaşam tarzı farklılıkları, D vitamini düşüklükleri gibi dış faktörler de AMH değerinin beklenenden düşük ölçülmesine sebep olabilmektedir [48].

Tablo 12-3 de tartışıldığı üzere serum AMH düzeylerini etkileyen birçok faktör vardır. Ancak bütün bunlara rağmen standartize edilmiş bir deneyde veya bir kadına ait rezerv takibi gibi yöntem spesifik bir AMH araştırması over rezervine dair son derece değerli veriler sunabilme potansiyeline sahiptir. AMH özellikle bu açıdan gruplandırılmış popülasyonda yapılabilecek araştırmalar ve hayvan deneyleri için değerli bir parametre olarak öne çıkmaktadır.

Potansiyel Faktör	Değişkenlik durumu
Irk ve etnik yapı [49, 50]	Beyaz ırk, siyak ırka, çinli ve latinlere göre yüksek değerdedir.
Crohn SLE gibi sistemik hastalık [51, 52]	Azaltır
BRCA1 gen taşıyıcılığı [53]	Azaltır
FMR1 Premutasyonu [54]	Azaltır
Oral antikontraseptif ilaçlar ve GnRH agonisti gibi Ovaryan supresyon [48, 55]	Azaltır
PKOS (Polikistik Ovarian Sendromu) [56, 57]	Artırır
Mevcut hamilelik[58]	Azaltır
Parite [58, 59]	Artırır
Geçirilmiş ovariyan cerrahi [60]	Azaltır
Endometriyozis [61]	Azaltır
Granülosa hücreli tümör [62]	Artırır
BMI (Body Mass Index) – obezite [48, 63]	Azaltır veya Değiştirmez
Halen aktif sigara içiciliği [58, 64]	Azaltır
Geçmişte sigara içmiş olmak [58, 65]	Etkisiz
Kemoterapi [66, 67]	Azaltır
Düşük Vitamin D seviyesi [68]	Azaltır
Alkol [58]	Etkisiz
Fizik egzersizi [58]	Etkisiz

Tablo 12-3 Serum AMH değerlerini etkileyen durumlar araştırılmıştır.

12.3.3. **Antral folikül sayımı (AFC)**



Resim 12-7 Rat overinden hazırlanmış preperattan folikül sayımı.

Resim 12-7 de rat overlerinden hazırlanmış bir preperattaki folikül sayımını X10 büyütme ile görmekteyiz.

AFC, bazal FSH ölçümünde olduğu gibi siklusun spesifik günlerinde (2 ve 5 günler arası dönem) transvajinal USG ile yapılan ölçümlerle iki boyutlu ölçümde 2-10 mm lik antral foliküllerin sayılarak rezerv hakkında bilgi edinme yöntemidir. Bu yöntem klinisyenler arasında değişkenlik göstermemesi, muhtemel overial stimülasyon cevabının öngörülmesini sağlaması gibi avantajları vardır. Bütün bunların yanında ovarian stimülasyon sonrası OHSS öngörüsü hakkında bilgi vermesi de avantajlı olduğu taraflarıdır. Obezite, geçirilmiş cerrahiler, muayeneye izin vermeme, gün spesifik ölçüm yapılması, türe özgü bir test olması gibi dezavantajları vardır [39, 45, 47]. Yardımcı üreme yöntemleri uygulayan klinisyenlerce (IVF-ınvitro fertilization gibi) sıkça kullanılmakta olsa da deneysel olarak planlanması zordur. Ancak hayvan deneylerinde over rezerv ölçümü için overlerde histolojik çalışma yapılarak folikül sayılması düşünülebilir.

12.3.4. **Estradiol (E2) ölçümü**

Tıpkı FSH ve AFC de olduğu gibi yine belirli bir süre içinde siklusun 2-3-5 günlerinde elde edilen ölçümlerdir. Tek başına DOR'u belirlemede pek bir değeri olmasa da bazal FSH ölçümü ve AFC'yle birlikte anlam taşımaktadır. Özellikle bazal FSH' ın normal, E2' nin erken foliküler fazda 60-80 ng/mL'nin üzerinde ölçüğünde folikül rezervinin belirlenmesinde ve ovarian stimülasyona cevabın değerlendirilmesinde zayıf kanıt niteliği taşıdığı bilinmelidir [69].

12.3.5. **Inhıbin B (I-b) ölçümü**

I ölçümü, ovaryan rezervin ölçümünden ziyade IVF tedavisi sırasında gelişmekte olan folikül miktarını belirlemede kullanılmaktadır. Çünkü I-b, gelişmekte olan folikül hücrelerinden sentezlenmektedir. Miktarı kişiden kişiye değişmekle birlikte, aynı kişinin farklı menstrüasyonunda dahi farklılıklar göstermektedir. Genel kabul gören değerlendirmede ovariyan stimülasyon esnasında I-b ölçümü yapıldığında 40-45 pg/mL altındaki ölçümlerde düşük foliküler cevabı gösterdiği düşünülür. Sonuç olarak ovarian rezerv belirlemede I-b ölçümü rutin olarak önerilmemektedir [38, 70].

12.3.6. **Klomifen Sitrat Challenge Testi (CCCT)**

CCCT IVF tedavi protokollerinde uygulanan bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Şöyle ki, siklusun 3. günü ölçülen bazal FSH değerinden sonra 5. günde 100 mg başlanan CC (klomifen sitrat) ile hasta takip edilir. Onuncu günde FSH miktarı tekrar ölçülür. 10-22 IU/L arasında olması beklenen değer daha yukarı bir düzeyde olursa düşük ovaryan yanıtı göstermektedir. 22 IU/L üzerindeki FSH değeri, DOR için yüksek risk anlamına gelmektedir. Kişiden kişiye farklılık gösterebilecek sonuçlarla standartizasyon zorluğu olduğu bilinmelidir. IVF uygulamalarında kişiye özel tedavi belirlenmesinde parametre takibi önerilmektedir [71].

12.3.7. **Over hacmi ölçümü**

Overde hacim ölçümü yapılmaktadır. Ancak bilinmelidir ki kistler, endometrioma, PKOS gibi birçok ovarian patolojiler yanıltıcı olarak overi hacimsel olarak büyük göstererek DOR'dan uzaklaştırabilir. Üç boyutlu USG ile yapılan ölçümlerde elde edilen en boy ve derinlik parametreleriyle hacim hesaplanır;

Over Volümü (cm^3) = D1 X D2 X D3 X 0,52

Kabul gören görüş şudur; over hacminin <3 mL olması veya ortalama ölçümün <2cm olması durumunda DOR'in belirlenmesinde yüksek spesivite ve geniş aralıkta bir sensitivite değerine sahip bir yöntemdir. Sonuç olarak şu söylenebilir ki AFC overyan rezervi belirlemede ovaryan volüm sayımından daha belirleyici bir parametre olarak kullanılabilir [38, 44, 70, 72].

12.3.8. **Kombine ovaryan rezerv testi**

Hiçbir test tek başına %100 duyarlı ve özgül olmadığından over rezervini belirlemede laboratuvar ve USG (ultrasound) birlikte değerlendirilme yapılmalıdır. Bu sayede laboratuvar ve radyolojik verilerin kombine edilip skala haline getirilmesiyle testlerin tek başlarına taşıdıkları eksik tarafları tamamlayarak over rezervi hakkında klinisyenin net kanaatinin oluşması sağlanabilir [73].

Sonuç olarak azalmış over rezervini tespit etmek için genel kabul gören kriterler şöyle özetlenebilir;

i. AMH < 1,3 ng/dL altında olması [74];

ii. FSH > 10 IU/L üzerinde olması [75];

iii. Ultrasonografik ölçümle iki overdeki AFC toplamı ≤ 7 adetin altında olması [74];

iv. Otuz sekiz yaş ve üzerinde olmak [76].

12.4. Fertilite koruyucu yaklaşımlar

Özellikle kanser tedavilerinde gösterilen üstün başarı ve kürler sayesinde iyileşen kadınların kendi sosyal yaşamlarını düzenleme hak ve istekleri giderek daha da önem kazanmaktadır. Çocukluk çağında geçirmiş oldukları kanser veya kanser dışı nedenlerle görülebilecek tedavi veya maruz kalınan hastalıklar kadınları ileride çocuk sahibi olamama endişesiyle karşı karşıya bırakmaktadır. Bu konu öncelikle çocuklar için reşit olmayan bireylerin aileleri tarafından gündeme getirilmekteyse de tedavi protoklünü takip eden klinisyenin tedavi/hastalık süreçlerini konuşurken vurgulaması gereken bir konu olduğu unutulmamalıdır. Ancak bu sayede tedavi sürecinde olan ve sağlık durumunun üzerine yüklediği sorunları anlamaya çalışan ve çözüm arayan bireye doğru ve tam bir sağlık hizmeti verilmiş olacaktır [12].

Ülkemizde fertilite koruyucu tedavileri düzenlenyen hukuki altyapı 30/09/2014 tarih ve 29135 sayılı Resmî gazetedeki ÜYTE (Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri) yönetmelik ile tarif edilmiştir (Tablo 12-4).

Sözkonusu yönetmelik kapsamında yumurtalık, oosit, sperm, testis dokusu veya embriyo saklanabilecek hasta grupları tarif edilmiştir (Tablo 12-4).

Ülkeden ülkeye yerel hukuk kuralları ile uygulamada sınırlamalar olsa da, kadın fertilitesini korumak için kullanılan yöntemler tarif edilmiştir. Çocukluk çağı maligniteleri başta olmak üzere sosyal endikasyonlar da dahil bir çok nedenlerle kadın fertilitesinin korunmasına dair tedavi yöntemleri uygulanmaktadır [6].

Türkiye`de üreme hücreleri ve gonad dokularının saklanmasını gerektiren tıbbî zorunluluk halleri;
1. Erkeklerde; **i. Cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi durumunda** **ii. Kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar veren tedaviler öncesinde** **iii. Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlar (testislerin alınması ve benzeri) öncesinde** **iv. Çok az sayıda sperm olması (kriptozoospermi) durumunda**
2. Kadınlarda; **i. Kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar veren tedaviler öncesinde** **ii. Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlar (yumurtalıkların alınması gibi operasyonlar) öncesinde** **iii. Düşük over rezervi olup henüz doğurmamış veya aile öyküsünde erken menopoz hikayesinin üç uzman tabipten oluşan sağlık kurulu raporu ile belgelendirilmesi durumunda**

Tablo 12-4 Türkiye`de üreme hücreleri ve gonad dokularının saklanmasını gerektiren tıbbî zorunluluk halleri [41].

Tablo 12-4, Otuz Eylül 2014 Tarih ve 29135 sayılı Resmî Gazete ’de yayınlanarak yürürlüğe giren ÜYTE Yönetmeliği 20. maddesine göre hazırlanmıştır.

Tablo 12-5’ de Türkiye’deki yönetmelikler kapsamında yumurtalık dokusu, oositi, spermi, testis dokusu veya embriyosu saklanabilecek hastalıklar tartışılmıştır.

Tablo 12-6’ da ise kadın over rezervini korumak için günümüzde kullanılan yöntemler tartışılmıştır.

Ayrıca tablo 12-7 ‘de fertilite koruyucu yaklaşımların özeti yer almaktadır.

Yumurtalık dokusu, Oosit, Sperm, Testis Dokusu veya Embriyo Saklanabilecek Hasta Grupları
1. Kanser hastalarında kemoterapi ilaçları ve hedefli tedaviler öncesinde (Lenfoma, Lösemi vb.);
2. Radyoterapi öncesinde;
3. Tedavi amaçlı kemik iliği transplantasyonu için myeloablasyon amaçlı yüksek doz kemoterapi ve/veya radyasyon uygulanması gereken hastalıklarında (Talasemi Major, Fankoni Anemisi, Orak Hücreli Anemi, Aplastik Anemi, Hemakromatozis, Myeloproliferatif Hastalık);
4. Otoimmun ve sistemik hastalıklar ve immunosupresyon amaçlı sitotoksik ajan kullanımı gerektiren durumlarda (SLE, Kronik Böbrek Hastalığı vb.);
5. Cerrahi gerektiren hastalıklar ya da geçirilmiş overyan ya da testiküler cerrahi durumunda (Benign/Borderline OverTümörleri ya da Testis Tümörü, Endometrioma (özellikle bilateral), BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyon taşıyıcıları, Testis Torsiyonu geçiren hastalarda).

Tablo 12-5 Türkiye'deki yönetmelikler kapsamında yumurtalık dokusu, oositi, spermi, testis dokusu veya embriyosu saklanabilecek hastalıklar [41]

Kadın Ovaryan Rezervini Korumak İçin Günümüzde Uygulanan Teknikler	
i.	Ovaryan Stimülasyon sonrası oosit veya embriyo kriyoprezervasyonu
ii.	Ovaryan doku cryoprezervasyonu (OTC)
iii.	In vitro oosit olgunlaştırılması
iv.	Over transpozisyonu
v.	Oosit bankası (ülkemizde yasal zemini yoktur).

Tablo 12-6 Kadın ovaryan rezervini korumak için günümüzde kullanılan yöntemler [43].

12.4.1. **Ovaryan Stimülasyon Sonrası Oosit veya Embriyo Kriyoprezervasyonu**

Oosit kryoprezervasyonu yapabilmek için öncesinde kontrollü oosit stimülasyonu (KOS) yapmış olmak gerekmektedir. Bu prosedür prezervasyon öncesi 10-15 günlük bir hazırlık sürecini gerektirmektedir. Gonadotropinlerle desteklenen foliküller takip edilir. 18-22 mm büyüklüğe ulaştıklarında hCG veya GnRH agonisti ile son matürasyon işlemi uygulatılır. Hemen ardından serbestleşmeye ve fertilizasyona hazır hale gelmiş matür oositler ekspektan yöntemle toplanır. Oocyte Pick Up (OPU) denilen bu işlem transvajinal yapılabileceği gibi hasta tarafından arzu edilmesi veya endikasyon dahilinde laparaskopik olarak da gerçekleştirilebilir. Bu yöntem çoğunlukla IVF tedavilerinde embriyo transfer prosedürü öncesi hazırlık amacıyla uygulanmaktadır. Fresh transfer için veya cryopreservasyon yapıp ileri bir tarihte uygulama için matür oositler toplanır [43].

Fertilitesini koruma talebi olan adet görmemiş bir kız çocuğu için tercih edilebilecek bir yöntem değildir. Çünkü bu yöntemin başarıya ulaşabilmesi için ovaryumların maturasyonu şartı yani kız çocuğunun adrenarşı tamamlamış olmak geremektedir. Ayrıca bu yöntemin dezavantajlarından bir diğeri de prosedürün tek denemesi için en az 10-15 günlük süre gerekmesidir. Toplanabilecek matür oosit sayısı sınırlı olacak ve çok miktarda folikül stimülasyonu yapmak OHSS (Ovarian Hyper Stimulation Syndrome) riskini artıracaktır.

KOS için gonadotropin veya GnRH analogları kullanımı arasında canlı doğum oranları açısından fark olmadığı gösterilmiştir [77]. Buna karşılık OHSS gelişim riski açısından sentetik östrojen analoglarını veya letrazol gibi aromataz inhibitörlerini kullanmanın daha kontrollü bir over matürasyonu sağlayacağı düşünülmüştür [78]. Hatta meme kanseri hastalarında kullanılan tamoksifenin östrojen antagonisti olduğu için gonadotropin seviyesini artıracağından meme kanseri tedavi sırasında KOS için yan fayda sağlayabileceği değerlendirilmişti. Ancak tamoksifenin oosit matürasyonu için yeterli miktarda gonadotropin sekresyonu yapmadığı sonucuna varıldı [79].

Sonuç olarak KOS ve sonrasında kryoprezervasyon için canlı kaynaklardan veya yüksek rekombinant tekniklerle elde edilmiş gonadotropin hormon preperatları, veya östrojen analoğu olan klomifen sitrat, aromataz inhibitörü olan letrazol gibi tedavilerle overlerde foliküller hazırlanıp OPU işlemi yapılmalıdır. OPU sonrası ileri bir transfer tarihine kadar, olgun oosit veya embriyo saklanacaktır.

Gerek oositin gerekse de embriyonun dondurularak saklanması işleminde iki yöntem tanımlanmıştır. Bunlardan ilki yavaş dondurma (slow freezing) yöntemi diğeri de vitrifikasyon yöntemidir. Son çalışmalar da göstermiştir ki vitrifikasyon yöntemi ile yavaş dondurma yöntemi kıyaslandığında, kryoprezervasyon için vitrifikasyon yönteminin daha başarılı sonuçlar vermektedir [80]. Hatta vitrifikasyon yönteminin fresh transferle yapılan karşılaştırmalar da göstermiştir ki fresh transfer ile vitrifikasyon yöntemi arasında canlı doğum, gebelik başarısı, sağlıklı kromozom yapısı ve benzeri kriterler değerlendirildiğinde yöntemler arası başarı açısından fark gözlenmemiştir [81]. Sonuç oosit veya embriyo vitrifikasyon yönteminin iyi bir fertilite koruyucu yaklaşım olduğudur.

12.4.2. **Ovaryan Doku Kryoprezervasyonu (OTC)**

Laparaskopik teknikle ovaryum harabiyeti öncesi elde edilen ovaryan dokuların yine uygun tekniklerle dondurularak saklanması ve ileri uygun bir tarihte ototransplantasyonu tekniğini temel alır [82].

İlk olarak 2004 yılında Donnez ve arkadaşları [7] tarafından gerçekleştirildiğinden günümüze kadar yaklaşık 360 embriyo transferi yapılmış ve bu yöntemle şimdiye kadar 90 dan fazla canlı doğum dünyaya gelmiştir [83, 84].

Özellikle çok miktarda primordial folikül içeren ergenlik öncesi ovaryan doku, ileri uygun bir transfer tarihine kadar saklanmaktadır. Bu saklama yöntemi konusunda vitrifiye edilmiş ovaryan dokunun yüzey kesitleri tekniği benimsenmiştir [9]. Yarım mm kalınlığında kesit haline getirilmiş ovaryan doku çözüldükten sonnra, ortotopik veya heterotopik transplantasyonu yapılmaktadır [85].

Yöntemin kısıtlamalarının başında, iskemi hasarları gelmektedir [43]. Korunmaya çalışılan rezervin, dokunun eritilmesi (thaw) ile hızlıca kaybedilmesinde oksidatif hasar önemli rol oynamaktadır. Ayrıca transfer edilen dokunun gonadotropinlere maruziyetiyle ortaya çıkan hızlı bir rezerv tüketim aşaması da ikinci bir kısıtlama sunmaktadır. Buna “burn-out” etki denmektedir [6].

Ovaryan dokunun kayıpsız transplantasyonunda elde edilecek fayda sadece fertilite ile sınırlı kalmayacaktır. Overin endokrin özelliği sayesinde osteoporoz ve kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkileri de geri getirilebilir [43]. Bu yüzden over dokusunu saklamak kadar onu kayıpsız olarak yeniden insan vücuduna transfer edebilmek de önemlidir.

12.4.3. **İn Vitro Oosit Olgunlaştırılması**

Bazı durumlarda KOS yapacak zaman olmaksızın, yumurta elde edip olgunlaştırarak oosit matürasyonu sağlanabilmektedir [86]. Bu sayede kontrollü ovaryan stimülasyon yapacak kadar zaman harcamadan yani tedaviye gecikmeksizin yeterli ovaryan doku elde edilip laboratuvar ortamında matürasyon sağlanabilmektedir [41].

Bu yöntemle elde edilen oositler 2 günlük matürasyon sürecine dahil edilirler. Süre sonunda elde edilen olgun oositlerin pek azı embriyo oluşturabilme kabiliyeti kazanacaktır. Kaliteli embriyo elde etmek konusunda oldukça riskli olan bu yöntemle başarılı sonuçlar alınmıştır [86]. Ancak diğer yöntemlerle elde edilmiş olgun oositlerle canlı doğum başarısı kıyaslaması yapabilecek kadar yeterli veri yoktur [43].

12.4.4. **Over Transpozisyonu**

Özellikle pelvis bölgesine uygulanacak radyoterapi nedeniyle düşünülmüş bir tedavi yaklaşımıdır. Overler ışınım alanından uzaklaştırılır, işlem sonrasında yeniden repozisyonu sağlanır. Bu yöntem günümüzde sık kullanılmamaktadır [41].

12.4.5. **Oosit Bankası**

Ülkemizde yasal olmayan bu uygulama ile sonuçları oosit vitrifikasyon sonrası yapılan embriyo transferleri ile pek farklı değildir [87]. Ancak bilinmelidir gelecek nesillere aktarılacak genetik materyal, ebeveynin bizzat kendisinden değil, donor tarafından sağlanan genetik miras olacaktır.

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Embryo Kryo-prezervasyonu	Başarı ve güvenirliği ispatlanmış	Partner gerekliliği Ovaryan stimulasyon için zaman gerekli
Oosit (Matür / İmmatür)	Partner gerekliliği yok	Ovaryan stimulasyon için zaman gerekli Doğan çocukların uzun dönem sonuçları yok
Over dokusu (Kortikal parçalar)	Partner gerekliliği yok Hormonal fonksiyonun da korunması sağlanabilir IVF ihtiyacı olmadan gebelik elde edebilme ihtimali (immatür oosit aspirasyonu ve IVM ile) Prepubertal dönemdeki hastalar için ilk seçenek	Cerrahi gerektirir Bildirilen >70 gebelik var Transplantasyon sonrası iskemiye bağlı greftin fonksiyon görmeme ihtimali Over dokusundaki mikrometastazların tekrar implante edilme riski
Tüm Over	Over dokusu transplantasyonu ile aynı avantajlar Partner gerekliliği yok Ovaryan stimulasyon gerekli değil	Deneysel başarısı düşük
Overlerin Trans-pozisyonu	Radyasyona bağlı overyan yetmezlik riskini azaltır (%50)	Cerrahi gerektirir. Kullanımı sadece radyoterapi alan hastalarla sınırlıdır. Lateral transpozisyonda IVF gerekebilir. Cerrahiye bağlı damar zedelenmesi nedeniyle fonksiyon kaybı olabilir.
Oosit Bankası	Sınırsız kaynak Vitrifikasyonla benzer sonuçlar	Ülkemizde yasal değil

Tablo 12-7 Fertilite koruyucu yaklaşımların özeti [41].

13. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmam; lokal etik kurul tarafından (MÜ-HADYEK- T.C. Maltepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu) 28/02/2019 tarihinde 2019-02-02 protokol kodu ile onaylanmasını takiben T.C. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi labaratuvarlarında yapıldı.

Denekler Wistar albino dişi olarak belirlendi. Denekler 250 – 300 gr arası 12 – 14 haftalık olarak yetiştirildi. Oniki saat gece 12 saat gündüz periyotları ortam ışığı ile düzenlendi ve ortam sıcaklığı 21 – 23 C^o sabit tutuldu. Kafeslerde altışarlı gruplar halinde tutuldular. Deneklerin beslenmesinde pellet yemi ve şehir suyu kullanıldı.

Ratların östrus siklusunda aynı dönemde olmaları sağlandı. Bunun için vajinal smear örnekleri alınarak %70 lik etil alkolle tespiti yapıldı. Daha sonra üzerine %1 lik metilen mavisi damlatıldı ve 5 dakika beklendi. Vajinal sitoloji sonucunda östrus fazında olan denekler işleme alındı.

Cerrahi işlem öncesinde seftriakson 100 mg/kg (Novosef ® 2 gr IV/IM flakon) ile proflaksi uygulandı. Anestezi için Xylosin 8-10 mg/kg, Ketolar 80 – 100 mg/kg kullanılarak IP yolla verildi.

Cerrahi işlem esnasında ve sonrasında denek kaybı gibi komplikasyon yaşanmadı.

Cerreahi prosedür, denekler yüzüstü sabitlenerek her iki overlere sağ ve sol hipokondiriak alandan 1 cm lik oblik kesi ile ulaşılarak gerçekleştirildi. Bu sayede minimal invaziv işlem gerçekleştirilerek komplikasyon olasılığı en aza indirildi.

Denekler, altışarlı beş grup halinde işleme alındı. Sham grubu, cerrahi prosedürün uygulandığı ve ilaç verilmeyen kontrol grubu, sildenafil ® uygulanan grup, C vitamini (“MONOVIT-C ® 500 mg 20 Film Tablet Koçak Farma ©”) uygulanan grup ve c vitaminiyle birlikte sildenafil ® uygulanan grup olarak proje planlandı.

Cerrahi işlem sonrası denekler dinlenmeye alındı ve 1 gün sonra medikasyon planlanarak gruplarına göre ilaç uygulamalarına başlandı.

Üç hafta ilaç verilen denekler overlerini incelenmek ve serum numuneleri elde etmek üzere cerrahi prosedürleri tekrarlandı. Deney sonunda numuneler elde edildikten sonra tüm denekler sakrifiye edildi.

Deneye, deneklerin uygun yetişkinliğe ulaşması ve uygun ağırlığa gelmesi ile 12 haftalık olduklarında başladı. En son grup 17 haftalık olduğunda işleme alındı. Deneklerin en yaşlısı 20 haftalık olduğunda deney sona erdi.

Grup 1 (Sham Grubu – n = 6): Her iki over vizüalize edildi. Ototransplantasyon işlemi yapılmadı. Üç hafta sonra bilateral ooferektomi yapıldı. Serum numuneleri alındı. Denekler sakrifiye edildi.

Grup 2 (Kontrol Grubu – n = 6): Cerrahi prosedür uygulanmış olup işlem sonrası medikasyon yapılmamıştır. Yalnızca su, gavaj yöntemi ile uygulanmış ve stres değişkeni sabit tutulmuştur. Üç hafta sonra hipokondriak alandan bilateral ooferektomi yapıldı. Serum numuneleri alındı. Denekler sakrifiye edildi.

Grup 3 (Sildenafil Grubu n = 6): Cerrahi prosedür uygulandı. İşlem sonrası birinci günden itibaren sildenafil® (“VIAGRA ® 25 mg 4 film tablet (Pfizer ©)”) 15 mg/kg/gün gavaj yöntemi ile uygulandı. Üç hafta sonra hipokondriak alandan bilateral ooferektomi yapıldı. Serum numuneleri alındı. Denekler sakrifiye edildi.

Grup 4 (C vitamini Grubu – n = 6): Cerrahi prosedür uygulandı. İşlem sonrası C vitamini 500 mg/kg/gün gavaj yöntemi ile verildi. Üç hafta sonra hipokondriak alandan bilateral ooferektomi yapıldı. Serum numuneleri alındı. Denekler sakrifiye edildi.

Grup 5 (C vitamini ve Sildenafil® Grubu – n = 6): Cerrahi prosedür uygulandı. İşlem sonrası birinci günden itibaren hem C vitamini 500 mg/kg/gün hem de sildenafil ®15 mg/kg/gün birlikte gavaj yöntemi ile uygulandı. Medikasyon üç hafta sürdürüldü. Üç hafta sonra hipokondriak alandan bilateral ooferektomi yapıldı. Serum numuneleri alındı. Denekler sakrifiye edildi.

Deneyde her iki over dokusu kullanıldı. Ooferektomi sonrası makroskobik olarak yağ ve granülasyon dokusundan ayrılan ovaryumlar ayrı ayrı tartıldı. Ağırlıkları kaydedildi.

Deneklerin cilt stürleri için keskin iğneli 3/0 rapid vicryle sütür materyali kullanıldı. Cerrihi sterilizasyon için cerrahi alandan tüyler alındıktan sonra %10'luk baticon solüsyonu ile temizlendi. İşlem sonrasında da baticon uygulaması yapıldı.

Deneklerin postop bakımlarında ağrı kesici olarak meperidin 10 – 20 mg/kg (Aldolan® amp.) intraperitoneal ve ketoprofen 5 mg/kg intraperitoneal (Arveles® amp) kullanıldı. Ayrıca operasyon sonrası birinci gününde seftriakson 100 mg/kg intraperitoneal ikinci dozu tekrarlandı.

Alınan over dokusu makroskobik temizliği yapıldıktan sonra hassas terazi ile ağırlıkları kaydedildi. Yüzde 10' luk formaldehitle fikse edilerek parafin bloklara gömüldü. Her bir taraf over için 4 μm kalınlığında 4 – 5 adet kesitler alındı. Kesitler hematoksilen eosin ile boyandı. Bu kesitlerden hızlı bakı ile en zengin folikül ihtiva eden preparat temsilci preparat olarak kabul edildi. Preparatlar T.C. Maltepe Üniversitesi Patoloji Bilim Dalı'nda, Prof. Dr. Şükrü Yıldırım eşliğinde incelenerek folikül sayımları gerçekleştirildi ve kayıt altına alındı.

Primordiyal folikül, primer folikül, antral folikül, graft foliküller sayıldı. Oositi tek sıra halinde yassı hücreler çevreliyorsa "primordiyal folikül", oositi birkaç sıra halinde kübik hücreler çevreliyorsa primer folikül, çoğalan ve büyüyen foliküllerde vakuollenme görülüyorsa antral folikül, antrumu genişlemiş ve çok büyük hale gelmiş folikül ise graft folikül olarak sayıldı. Tüm foliküllerin toplamına folikül rezervi denildi. Korpus luteum ve korpus albikans sayıldı. Toplam korpus sayısı belirlendi [29].

Sham grubu hariç tüm gruplarda yaygın fibrozis gözlendiği için fibrozis varlığını belirleyen veri skalası ile ölçekleme yapılmadı.

Deneklerden intrakardiyak 4 – 5 cc kan numunesi alındı. Derhal santrfüj edildi ve serumu ayrıldı. Alınan serum numuneleri -20 C^o derecede saklandı ve serum BT LAB firmasının "MIS/AMH BT-LAB Kit (Cat.No: E0456Ra)" ile AMH analizi, yine aynı firmanın "FSH BT-LAB Kit (Cat.No: E0182Ra)" ile FSH analizi, yine aynı firmanın "Rat Super Oxidase Dismutase ELISA Kit (Cat.No: E0168Ra)" ile SOD analizi ve Elabscience firmasının "Rat/Porcine E2(estradiol) ELISA Kit (Cat.No: E-EL-0152)" ile de estradiol (E2) bakıldı. Değerler kaydedildi.

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde “ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri” kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı “kolmogorov simirnov” test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde “Kruskal-wallis, mann-whitney u test” kullanıldı. Korelasyon analizinde “spearman korelasyon analizi” kullanıldı. Çalışmamızda, “IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı” kullanılmıştır.

13.1. Deneklerde Vajinal Smear Değerlendirilmesi

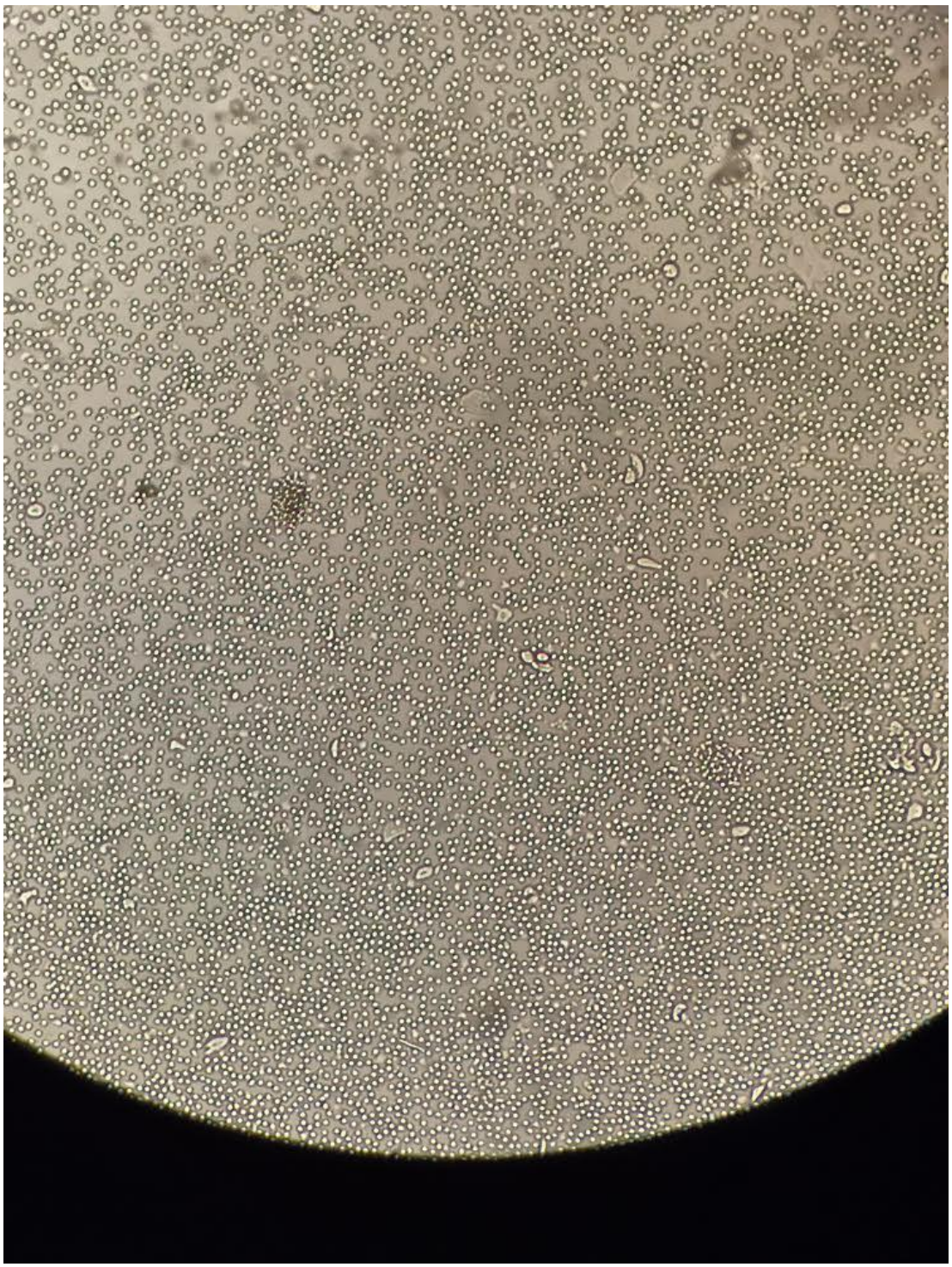
Ratların deney için planlanan büyüklük ve olgunluğa erişmelerinin ardından planlanan cerrahinin günü için vajinal smear incelemesi yapıldı. Planlanan cerrahi gruba sabah 09:00 da yapılan smear örneklemesinde ışık mikroskobisinde X10 objektifle bakılarak morfolojik aşama kaydedildi.

Diöstrus safhasında düzgün homojen dağılımlı küçük yuvarlak hücreler görünmekte. Keratinize olmuş, kornifiye hücrelere rastlanılmamaktadır (Resim 13-1).

Diöstrus safhasından proöstrus safhasına geçişi gösteren pereparat görüntüsü (Resim 13-2) Çoğunlukla düzgün yuvarlak hücreler görülmekle birlikte yer yer kornifiye hücreler de izlenmektedir. Hücresel yapı seyrelmiştir.

Metöstrus safhasındaki ratların vajinal smear görünümü (Resim 13-3). Kornifiye hücreler izlenmekle birlikte küçük yuvarlak hücreler de görünmeye başlanmıştır. Bu safha cerrahi işlem için geç olarak kabul edilmiştir.

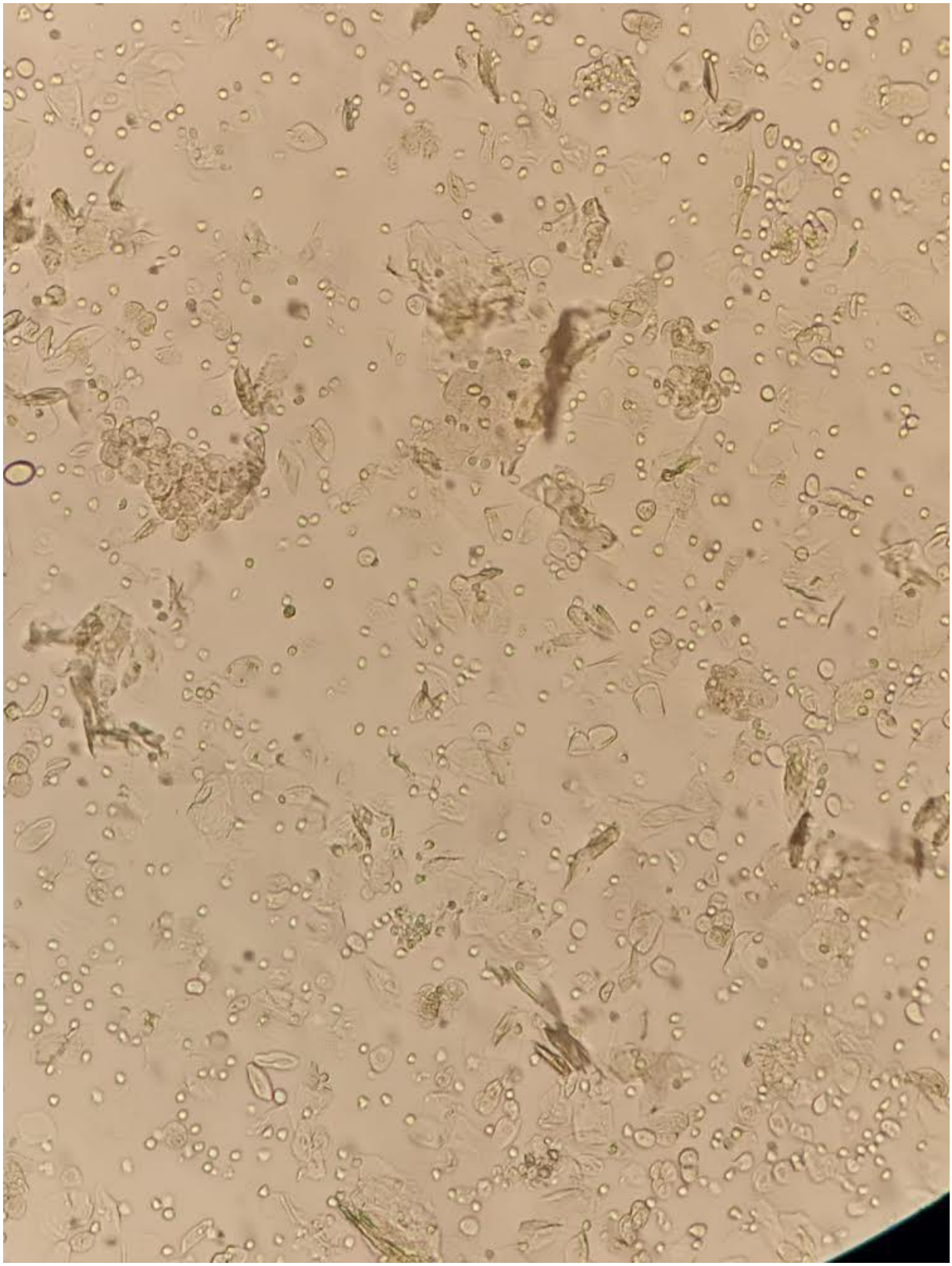
Östrus safhasındaki ratların vajinal smear örneklemesi (Resim 13-4). Tüm alanda kornifiye genişlemiş süngerimsi hücreler izlenmekte olup küçük hücre oranı yok denecek kadar az görülmektedir. Bu safhada cerrahi işlem uygulanmış olup, tüm ratların over folikül aşamaları aynı kabul edilmiştir.



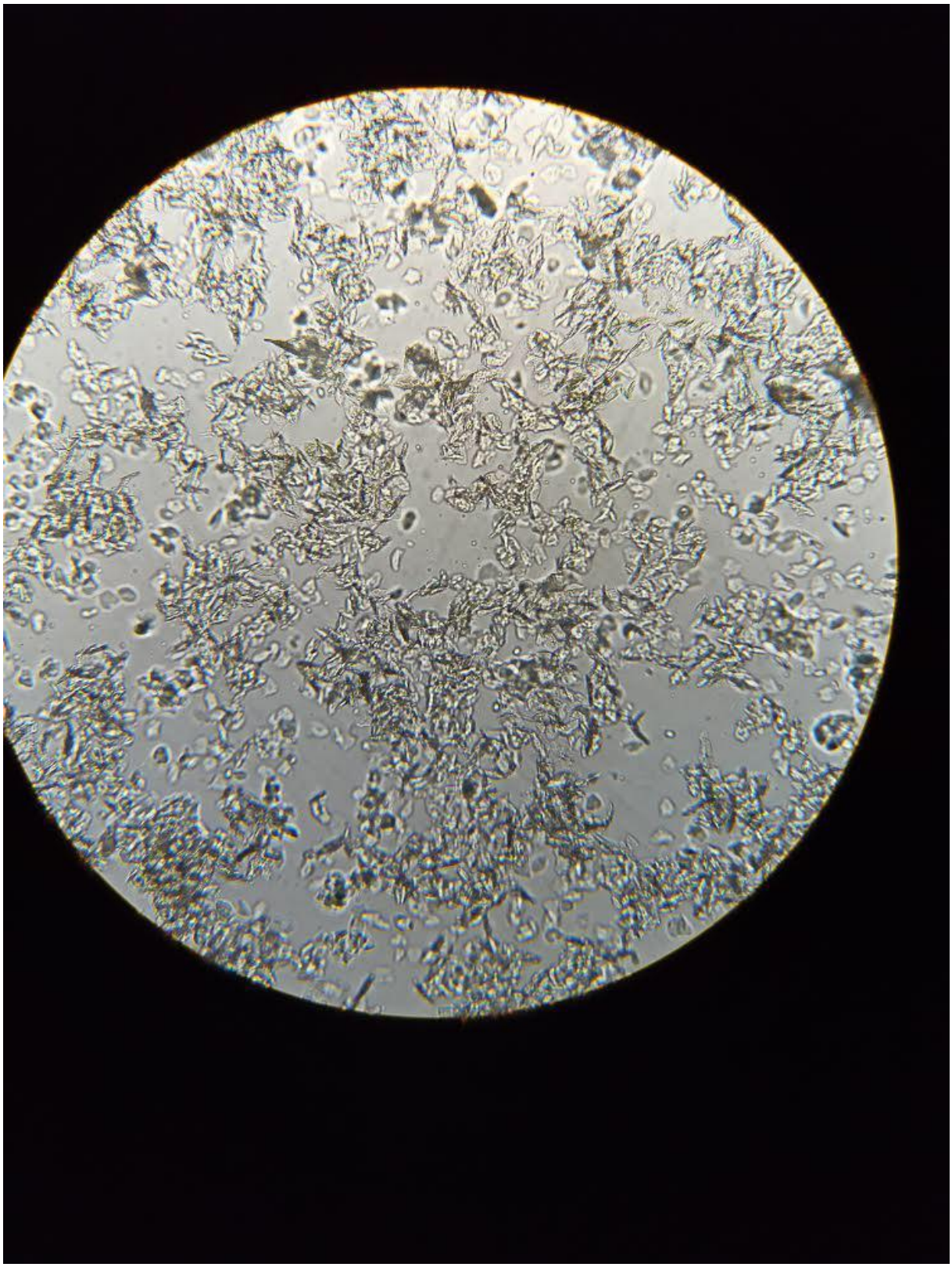
Resim 13-1 Diöstrus safhasındaki vajinal smear görünümü.



Resim 13-2 Diöstrustan proöstrus safhasına geçiş.



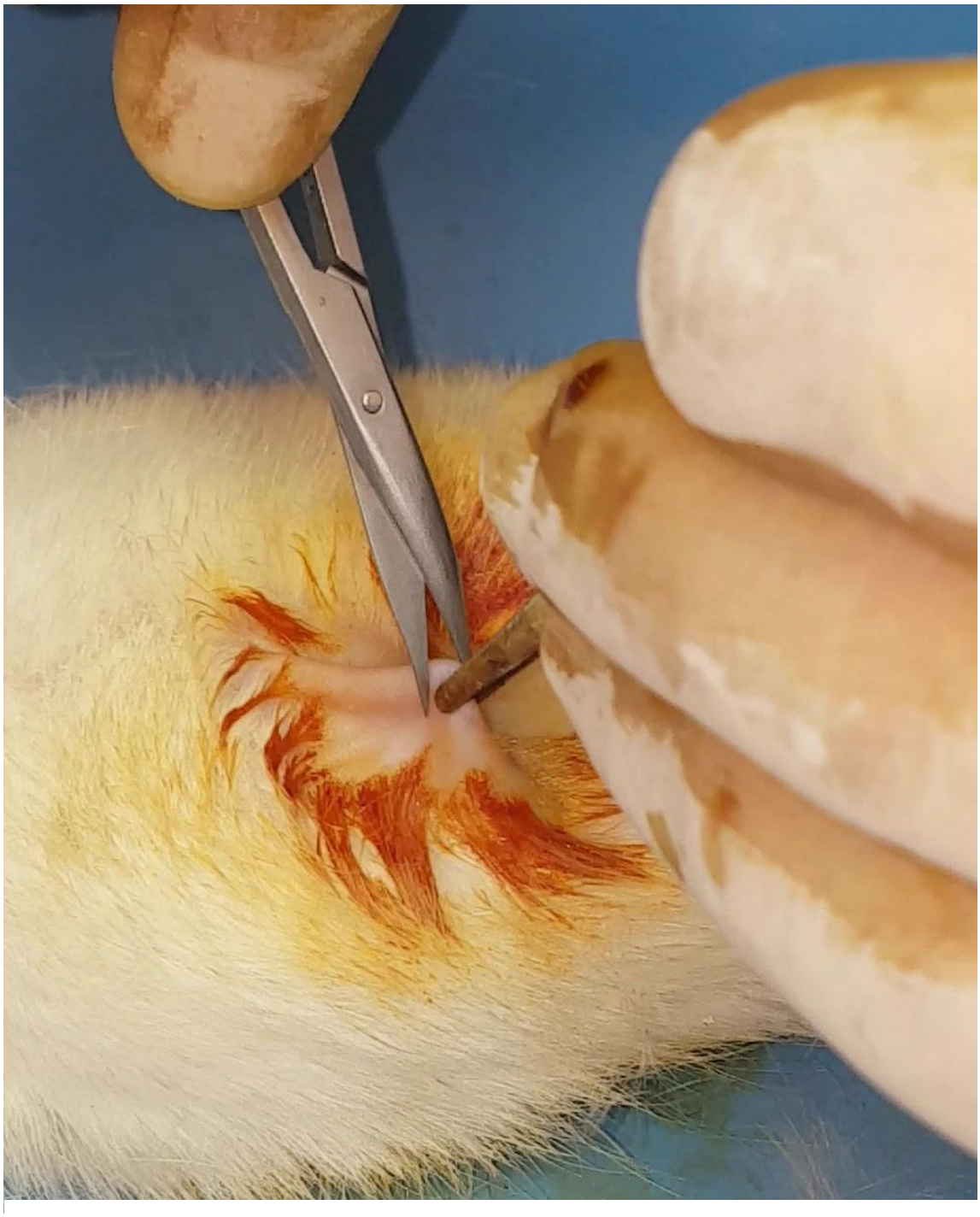
Resim 13-3 Metöstrus safhasındaki vajinal smear görünümü.



Resim 13-4 Östrus safhasındaki vajinal smear örneklemesi.

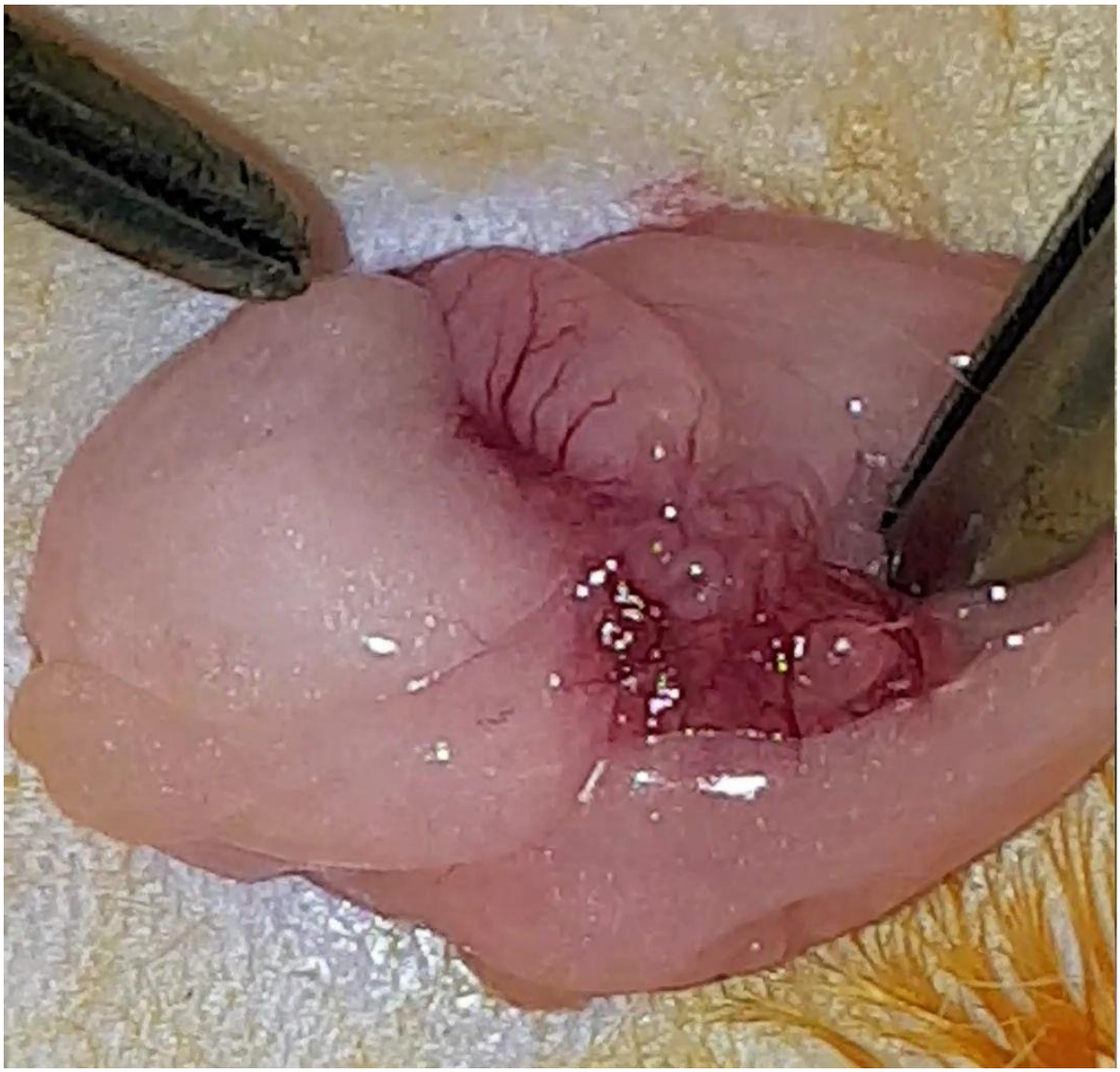
13.2. Cerrahi Prosedürün Uygulanması

Olgunluk ve büyüklük açısından uygun zamana gelmiş gruplar işleme alındı. Bunun için vajinal smear yapıldı, östrus safhasındaki ratlara proflaktik antibiyotik uygulandı. Xylosin 8-10 mg/kg, Ketolar 80 – 100 mg/kg kullanılarak IP yolla verildi, denekler genel anestezi altında cerrahi alan temizliği uygulandıktan sonra işleme alındı.



Resim 13-5 Hipokondriak bölgeden yapılan insizyon.

Sol ve sağ hipokondriak alan tüylerinden arındırıldı. %10’ luk baticon solüsyonu ile temizlendi. 1 cm lik oblik kesi ile cilt ve karın duvarı kasları, peritonu geçildi. Subrenal yağ dokusu içinde gömülü over dokusu vizüalize edildi. Fimbrialar, salpenks ve uterus gözlendi (Resim 13-5 ve Resim 13-6).



Resim 13-6 Subrenal yağ dokusu içine gömülü over fibriya tuba ve uterus gözlenmektedir.

Deney gruplarından Sham grubunda başkaca bir işlem uygulanmadı. Doğrudan karın duvarı kapatılma işlemine geçildi. Diğer tüm gruplarda over dokusu subrenal yağ dokusundan ayrıldı. Ooferektomi tamamlandı. Hemorajik bir komplikasyon gözlenmedi. Ovaryal doku beher içinde beklettiğimiz izotonik solüsyonda yıkandı. Karın duvarı ve periton birlikte 4/0 ipek yuvarlak iğneli stür materyali ile kapatıldı. Sham grubu hariç diğer tüm gruplarda ayrılan over cilt ile karın duvarı arasına yerleştirildi, aynı stür materyali kullanılarak sabitlendi. Daha sonra cilt 3/0 rapid vicryl keskin iğneli stür materyali ile subkutiküler kapatıldı.

Cilt yeniden %10 luk baticon solüsyonu ile temizlendikten sonra denekler postop bakıma alındılar. Postop ağrıkesici olarak meperidin 10 – 20 mg/kg (Aldolan® amp.) intraperitoneal ve ketoprofen 5 mg/kg intraperitoneal (Arveles® amp) kullanıldı. Tüm deneklere ilk cerrahi işlemden 24 saat sonra seftriakson 100 mg/kg intraperitoneal tekrarlandı.

Denekler 1 gün beklenildikten sonra gruplarına göre medikasyon işlemine başlandı.

Medikasyonları sonrası 3. haftada ikinci cerrahi uygulaması yapıldı. Bu aşamada cerrahi proflaksi uygulanmadı. Cerrahi alan temizliğinden sonra her iki taraf hipokondriak bölgede cerrahi alana ait granülasyon dokusu izlendi. Sadece Sham grubunda periton yeniden açıldı,



Resim 13-7 Overin trasplante edildiği ciltaltı dokudaki görünümü.

subrenal yağ dokusu içinde overler yeniden vizüalize edilerek ooferektomi yapıldı. Diğer gruplarda bölge üzerinde yüzeyel bir 3 cm lik cilt stüründen sonra ototransplante edilen ovaryal doku granülasyon dokusuyla birlikte vizüalize edildi. Her iki taraftan eksizyonunu yaptıktan sonra deneklerden intrakardiyak 4 – 6 cc kan alındı. Bu aşamadan sonra servikal dislokasyon uygulanarak tüm denekler sakrifiye edildi.

Resim 13-7'de gösterilen doku cilataltına transfer edilen over dokusunun 3 hafta sonraki explorasyonudur. Over ototransplantasyonundan sonra 3 hafta medikasyon uygulandı. Üç hafta sonra ikinci cerrahi prosedür uygulandı. Over trasplante edildiği ciltaltı dokudan eksplore edildikten sonra eksize edildi.

Ototransplantasyon ve ooferektomilerle alınan over dokuları ayrı ayrı etiketlenerek %10 luk formalin solüsyon ile patoloji inceleme laboratuvarına ulaştırıldı.

Alınan kan numuneleri 20 dakika süreyle 2000 devir/dk ile santirfüj edilerek serum numuneleri ayrıldı. Elde edilen serum numuneleri 1 cc lik petrilere ayrıldı etiketlendi. Eksi 20 C^o de muhafaza altına alındı. Laboratuvar incelemesi için 6 ay beklenildi.

13.3. Cerrahi Prosedür Sonrası Uygulanan Medikasyon

Cerrahi prosedür sonrası denekler 1 gün postop bakıma alınmışlardır. Bu bakım esnasında ilk olarak cerrahi proflaksi tekrarlanmıştır. Bunun için Novosef ® 2 gr IV/IM flakon 100 mg/kg uygulanmıştır. Novosef ® 2 gr IV/IM flakon 100 ml serum fizyolojik ile sulandırılmıştır. Her bir deneğe 1,5 cc intraperitoneal yolla verilmiştir. (Denek başına 30 mg)

Deneklerin postop bakımlarında ağrı kesici olarak meperidin 10 – 20 mg/kg (Aldolan® amp.) intraperitoneal ve ketoprofen 5 mg/kg intraperitoneal (Arveles® amp) uygulandı.

Denekler 1 gün postop bakımdan sonra gruplarına göre medikasyona tabi tutulmuşlardır.

Grup 1, Sham grubu olarak adlandırılmıştır. Cerrahi prosedürde sadece overler yerinde izlenmiş ve overlerin subkutan ototransplantasyonu uygulanmamıştır. Cerrahi sonrasındaki medikasyonda postop bakım dışında herhangi bir ilaç maruziyetine bırakılmamışlardır. Deneklere stres standartizasyonu için günde 2 kez 5 cc gavaj uygulaması yapılmıştır. Yirmi bir gün sonra ikinci cerrahi prosedür ile bilateral ooferektomi yapılmıştır. Patoloji incelemesi için ayrı ayrı etiketlenerek laboratuvara ulaşması sağlanmıştır.

Grup 2, kontrol grubu olarak adlandırılmıştır. Bu grupta da cerrahi prosedür sonraki üç grupta olduğu gibi uygulanmış, subkutan over ototransplantasyonu yapılmış, sonrasında da medikasyon yerine Sham grubunda olduğu gibi serum fizyolojik ile gavaj uygulanmıştır. Yirmi bir gün sonra ikinci cerrahi prosedür ile subkutan yerleştirilen over dokusu alınmıştır. Patoloji incelemesi için ayrı ayrı etiketlenerek laboratuvara ulaşması sağlanmıştır.

Grup 3, medikasyon olarak 15 mg/kg/gün Sildenafil ® verilen gruptur. Bunun için piyasadan temin edilen "VIAGRA ® 25 mg 4 film tablet (Pfizer ©)" preperatı kullanılmıştır. Her bir tablet 50 cc distile suda çözünmüştür. Günlük 15 mg/kg olarak denek başına yaklaşık günlük 5 mg oral kullanımı belirlenmiştir (15 mg X 330 gr / 1000 gr). Beş cc 12 saat aralıklarla (2 X 1 kez) gavaj yöntemiyle oral uygulama yapılmıştır. Denekler 21 gün süreyle ilaç maruziyetine bırakılmıştır. Yirmi bir gün sonra ikinci cerrahi prosedür ile subkutan yerleştirilen over dokusu alınmıştır. Patoloji incelemesi için ayrı ayrı etiketlenerek laboratuvara ulaşması sağlanmıştır.

Grup 4, medikasyonunda başkaca laboratuvar çalışmalarında etkinliği ispatlanmış c vitamini uygulaması yapılmıştır [16]. Bunun için önceki çalışmalarda etkinlik dozu olarak 500 mg/kg/gün kullanılmıştır [16, 88, 89]. Piyasadan temin edilen "MONOVIT-C ® 500 mg 20 Film Tablet Koçak Farma ©" preperatları kullanılmıştır. Her iki tablet 50 ml distile suda eritilmiştir. Günlük denek başına 150 mg uygulama hesaplanmıştır (500 mg X 300 gr / 1000 gr). Bu sebeple hazırlanan gavaj serumundan 3,75 cc günde 2 kez oral yolla uygulanmıştır. Denekler 21 gün ilaç maruziyetine bırakılmıştır. Yirmi bir gün sonra ikinci cerrahi prosedür ile subkutan yerleştirilen over dokusu alınmıştır. Patoloji incelemesi için ayrı ayrı etiketlenerek laboratuvara ulaşması sağlanmıştır.

Son grup olan grup 5, hem sildenafil hem de C vitamini uygulanan gruptur. Bu sebeple piyasadan temin edilen "VIAGRA ® 25 mg 4 film tablet (Pfizer ©)" ve "MONOVIT-C ® 500

mg 20 Film Tablet (Koçak Farma ©)" preperatları kullanılmıştır. Her bir sildenafil ® preparat tableti, 50 cc distile suda çözünmüştür. Günlük 15 mg/kg olarak denek başına yaklaşık günlük 5 mg oral kullanımı belirlenmiştir (15 mg X 330 gr / 1000 gr). Beş cc 12 saat aralıklarla 2 X 1 kez gavaj yöntemiyle oral uygulama yapılmıştır. Aynı deneklere c vitamini uygulaması da yapılmıştır. Bunun için piyasadan temin edilen "MONOVIT-C ® 500 mg 20 Film Tablet Koçak Farma ©" preperatları kullanılmıştır. Her üç tablet sabah uygulamasında kullanılan 50 cc hazırlanan distile su içinde eritilmiştir. Günlük denek başına 150 mg uygulama hesaplanmıştır (500 mg X 300 gr / 1000 gr). Bu sebeple hazırlanan gavaj serumundan 5 cc günde 1 kez oral yolla uygulanmıştır. Böylelikle deneklere sabah dozunda 2,5 mg sildenafil ® ve 150 mg C vitamini birlikte verilmiş oldu. Akşam verilen dozda ise sadece 2,5 mg sildenafil ® uygulaması yapılmıştır. Denekler 21 gün ilaç maruziyetine bırakılmıştır. Yirmi bir gün sonra ikinci cerrahi prosedür ile subkutan yerleştirilen over dokusu alınmıştır. Patoloji incelemesi için ayrı ayrı etiketlenerek laboratuvara ulaşması sağlanmıştır.

13.4. Çalışma Yapılan Parametreler

13.4.1. **Deneklerin ağırlığı**

Denekler işleme alınmadan önce tartıldı ve veriler kaydedildi.

Deneklerin ağırlıkları deneklerin çalışmaya uygunluğunu belirlemek ve ağırlıkları ile ovaryal rezerv arasında ilişki varlığının araştırılması için tartılmıştır.

13.4.2. **Ovaryan doku ağırlığı**

Cerrahi eksizyon sonrası elde edilen ooferektomi materyali makroskobik olarak subkutan yağ dokusundan ayrıldı. Daha sonra hassas terazi ile tartıldı. Veriler kaydedildi.

Ovaryumun ağırlığı kesin bir kriter olmasa da ovaryan rezerv konusunda bir ön fikir oluşturabilir. Ağır ovaryum, rezervin çokluğunu göstermese de ovaryan dokunun tamamına yakınının alınmış olduğu konusunda bir ön fikir vermektedir [90]. Bununla birlikte daha fazla granülasyon dokusu ve iskemiyle birlikte nekroz varlığı bize enflamasyonun şiddetini ve bu bağlamda enflamasyona sekonder ovaryan rezerv kaybının çokluğunu bildirebilirdi [91, 92].

13.4.3. **Ovaryal dokunun incelenmesi**

Ooferektomi sonrası elde edilen numuneler derhal %10 luk formolin solüsyonuna konuldu. T.C. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümüne ulaştırıldı. Preparatlar parafin bloklara gömüldü. 4 µm boyutunda kesitler alınarak alkolle tespit edildi. %1 lik hematoksilen eosin boyasıyla boyandıktan sonra her bir overi temsil eden, folikülce en zengin görülen tek preparat temsilci preperat olarak seçildi. Preparatlar etiketlendi.

Tüm preparatlardaki foliküller ışık mikroskobu altında X40 ile yapılan büyütmede sayılarak istatistiksel veri elde edildi.

%10’ luk formol solüsyonu içinde derhal laboratuvara ulaştırıldı. Dokuların makroskopileri alındıktan sonra derhal parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 4 µm boyutunda kesitler alındı. Preperatlar %1’lik hematoksilen eosin boyası ile boyandı. Kesitler 10 X luk büyütme ile değerlendirilip en fazla folikül içeriği olanlar overi temsil eden preparat olarak incelemeye alındı. Daha sonra sayım aşamasına geçildi (Resim 13-8).



Resim 13-8 Ooferektomi ile elde edilen doku numuneleri.

Primordiyal folikül,

Primer folikül,

Antral folikül,

Graft folikül

Toplam folikül sayısı (Primordiyal, primer, antral ve graft folikül toplamı);

Korpus luteum,

Korpus albikans,

Toplam korpus (korpus luteum ve albikansın toplamı)

Sham grubu haricindeki tüm materyallerde yaygın fibrozis gözlendi. Bu sebeple fibrozis için bir kriter belirlenmedi.

Elde edilen sayısal verilerle veri skalası elde edildi.

Bu verileri kıyaslamak için “IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı” kullanıldı. Gruplar arası farklılık analizi için “Kruskal-wallis, mann-whitney u” testi kullanıldı, gruplar arası farklılıkları belirlemek için $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

13.4.4. **Kan numunesi ve serum parametrelerinin incelenmesi**

Elde edilen kan numuneleri derhal santirfüj edildi. Bunun için 2000 devir/dakika 20 dakika cihaz ayarlandı. Elde edilen serumlar 1 cc lik petrilerle 2 ve en çok 3 numune olacak şekilde etiketlenerek -20 C^o de muhafaza altına alındı.

Serum numunelerinden;

AMH (Antimüllerian Hormon),

FSH (Folikül Stimulan Hormon),

E2 (Estradiol),

SOD (Superoksit dismutaz),

Parametreleri çalışıldı.

Elisa kitlerinin gelmesi ve laboratuvar anlaşması için altı ay beklenildi. Altı ay sonra parametreler “Farmasilab ©” firmasında BT LAB firmasının “MIS/AMH BT-LAB Kit (Cat.No: E0456Ra)” ile AMH analizi, yine aynı firmanın “FSH BT-LAB Kit (Cat.No: E0182Ra)” ile FSH analizi, yine aynı firmanın “Rat Super Oxidase Dismutase ELISA Kit (Cat.No:E0168Ra)” ile SOD analizi ve “Elabscience ©” firmasının “Rat/Porcine E2(estradiol) ELISA Kit (Cat.No:E-EL-0152)” ile de estradiol (E2) analizi yapılmıştır. Sonuçlar elde edildikten sonra veri skalası haline dönüştürülmüştür.

Değişkenlerin dağılımı kolmogorov simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde “Kruskal-wallis, mann-whitney u test” kullanıldı. Korelasyon analizinde “spearman korelasyon analizi” kullanıldı. Gruplar arası farklılıkları kıyaslamada “$p<0.005$” anlamlı kabul edilmiştir. Bu analizleri yapmak için “IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı” kullanılmıştır.



Resim 13-9 Laboratuvara iletilen doku örnekleri.

Denekler 21 gün medikasyon planından sonra ikinci operasyona alındı. İkinci operasyonun ardından her bir denekten 4 – 6 cc intrakardiyak kan numunesi alındı. Kanlardan derhal serum elde edildi. Her denekten en az 2 en çok 3 petri içine serum numuneleri ede edilerek etiketlendi ve -20 C^o de dondurudu. Bu sıcaklıkta en fazla 6 ay muhafaza altına alındı. Sonra parametrelerin okutulması için laboratuvara ulaştırıldı (Resim 13-9).

14. BULGULAR

Tüm deneklerde deney başarıyla tamamlandı. Deney esnasında denek kaybı yaşanmadı.

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde “ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri” kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı “kolmogorov simirnov test” ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde “Kruskal-wallis, mann-whitney u test” kullanıldı. Korelasyon analizinde “spearman korelasyon analizi” kullanıldı. Veri grupları arasındaki farklılıkların analizi için “$P<0.05$” anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmamda, “IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı” kullanılmıştır.

Deneklerden elde edilen doku örnekleri T.C. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında incelendi. Yapılan preperatlar ışık mikroskobu altında değerlendirilerek folikül sayıları, korpus sayıları örneklenerek sayıldı.

Folikül sayıları açısından kontrol grubuna daha yakın değerler cerrahi prosedür sonrası sadece 15mg/kg/gün sildenafil uygulanan grupta elde edilmiştir. Sildenafil ® uygulanan grupta sayılan primordial foliküller ortalama 7,17 adet, primer folikül sayısı ortalama 12,83 adet, ortalama antral folikül sayısı 5,50 adet, ortalama graf folikül sayısı 3,17 adet ve ortalama folikül sayılarının toplamı 28,68 adet olarak belirlenmiştir.

Cerrahi prosedür sonrası 15 mg/kg/gün sildenafil ® uygulanan gruptaki folikül sayıları Sham grubuna daha yakındı. Ortalama primordial folikül sayısı 8,67 adet, ortalama primer folikül sayısı 15,67 adet, ortalama antral folikü sayısı 4,67 adet, ortalama graf folikül sayısı ise 3 adet ve toplam ortalama folikül sayıları 32 adet olarak belirlendi.

Son grup olan cerrahi prosedür sonrası 21 gün medikasyon uygulanan, bunun için hem 15mg/kg/gün sildenafil ® hem de 500 mg/kg/gün C vitamini gavaj yoluyla verilen grupta Sham grubuna en yakın folikül sayıları değerleri elde edilmiştir. Bu verilere göre, ortalama primordiyal folikül sayısı 11,50 adet, ortalama primer folikül sayısı 21,67adet, ortalama antral folikül sayısı 6,50 adet, ortalama graf folikül saysı da 4,83 adet olarak sayılmıştır. Bu gruptaki ortalama toplam folikül sayısı Sham grubuna en yakın değer olan 44,50 adet olarak belirlenmiştir.

Tüm grupların ortalamasında folikül sayıları şöyledir;

Primordial folikül sayı ortalaması 9 adet,

Primer folikül sayı ortalaması 15,93 adet,

Antral folikül sayı ortalaması 5,13 adet,

Graf folikül sayı ortalamaları 3,40 adet,

Tüm grupların toplam folikül sayı ortalamarının ortalaması da 33,47 adet olarak sayılmıştır.

Korpus sayıları açısından da durum benzerdir.

Korpus sayıları açısından Sham grubu ortalaması en yüksak sayıları vermektedir. Korpus luteum ortalaması 6,33 adet, atrofik korpus olan korpus albikans ortalaması ise 4,67 adettir. Toplam ortalama korpus sayısı 11 olarak belirlenmiştir.

Korpus sayısı açısından en fakir ortalamaya sahip grup kontrol grubu olup ortalama korpus luteum sayısı 1,33 adet ve ortalama korpus albikansı ise 0,67 adet olarak sayılmıştır. Toplam ortalama korpus miktarı ise grupta 2 adet olarak belirlenmiştir.

Cerrahi prosedür sonrası 21 gün süreyle 15 mg/kg/gün dozunda sildenafil ® verilen grupta ortalama korpus luteum sayısı 3,50 adet, ortalama korpus albikans sayısı ise 2 adet ve ortalama toplam korpus sayısı 5,50 adet olarak sayılmıştır

Cerrahi prosedür uygulandıktan sonraki 21 gün süreyle 500mg/kg/gün C vitamini verilen grup verileri ise sildenafil ® verilen gruba benzerdir. Ortalama korpus luteum sayısı 2,83 adet, ortalama korpus albikans sayısı ise 1,33 adetti. Ortalama toplam korpus sayısı 4,17 adet olarak sayılmıştır.

Cerrahi prosedür sonrası 21 gün süreyle hem 500 mg/kg/gün C vitamini, hem de 15 mg/kg/gün sildenafil ® verilen son grupta veriler Sham grubuna en yakın olarak elde edilmişti. Ortalama 4 adet korpus luteum, ortalama 2,50 adette korpus albikans sayılmıştır. Toplam ortalama korpus sayısı ise 6,50 adet olarak elde edilmiştir.

Tüm grupların ortalamasında korpus luteum sayısı 3,60 adet ortalama korpus albikans sayısı da 2,23 adet ve tüm gruların toplam korpus sayı ortalaması da 5,83 olarak belirlenmiştir.

Laboratuvar verileri elde edilirken serum numuneleri "Farmasilab ©" firmasında çalıştırılmıştır. "BT LAB ©" firmasının "MIS/AMH BT-LAB Kit (Cat.No: E0456Ra)" ile AMH analizi, yine aynı firmanın "FSH BT-LAB Kit (Cat.No: E0182Ra)" ile FSH analizi, yine aynı firmanın "Rat Super Oxidase Dismutase ELISA Kit (Cat.No: E0168Ra)" ile SOD analizi ve "Elabscience ©" firmasının "Rat/Porcine E2(estradiol) ELISA Kit (Cat.No:E-EL-0152)" ile de estradiol (E2) analizi yapılmıştır.

AMH değeri en düşük kontrol grubunda (3 ± 0.08 ng/ml) en yükse ise c vitamini grubundan (4.71 ± 0.06 ng/ml) elde edildi. Gruplar arası farklılıklar anlamlıydı ($p<0.005$). İkinci en düşük değer sildenafil ® grubuydu (3.47 ± 0.05 ng/ml) fark yine anlamlı olarak bulundu ($p<0.05$). AMH değeri Sham grubunda ara bir değer olarak hesaplanmıştı (3.90 ± 0.076 ng/ml). İkinci en yüksek değer sildenafil ® ve C vitamini birlikte verilen grupta tespit edildi (4.38 ± 0.02 ng/ml).

FSH analizinde en düşük veri 5.02 mIU/ml (s/d 0.07) ile sildenafil ® grubunda elde edilmiştir. 5.31 mIU/ml (± 0.06) Sham grubunda, 5.32 mIU/ml sildenafil ® + c vitamini grubunda (± 0.05), 5.78 mIU/ml kontrol (±0.06), en yüksek olarak da 6.05 mIU/ml c vitamini grubunda tespit edildi (± 0.07).

Estradiol için yapılan çalışmada ise gruplar arası fark anlamlıydı ($p<0.05$). En düşük değer kontrol grubunda 1.50 pg/ml (s/d 0.05) tespit edildi. En yüksek değer ise 3.66 pg/ml (± 0,05) olarak sildenafil ® medikasyonu yapılan grupta tespit edilmiştir. İkinci en yüksek değer sildenafil ve c vitaminin birlikte verildiği grupta 3.52 pg/ml (s/d 0.09) olarak bulundu. Orta değer 3.17 pg/ml (s/d 0.05) ile Sham grubuna ait serum örneklerinden bulundu. C vitamini grubunda E2 değeri ortalaması 2.79 pg/ml (± 0.07) tespit edilmiştir.

Superoksid dismutaz enzim analizi sonuçları şöyle bulundu; en düşük veri Sham grubunda (1.37 ng/ml ± 0.05), sırayla sildenafil ® grubu (1.89 ng/ml ± 0.08), kontrol grubunda (2.30 ng/ml ± 0.08), sildenafil + c grubu (2.30 ng/ml ± 0.05) ve son olarak en yüksek değer de c vitamini grubunda (2.76 ng/ml ± 0.09) elde edilmiştir.

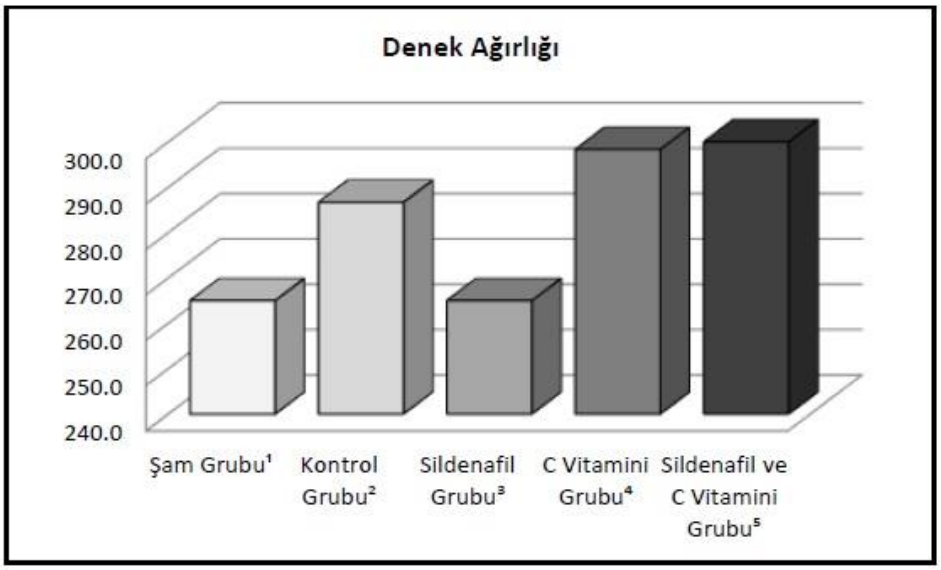
14.1. Denek Ağırlıkları

	Denek Ağırlığı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	250.0 - 280.0	265.0	265.0 ± 10.4[245]	
Kontrol Grubu[2]	280.0 - 300.0	280.0	286.7 ± 10.3[5]	
Sildenafil Grubu[3]	250.0 - 280.0	265.0	265.0 ± 10.4[245]	*0.000* [K]
C Vitamini Grubu[4]	290.0 - 310.0	297.5	298.3 ± 8.2	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	290.0 - 310.0	300.0	300.0 ± 7.1	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-1 Denek ağırlıklarını gösterir tablo.

Tüm gruplarda minimum 250 maksimum 310 gr' dı. Çalışma kriterlerimize uygun olarak bulundu. Gruplar arasında farklılıklar bulundu ancak hem denek ağırlıklarının hem de over ağırlıklarının, folikül sayılarıyla ve de korpus sayılarıyla korelasyonu gösterilememiştir. (Bölüm 14.5. Korelasyon) (Tablo 14-1).

Kontrol grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ® +C vitamini grubunda ***denek ağırlığı*** Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ® +C vitamini grubunda

denek ağırlığı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda ***denek ağırlığı*** sildenafil ® grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubunda ***denek ağırlığı*** sildenafil ® grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. Kontrol grubunda ***denek ağırlığı*** sildenafil ® grubu ve C vitamini grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. C vitamini grubunda ***denek ağırlığı*** sildenafil ® ve C vitamini grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. (Tablo 14.1)

14.2. Denek Over Ağırlıkları

Denek over ağırlıkları ooferektomileri sonrası makroskopik olarak adipoz doku uzaklaştırıldıktan sonra "SHIMADZU ©" firmasına ait "ATX224 model hassas terazi" kullanılarak tartıldı (max 220g min 10 mg e:1 mg d: 0,1 mg).

En yüksek değer ortalaması 2866 mg (s/d 747.8) ile sildenafil+ c vitamininin birlikte verildiği grupta bulundu. Sırayla c vitamini grubu (2032 mg ± 346.2), sildenafil ® grubu (1669,2 mg ± 501.7), Sham grubu (994,3 mg ± 130.5), son olarak da kontrol grubunda (657,5 mg ± 139.8) hesaplanmıştır.

14.2.1. **Deneklerin Sağ Over Ağırlıkları**

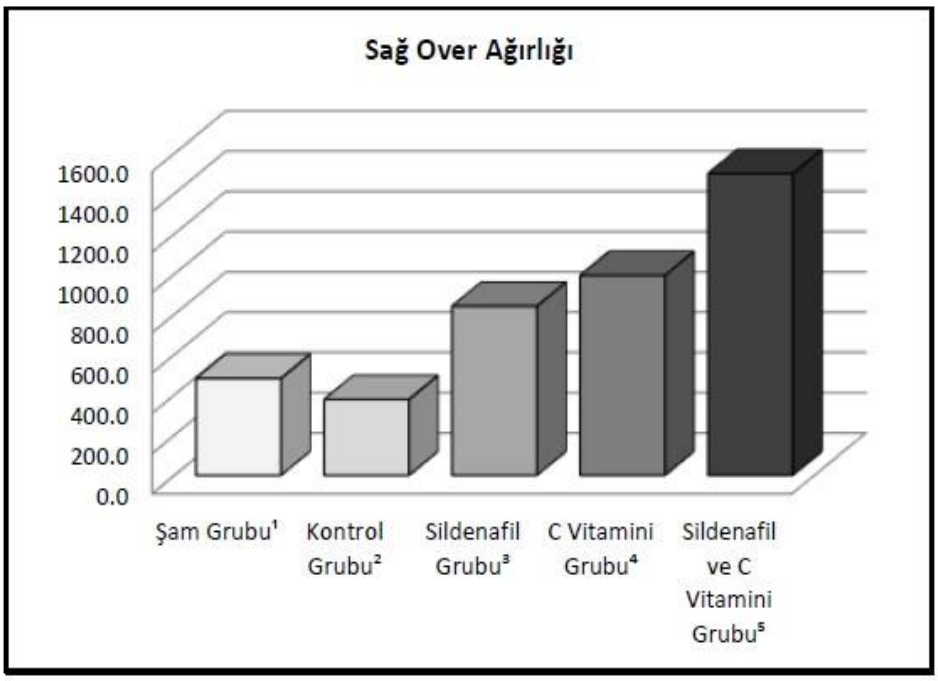
Sildenafil ®, C vitamini grubu, Sildenafil®+C vitamini grubunda *Sağ Over ağırlığı* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®, C vitamini grubu, Sildenafil®+C vitamini grubunda *Sağ Over ağırlığı* kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Kontrol grubunda *Sağ Over ağırlığı* sildenafil ® grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Sağ Over ağırlığı* C vitamini grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubunda *Sağ Over ağırlığı* kontrol grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. C vitamini grubunda *Sağ Over ağırlığı* sildenafil ® grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi (Tablo 14-2).

	Sağ Over Ağırlığı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	405.0 - 589.0	481.0	481.3 ± 67.4[345]	
Kontrol Grubu[2]	264.0 - 553.0	371.5	376.5 ± 107.1[345]	
Sildenafil Grubu[3]	609.0 - 1322.0	770.5	840.2 ± 246.2[5]	*0.000* K
C Vitamini Grubu[4]	692.0 - 1488.0	990.5	993.0 ± 294.5[5]	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	1125.0 - 2096.0	1463.0	1499.0 ± 358.9	

K Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



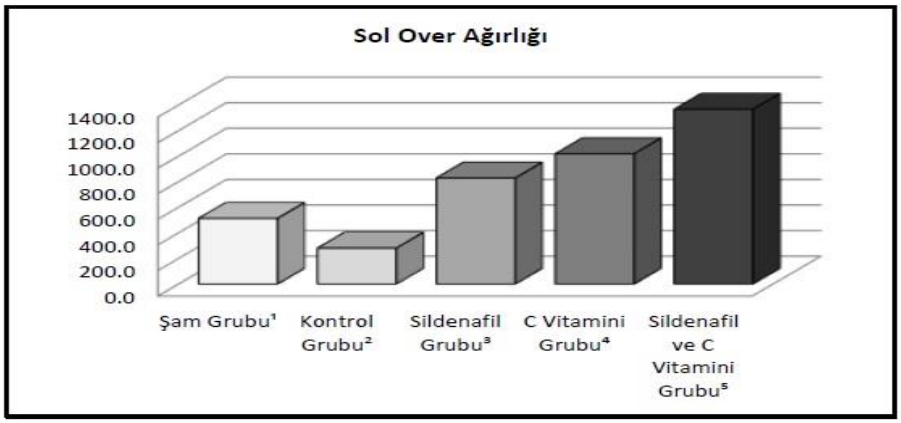
Tablo 14-2 Deneklerin sağ over ağırlık ortalamalarını gösterir tablo.

14.2.2. **Sol Over Ağırlığı**

Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Sol Over ağırlığı* Sham grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Sham grubu, Sildenafil ®, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Sol Over ağırlığı* kontrol grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Sol Over ağırlığı* sildenafil ® grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. C vitamini grubunda *Sol Over ağırlığı* sildenafil grubu, sildenafil ®+C vitaminini grubundan anlamlı (p> 0.05) olarak farklı değildi (Tablo 14-3). Hem sağ, hem sol over ağırlıkları cerrahi prosedürün uygulandığı gruplarda anlamlı şekilde yüksek olarak saptandı.

	Sol Over Ağırlığı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	438.0 - 621.0	509.5	513.0 ± 63.5[2345]	
Kontrol Grubu[2]	165.0 - 353.0	300.5	281.0 ± 66.7[345]	
Sildenafil Grubu[3]	396.0 - 1841.0	707.0	829.0 ± 512.5[5]	*0.000* [K]
C Vitamini Grubu[4]	393.0 - 1771.0	942.0	1018.8 ± 489.9	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	807.0 - 2415.0	1125.0	1367.0 ± 627.5	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)
[2] Kontrol Grubu ile fark p < 0.05/ [3] Sildenafil Grubu ile fark p < 0.05
[4] C Vitamini Grubu ile fark p < 0.05/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark p < 0.05



Tablo 14-3 Deneklerin sol over ağırlık ortalamalarını gösterir tablo.

14.2.3. **Toplam Over Ağırlıkları**

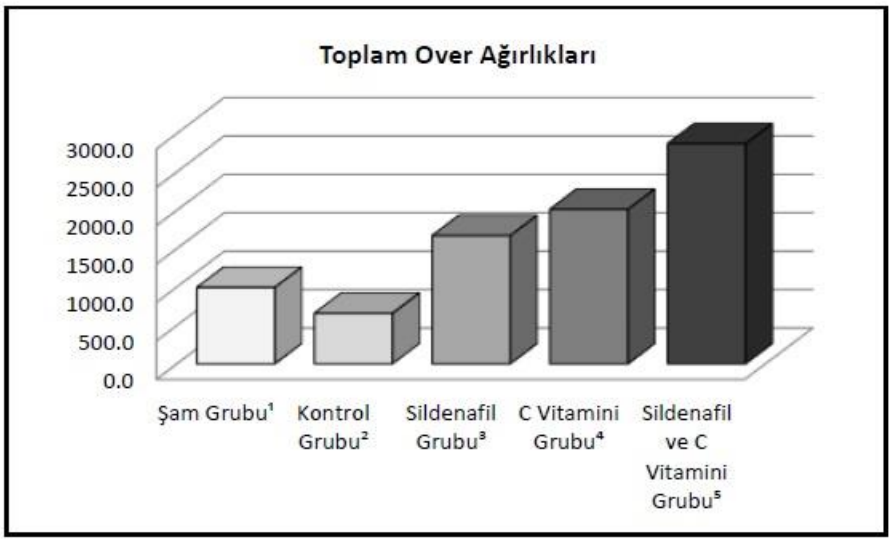
Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam over ağırlığı* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubu, Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam over ağırlığı* kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam over ağırlığı* sildenafil ® grubundan ve C vitamini grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini ve C vitamini grupları arasında *Toplam over ağırlığı* anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir Tablo 14-4).

	Toplam Over Ağırlıkları			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	843.0 - 1210.0	990.5	994.3 ± 130.5[2345]	
Kontrol Grubu[2]	498.0 - 863.0	668.0	657.5 ± 139.8[345]	
Sildenafil Grubu[3]	1352.0 - 2655.0	1468.5	1669.2 ± 501.7[5]	*0.000* K
C Vitamini Grubu[4]	1422.0 - 2473.0	2032.0	2011.8 ± 346.2[5]	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	2008.0 - 4010.0	2996.0	2866.0 ± 747.8	

K Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-4 Deney gruplarının toplam over ağırlıkları ortalamalarını gösterir tablo.

14.3. Folikül Sayıları

İkinci cerrahi operasyon sonrası alınan over dokuları %10 formolin solüsyonu içerise konuldu. Etiketlenerek T.C. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD laboratuvarına ulaştırıldı.

Burada parafin bloklara gömülen materyaller 4 – 5 µm boyutlarda kesilerek preperatlar hazırlandı. Hazırlanan preperatlar hematoksilen eosin ile boyandı. Büyük büyütme ile folikül rezerv araştırması yapıldı. Grup içinde en çok rezerv tespit edilen preperat overe ait temsilci preperat olarak seçildi. Her iki temsili over preperatları sayılarak deneğe ait folikül sayıları tespit edildi.

Folikül Sayıları

Deney Grubu	Primordial Folikül Sayısı	Primer Folikül Sayısı	Antral Folikül Sayısı	Graf Folikül Sayısı	Toplam Folikül Sayısı
Sham Grubu	14,67	27,00	7,83	5,00	**54,50**
Kontrol Grubu	3,00	2,50	1,17	1,00	**7,67**
Sildenafil Uygulanan Grup	7,17	12,83	5,50	3,17	**28,67**
C Vitamini Verilen Grup	8,67	15,67	4,67	3,00	**32,00**
Sildenafil ve C Vitamini Verilen Grup	11,50	21,67	6,50	4,83	**44,50**
Total	***9,00***	***15,93***	***5,13***	***3,40***	***33,47***

Tablo 14-5 Folikül sayıları açısından grupların dağılımı.

Elde edilen verilere göre folikül sayılarından en yüksek değer Sham grubuna ait olan 54,50 adet olan değerdir.

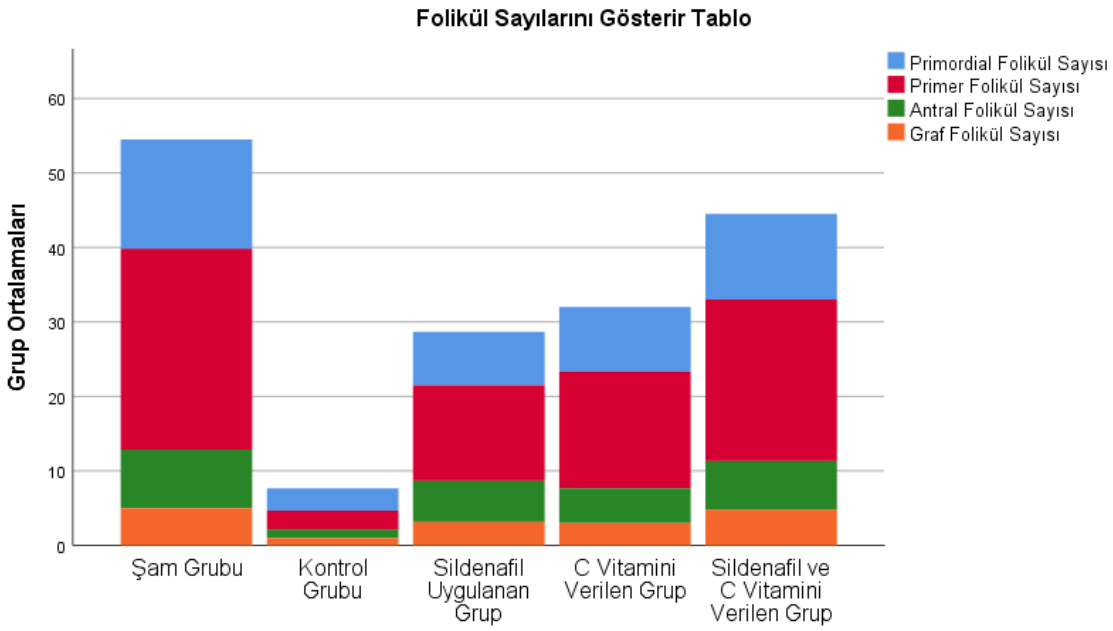
Sham grubunda ortalama 14,67 adet primordial folikül, ortalama 27 adet primer folikül, ortalama 7,83 adet antral folikül, yine ortalama 5 adet graf folikül sayılmıştır.

Folikül sayıları açısından en az ortalama değerler cerrahi prosedürün uygulandığı ve sonrasında 21 gün boyunca test edilen medikasyon açısından bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubuna dair verilerdir. Bu durumda primordial folikül sayısı ortalama 3 adet, primer folikül sayısı ortalama 2,50 adet, antral folikül sayısı ortalama 1,17 adet graft folikül sayısı ortalama 1 adet ve toplam folikül sayısı olarak da 7,67 adetlik değer elde edilmiştir(Tablo14-5)

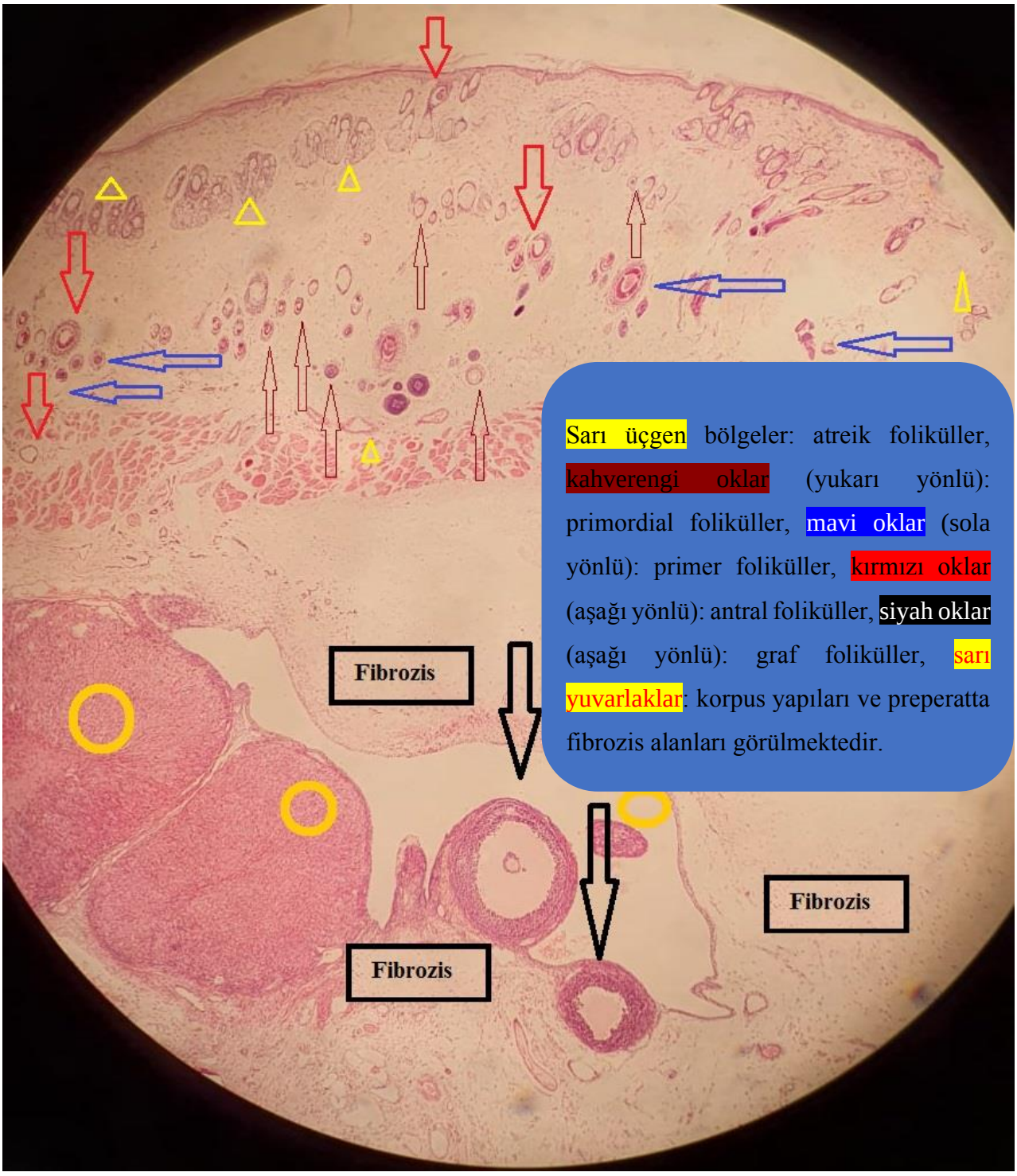
Sildenafil ® uygulanan grup, folikül sayıları açısından kontrol grubuna en yakın gruptur. Primordial folikül sayısı 7,17; primer folikül sayısı 12,83; antral folikül sayısı 5,50; graf folikül sayısı 3,17; toplamda gruptaki ortalama 28,68 adet olarak hesaplanmıştır.

C vitamini verilen grupta folikül sayıları şöyledir; primordial folikül sayısı 8,67; primer folikül sayısı 15,67; antral folikül sayısı 4,67; graf folikül sayısı 3 ve toplamda 32 adet olarak hesaplanmıştır.

Hem c vitamini hem de sildenafil ® verilen grup Sham grubu verilerine en yakın folikül sayıları elde edilmiştir. Primordial folikül sayısı 11,50; primer folikül sayısı 21,67; antral folikül sayısı 6,50; graf folikül sayısı 4,83 ve toplam folikül sayısı grup ortalaması olarak 44,50 olarak hesaplanmıştır.

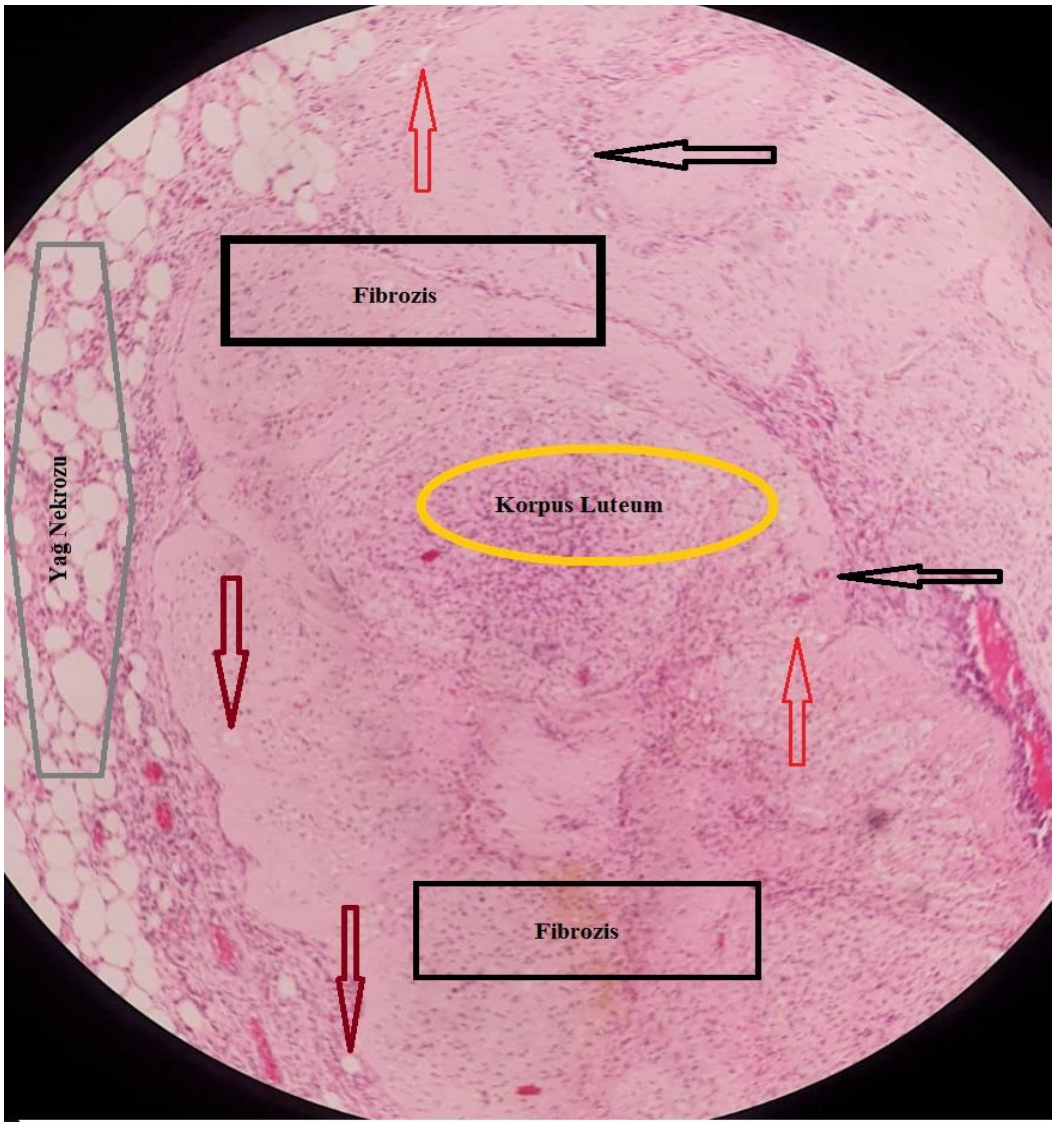


Tablo 14-6 Folikül sayılarını grup ortalamalarına göre gösterir tablo.



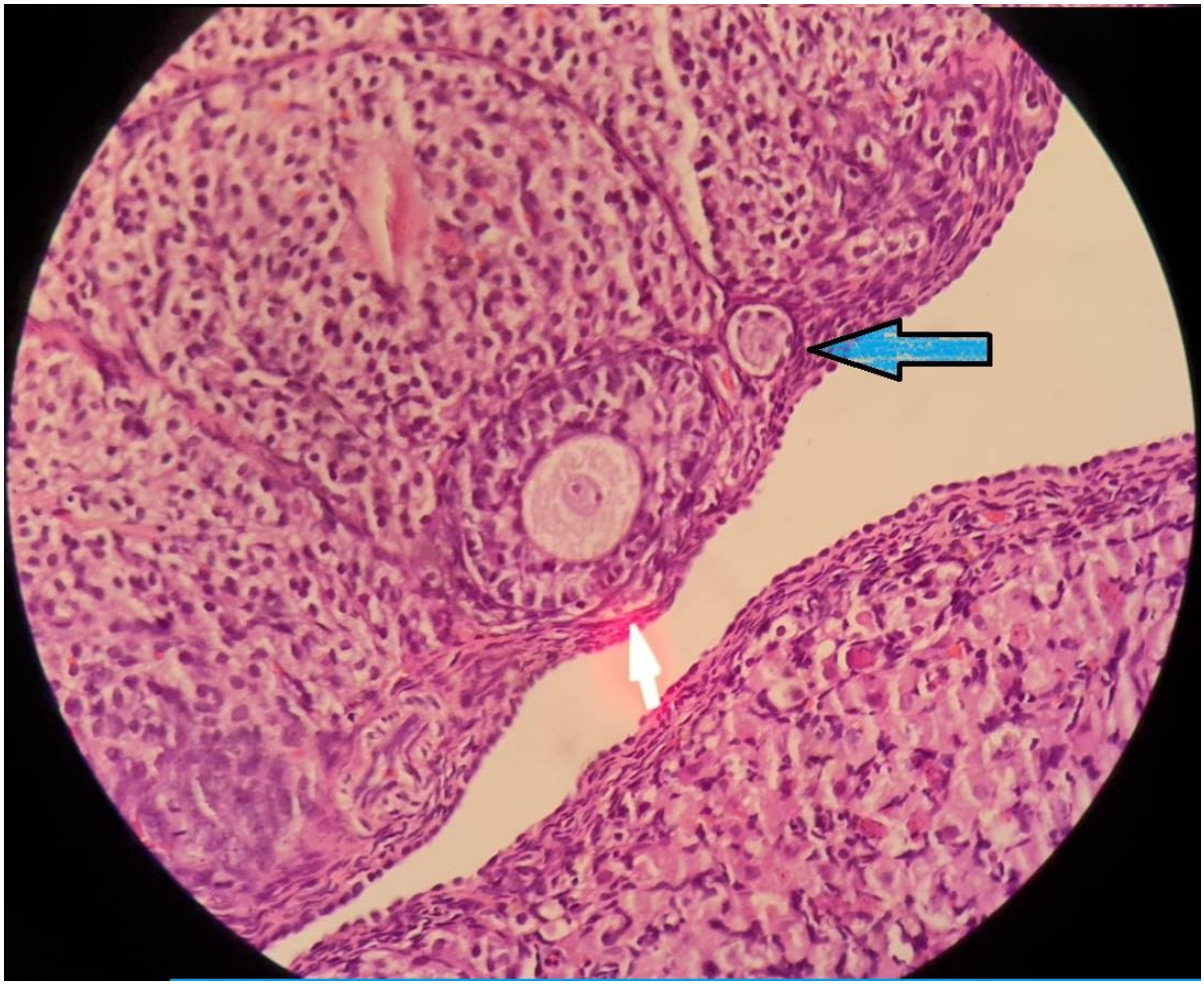
Resim 14-1 Sham grubuna ait deneklerden örnek bir preparat.

Denek gruplarına ait örnek preperatlar Resim 14-1 de gösterilmiştir.



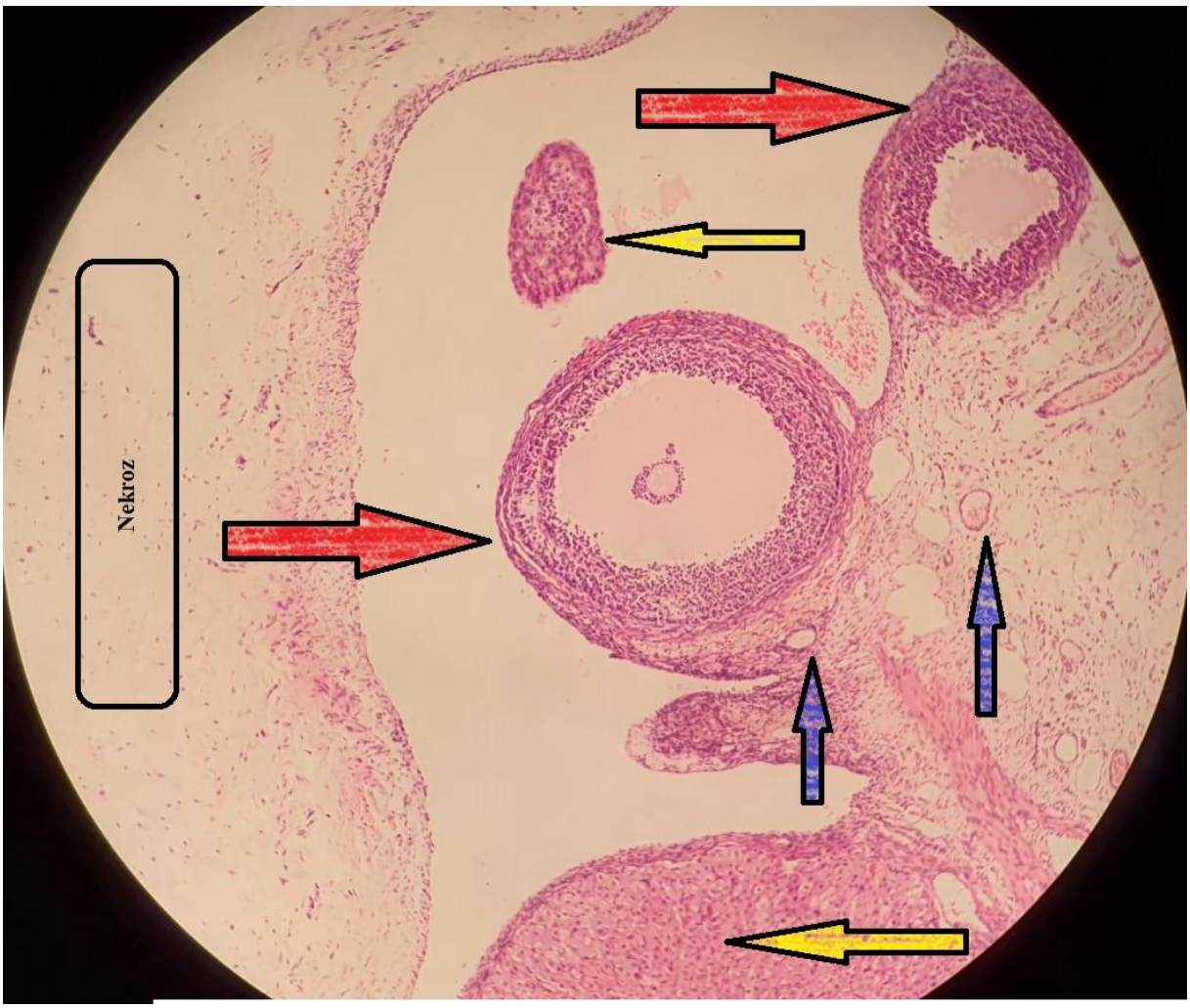
Resim 14-2 Kontrol grubuna ait temsili rat over preparatı

Denek gruplarından kontrol grubuna ait temsili rat over preperatı Resim 14-2' de gösterilmiştir. Korpus luteum (sarı elips), primordial folikül (kırmızı yukarı ok), primer folikül (siyah sola ok), antral folikül (kahverengi aşağı ok), fibrotik alanlar ve yaygın yağ nekrozu alanları görülmektedir.



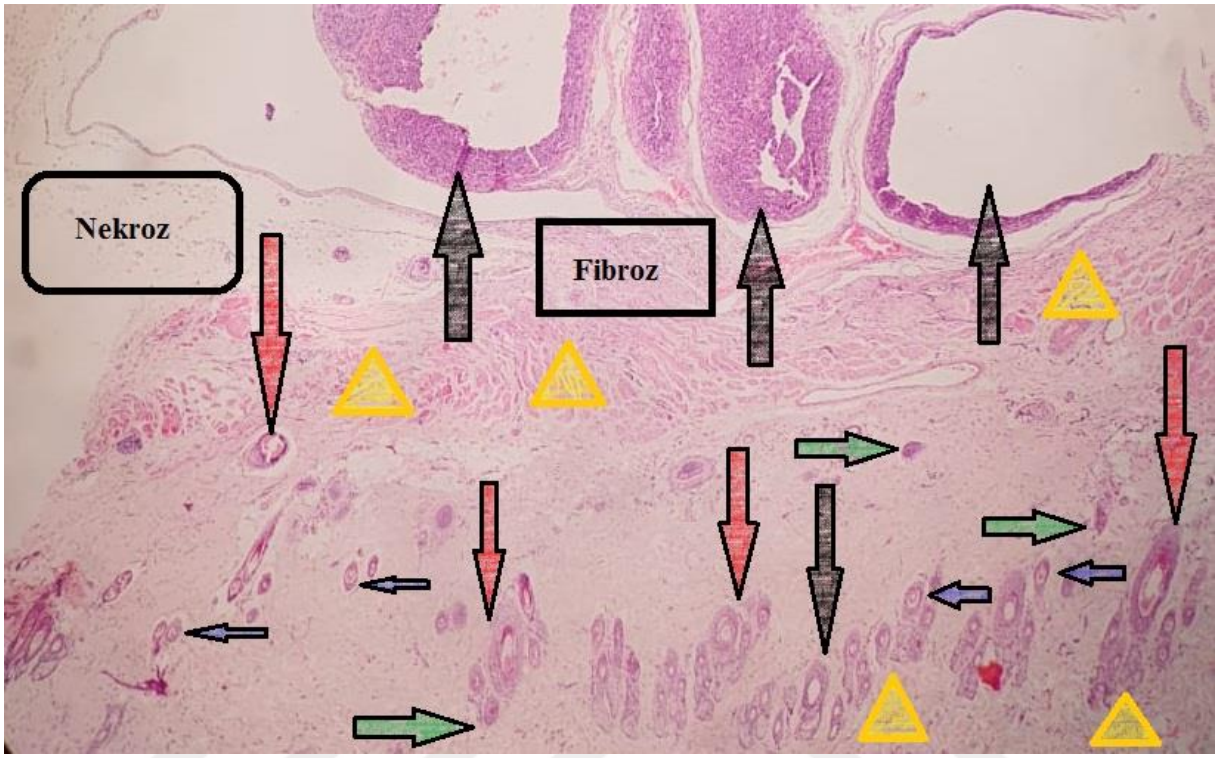
Resim 14-3 Sildenafil grubundaki deneklerdeki temsili over preparatı.

Sildenafil ® grubuna (3. grup) ait temsili bir over preperatı Resim 14-3' de gösterilmiştir. Primordial folikül (mavi sola ok) ve primer folikül (kırmızı yukarı ok) görülmektedir.



Resim 14-4 C vitamini uygulanan deneklerdeki over görüntüsü.

Sadece C vitamini uygulanan 4. grup deney hayvanları over dokusundan hazırlanan temsili preperat Resim 14-4 de gösterilmiştir. Nekrotik alanlar, Primordial foliküller (yukarı mavi ok), graf foliküller (kırmızı sola oklar), korpus yapıları (sarı sola oklar) ve fibrotik alanlar izlenmektedir.



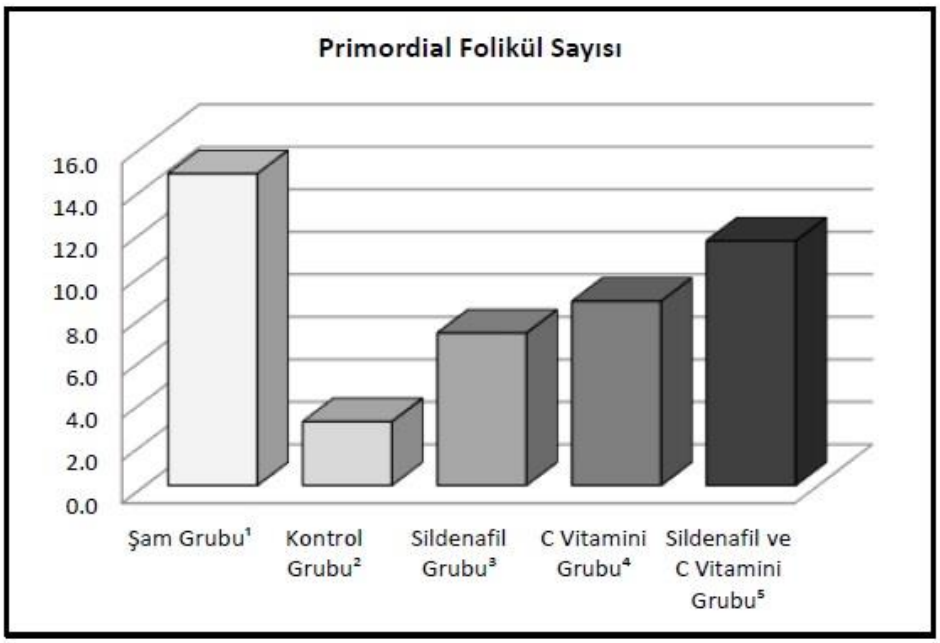
Resim 14-5 Sildenafil ® ve c vitamini birlikte uygulanan deneklerdeki temsili bir over dokusu preparatı.

Hem sildenafil ® hem de c vitamininin birlikte verildiği grup olan 5. grup deneklerinin over dokularında hazırlanan temsili bir preperat Resim 14-5 de gösterilmiştir. Korpus yapıları (siyah oklar), primordial foliküller (mavi sola oklar), primer folikül yapıları (yeşil sağa oklar), antral foliküller (aşağı kırmızı oklar), nekrotik alanlar ve fibrotik alanlar izlenmektedir (Resim 14-5).

14.3.1. **Primordial Folikül Sayıları**

	Primordial Folikül Sayısı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	13.0 - 17.0	14.5	14.7 ± 1.63[2345]	
Kontrol Grubu[2]	2.00 - 5.00	2.50	3.00 ± 1.26[345]	
Sildenafil Grubu[3]	5.00 - 9.00	7.50	7.17 ± 1.471[5]	*0.000* [K]
C Vitamini Grubu[4]	7.00 - 11.00	8.50	8.67 ± 1.63[5]	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	8.00 - 15.00	11.50	11.50 ± 2.43	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)
[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$
[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-7 Primordial folikül sayı ortalamalarını gösterir tablo.

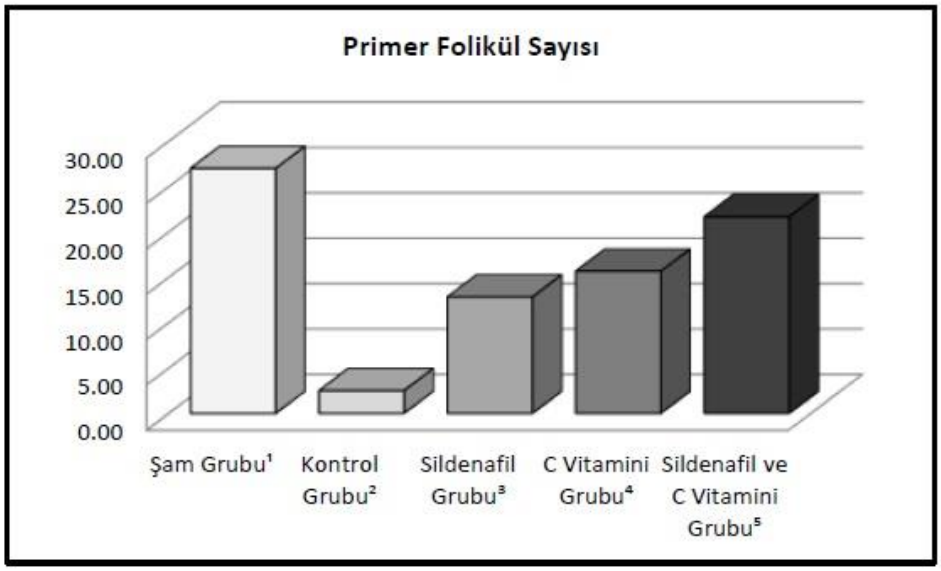
Kontrol grubu, Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Primordial Folikül Sayısı* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Sildenafil ®, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Primordial Folikül Sayısı* kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Primordial Folikül Sayısı* sildenafil ® grubundan ve C vitamini grubundan anlamlı ($p < 0.05$)

olarak daha yüksekti. C vitamini grubunda *Primordial Folikül Sayıs* sildenafil ®+C vitaminini grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi (Tablo 14-7).

14.3.2. **Primer Folikül Sayıları**

	Primer Folikül Sayısı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	24.00 - 31.00	26.50	27.00 ± 2.75[2345]	
Kontrol Grubu[2]	1.00 - 4.00	2.50	2.50 ± 1.04[345]	
Sildenafil Grubu[3]	7.00 - 17.00	13.50	12.83 ± 3.48[5]	*0.000* [K]
C Vitamini Grubu[4]	12.00 - 19.00	16.00	15.67 ± 3.01[5]	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	19.00 - 23.00	22.00	21.67 ± 1.51	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)
[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$
[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-8 Primer folikül sayılarını gösterir tablo.

Kontrol grubu, Sildenafil grubu, C vitamini grubu, Sildenafil+C vitamini grubunda *Primer Folikül Sayısı* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Sildenafil, C vitamini grubu, Sildenafil+C vitamini grubunda *Primer Folikül Sayısı* kontrol grubundan

anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Sildenafil+C vitamini grubunda *Primer Folikül Sayısı* sildenafil grubundan ve C vitamini grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. C vitamini grubunda *Primer Folikül Sayıs* sildenafil+C vitaminini grubundan anlamlı (p> 0.05) olarak farklı değildi (Tablo 14-8).

14.3.3. **Antral Folikül Sayıları**

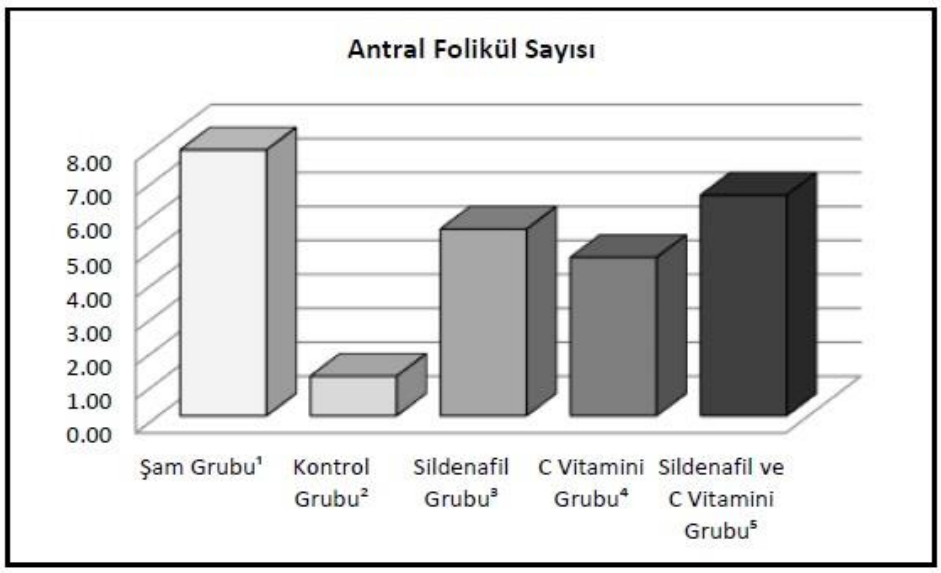
Denek gruplarından elde edilmiş temsili preperatlardan sayılan grup ortalamalarına dair antral folikül sayım ortalamalarını gösterir tablo 14-9 dur. Kontrol grubu, Sildenafil grubu, C vitamini grubu grubunda *Antral Folikül Sayısı* Sham grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha düşüktü. Sildenafil grubu, C vitamini grubu, Sildenafil+C vitamini grubunda *Antral Folikül Sayısı* kontrol grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Sildenafil+C vitamini, sildenafil grubu, C vitamini grupları arasında *Antral Folikül Sayısı* anlamlı (p> 0.05) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-9).

	Antral Folikül Sayısı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	6.00 - 10.00	7.50	7.83 ± 1.47[234]	
Kontrol Grubu[2]	0.00 - 2.00	1.00	1.17 ± 0.75[345]	
Sildenafil Grubu[3]	3.00 - 8.00	5.50	5.50 ± 1.87	*0.001* [K]
C Vitamini Grubu[4]	2.00 - 7.00	4.50	4.67 ± 1.75	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	4.00 - 8.00	7.00	6.50 ± 1.64	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-9 Antral folikül Sayı ortalamalarını gösterir tablo.

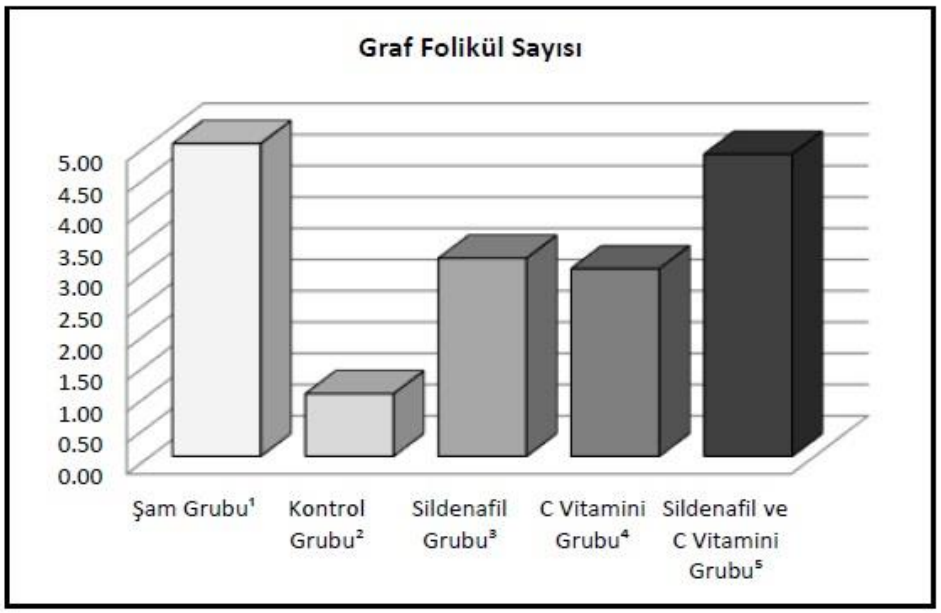
14.3.4. **Graf Folikül Sayıları**

	Graf Folikül Sayısı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	3.00 - 7.00	5.00	5.00 ± 1.41[234]	
Kontrol Grubu[2]	0.00 - 2.00	1.00	1.00 ± 0.63[345]	
Sildenafil Grubu[3]	2.00 - 5.00	3.00	3.17 ± 1.17	*0.001* [K]
C Vitamini Grubu[4]	1.00 - 5.00	3.00	3.00 ± 1.41	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	3.00 - 7.00	4.50	4.83 ± 1.47	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



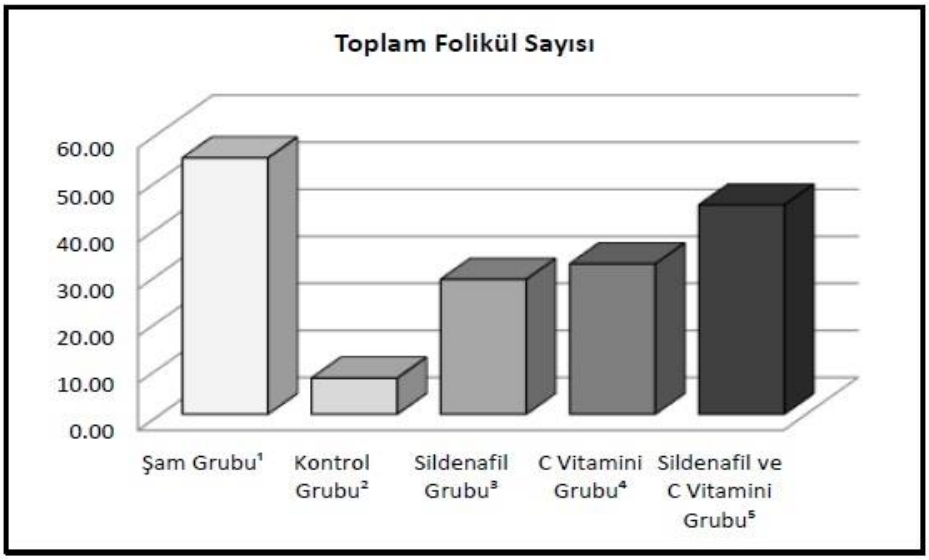
Tablo 14-10 Graf folikül sayı ortalamalarını gösterir tablo.

Kontrol grubu, sildenafil ® grubu, C vitamini grubu grubunda *Graf Folikül Sayısı* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Graf Folikül Sayısı* kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini, sildenafil ® grubu, C vitamini grupları arasında *Graf Folikül Sayısı* anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-10).

14.3.5. **Toplam Folikül Sayıları**

	Toplam Folikül Sayısı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	49.00 - 63.00	54.00	54.50 ± 5.08[2345]	
Kontrol Grubu[2]	6.00 - 11.00	7.50	7.67 ± 1.86[345]	
Sildenafil Grubu[3]	17.00 - 34.00	30.00	28.67 ± 6.15[5]	*0.000* [K]
C Vitamini Grubu[4]	28.00 - 40.00	29.00	32.00 ± 5.47[5]	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	38.00 - 50.00	44.50	44.50 ± 4.55	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)
[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$
[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-11 Toplam folikül sayı ortalamalarını gösterir tablo.

Kontrol grubu, sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam folikül sayısı* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam folikül sayısı* kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam folikül sayısı* sildenafil ®grubundan ve C vitamini grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini ve C vitamini grupları arasında *Toplam folikül sayısı* anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-11).

14.4. Korpus Sayıları

Korpus sayı ortalamaları açısından durum şöyledir;

Deney Grubu	Korpus Luteum	Korpus Albicans	Toplam Korpus Sayısı
Sham Grubu	6,33	4,67	**11,00**
Kontrol Grubu	1,33	,67	**2,00**
Sildenafil Uygulanan Grup	3,50	2,00	**5,50**
C Vitamini Verilen Grup	2,83	1,33	**4,17**
Sildenafil ve C Vitamini Verilen Grup	4,00	2,50	**6,50**
Total	***3,60***	***2,23***	***5,83***

Tablo 14-12 Ortalama korpus sayılarını gösterir tablo.

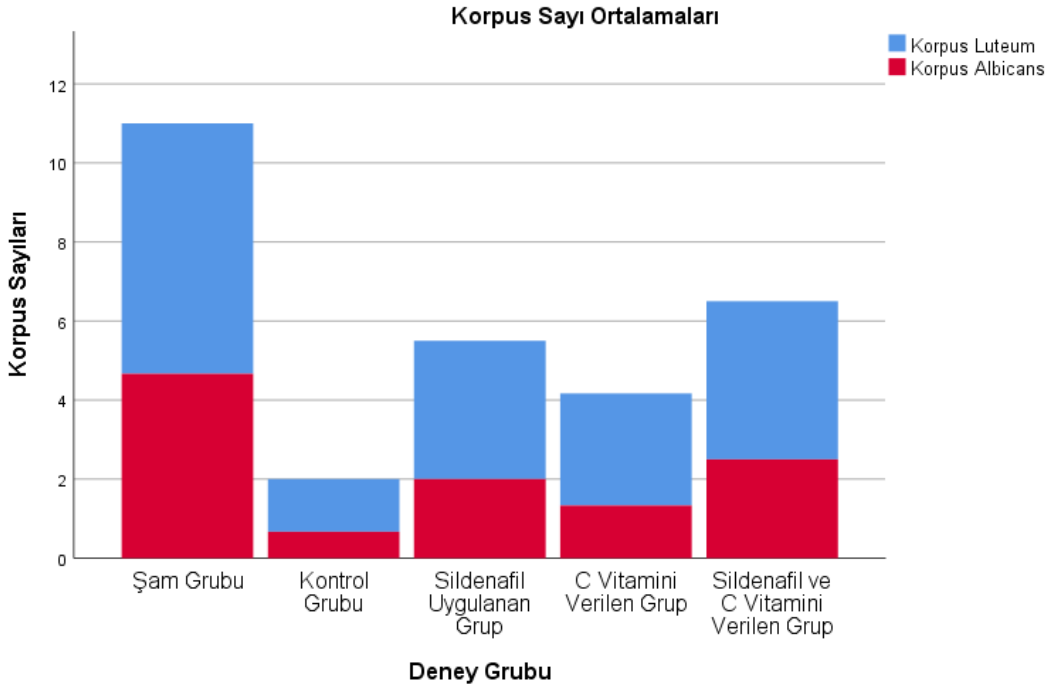
Cerrahi porosedürün uygulanmadığı Sham grubunda, Korpus luteum sayı ortalaması 6,33; Korpus albikans sayı ortalaması ise 4,67 dir. Toplamda korpus sayı ortalaması ise 11 olarak hesaplanmıştır (Tablo 14-12).

Bu gruba en yakın korpus sayısı ortalamaları sildenafil ® ve c vitaminin birlikte verildiği grup olan 5. grupta elde edilmiştir. Korpus luteum sayısı 4, korpus albikans sayısı ise 2,5; toplamdaki korpus sayı ortalaması 6,50 olarak hesaplanmıştır.

Tüm gruplar arasındaki en kötü korpus sayı ortalaması tıpkı folikül sayı ortalamalarında görüldüğü gibi kontrol grubundan elde edilmiştir. Korpus luteum sayı ortalaması 1,33; korpus albikans sayı ortalaması 0,67 ve toplamda korpus sayı ortalaması 2 olarak hesaplanmıştır.

Kontrol grubuna en yakın korpus sayı ortalamaları ise folikül sayımından farklı olarak c vitaini grubunda elde edilmiştir. Bu grupta korpus luteum ortalaması 2,83; korpus albikans ortalaması ise 1,33 ile toplamda 4,17 olarak hesaplanmıştır.

Sildenafil grubundaki korpus verileri ise şöyledir; korpus luteum ortalaması 3,50; korpus albikans ortalaması ise 2 ve toplamda korpus ortalaması 5,50 olarak hesaplanmıştır.



Tablo 14-13 Grupların korpus sayı ortalamalarını gösterir grafik.

Grupların korpus sayı ortalamalarının gösterildiği grafiğe göre (Tablo 14-13), Sham grubuna en yakın ortalama sildenafil ® ve c vitaminin birlikte verildiği grupta hesaplanmıştır. Sırasıyla sildenafil ® verilen grup, c vitamini verilen grup ve son olarak da kontrol grubunda elde edilmiştir (Tablo 14-13).

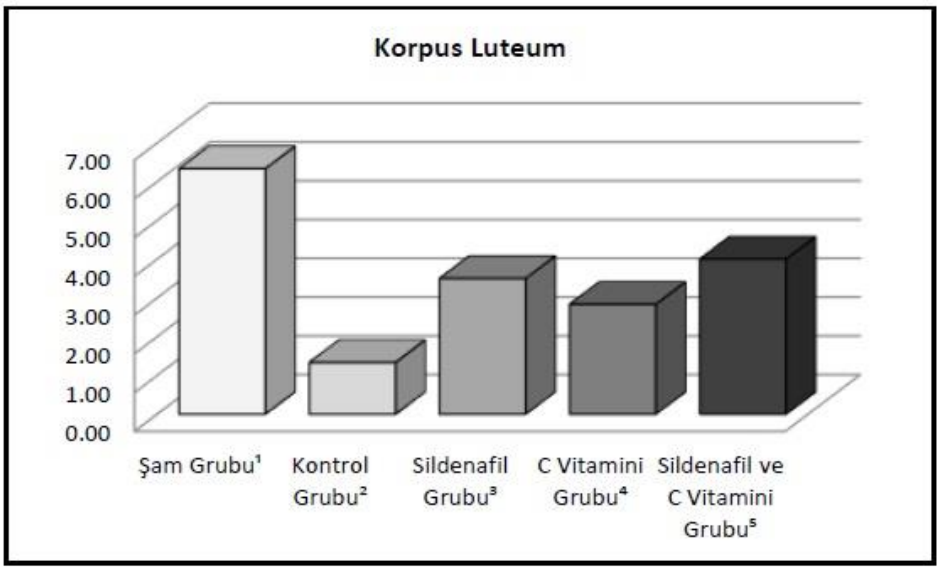
14.4.1. **Korpus Luteum**

	Korpus Luteum			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	4.00 - 8.00	6.50	6.33 ± 1.63[2345]	
Kontrol Grubu[2]	1.00 - 2.00	1.00	1.33 ± 0.52[345]	
Sildenafil Grubu[3]	2.00 - 5.00	3.50	3.50 ± 1.05	*0.000* [K]
C Vitamini Grubu[4]	1.00 - 5.00	3.00	2.83 ± 1.33	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	3.00 - 5.00	4.00	4.00 ± 0.89	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-14 Korpus luteum ortalamalarını gösterir grafik.

Kontrol grubu, Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda *Korpus Luteum* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Korpus Luteum* kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini, sildenafil ® grubu, C vitamini grupları arasında *Korpus Luteum* anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-14).

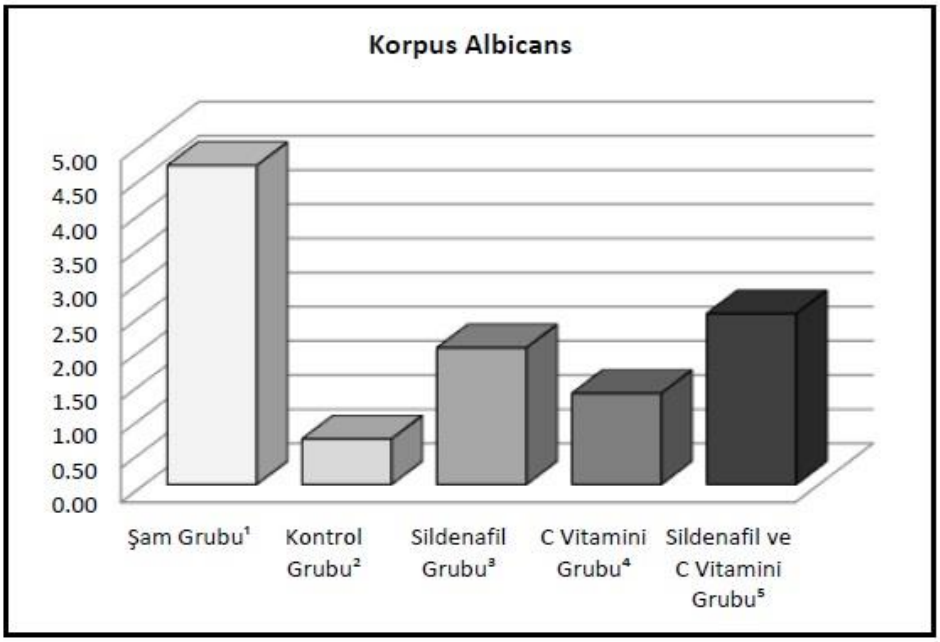
14.4.2. **Korpus Albikans Sayıları**

	Korpus Albicans			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	2.00 - 8.00	4.50	4.67 ± 2.16[234]	
Kontrol Grubu[2]	0.00 - 2.00	0.50	0.67 ± 0.82	
Sildenafil Grubu[3]	1.00 - 3.00	2.00	2.00 ± 0.89	*0.009* [K]
C Vitamini Grubu[4]	0.00 - 2.00	1.50	1.33 ± 0.82	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	0.00 - 5.00	3.00	2.50 ± 2.07	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



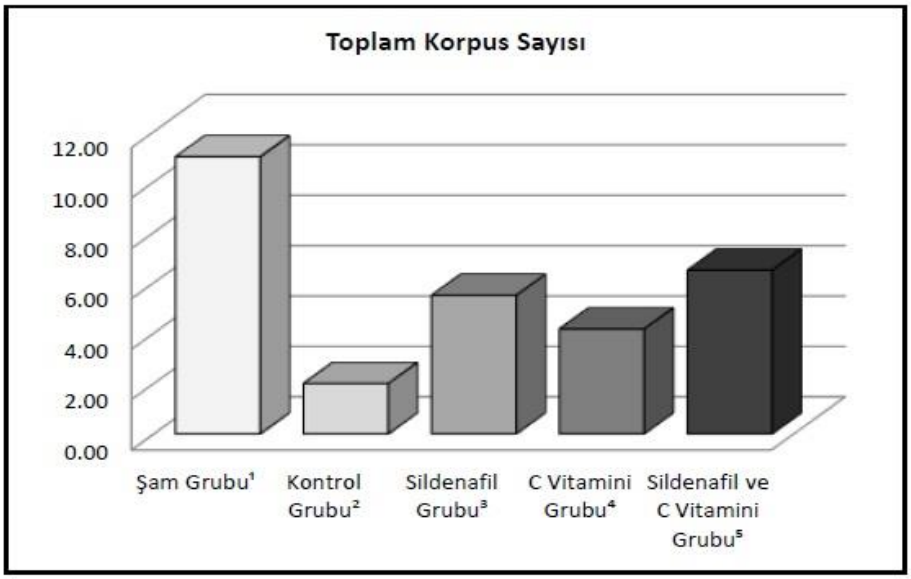
Tablo 14-15 Korpus albikans sayım ortalamalarını gösterir grafik.

Kontrol grubu, sildenafil ® grubu, C vitamini grubu grubunda *Korpus Albicans* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Kontrol grubu, Sildenafil ®+C vitamini, sildenafil ® grubu, C vitamini grupları arasında *Korpus Albicans* anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-15).

14.4.3. **Toplam Korpus Sayıları**

	Toplam Korpus Sayısı			p
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s	
Şam Grubu[1]	6.00 - 13.00	12.00	11.00 ± 2.68[2345]	
Kontrol Grubu[2]	1.00 - 4.00	2.00	2.00 ± 1.09[345]	
Sildenafil Grubu[3]	3.00 - 8.00	5.50	5.50 ± 1.87	*0.001* [K]
C Vitamini Grubu[4]	1.00 - 7.00	4.50	4.17 ± 2.04	
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	3.00 - 9.00	7.00	6.50 ± 2.59	

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)
[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$
[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-16 Toplam korpus sayım ortalamalarını gösterir grafik.

Kontrol grubu, sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam korpus sayısı* Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşüktü. Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda *Toplam korpus sayısı* kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini, sildenafil ® grubu, C vitamini grupları arasında *Toplam korpus sayısı* anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-16).

14.5. Korelasyon

Toplam folikül sayısı ile denek ağırlığı, sağ over ağırlığı, sol over ağırlığı, toplam over ağırlığı arasında anlamlı (p> 0.05) korelasyon gözlenmemiştir.

Toplam folikül sayısı ile primordial folikül sayısı, primer folikül sayısı, antral folikül sayısı, graf folikül sayısı, korpus luteum, korpus albicans arasında anlamlı (p <0.05) pozitif korelasyon gözlenmiştir. (Tablo 14-17).

Toplam korpus sayısı ile denek ağırlığı, sağ over ağırlığı, sol over ağırlığı, toplam over ağırlığı arasında anlamlı (p> 0.05) korelasyon gözlenmemiştir.

Toplam Korpus sayısı ile primordial folikül sayısı, primer folikül sayısı, antral folikül sayısı, graf folikül sayısı, korpus luteum, korpus albicans arasında anlamlı (p <0.05) pozitif korelasyon gözlenmiştir. (Tablo 14-17)

		Denek Ağırlığı	Sağ Over Ağırlığı	Sol Over Ağırlığı	Primordial Folikül Sayısı	Primer Folikül Sayısı
Toplam Folikül Sayısı	r	-0.167	0.214	0.349	0.948	0.977
	p	0.377	0.257	0.059	***0.000***	***0.000***
Toplam Korpus Sayısı	r	-0.342	0.186	0.123	0.792	0.754
	p	0.065	0.326	0.516	***0.000***	***0.000***

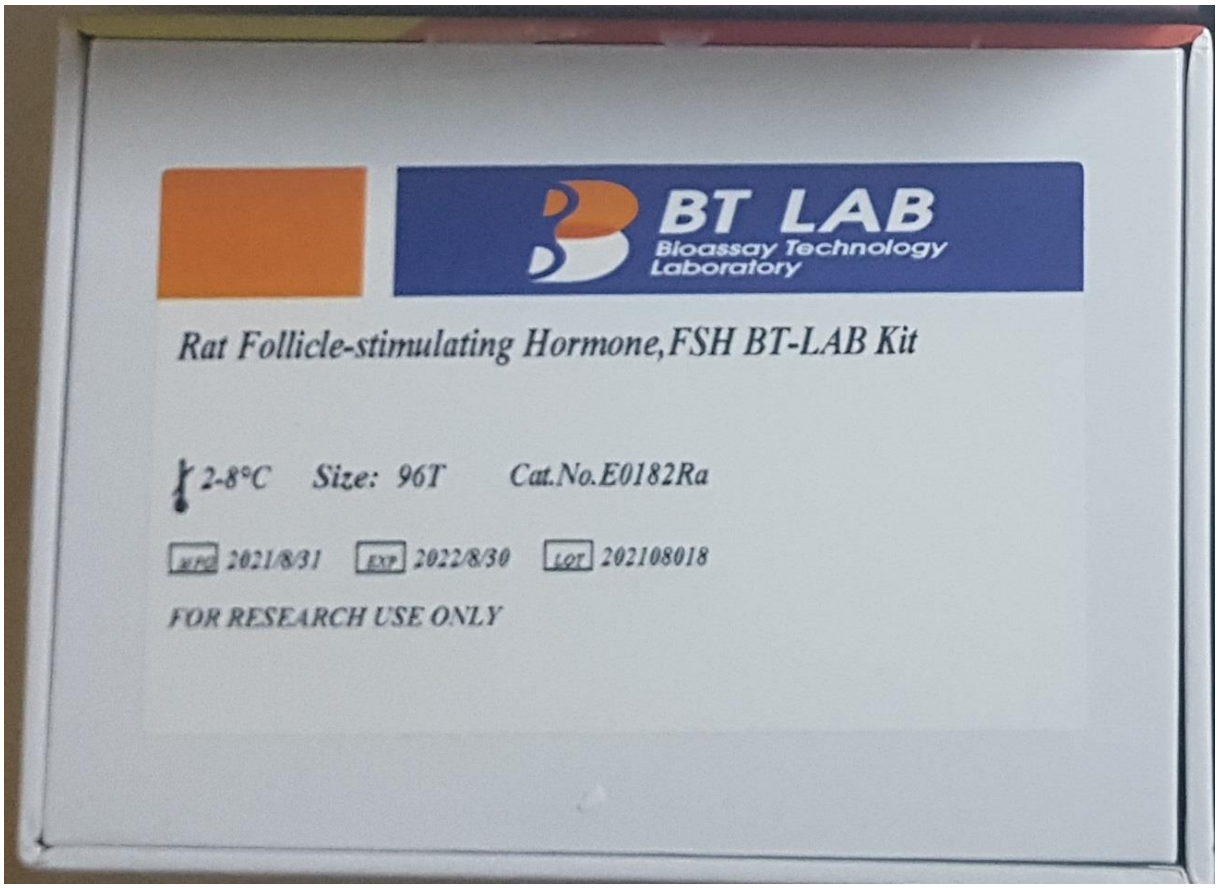
		Antral Folikül Sayısı	Graf Folikül Sayısı	Korpus Luteum	Korpus Albicans	Toplam Over Ağırlıkları
Toplam Folikül Sayısı	r	0.864	0.801	0.814	0.709	0.260
	p	***0.000***	***0.000***	***0.000***	***0.000***	0.165
Toplam Korpus Sayısı	r	0.743	0.741	0.944	0.943	0.099
	p	***0.000***	***0.000***	***0.000***	***0.000***	0.604

Spearman Korelasyon

Tablo 14-17 Gruplarda saptanan bulguların korelasyonunu gösteren tablo.

14.6. Serum Numunelerinden FSH Ölçüm Parametresi

Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen yaklaşık 5 ml kan örnekleri dakikada 2000 devir ile 20 dakika santrifüj edildi. En az 1 en çok 3 petri olacak şekilde -20 C^{o} de 6 ay saklandı. "FARMASILAB ©" firmasına istenilen analiz kitlerinin gelmesi ile 6 ay sonra analizi yapıldı. Bu işlem için "FSH BT-LAB Kit Cat.No: E182Ra analiz kiti" kullanıldı (Resim 14-6).



Resim 14-6 Elisa analizi için sipariş edilen FSH kitleridir.

FARMASILAB © firmasında laboratuvar analizine tabi tutulmuşlardır. Kit, yarışmalı ELISA sistemini (competetive enzyme-linked immunosorbent assay) kullanmaktadır. Düşük miktardaki enzim absorbansı yüksek miktarda antijenin varlığını göstermektedir.

Nicel bağımsız verilerin analizinde “Kruskal-wallis, mann-whitney u test” kullanıldı. Tüm farklılıkların analizinde “P<0.05” anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmamda, “IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı” kullanılmıştır.

Kontrol grubu, C vitamini grubu grubunda ***FSH değeri*** Sham grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu, Sham grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda ***FSH değeri*** Sildenafil ® grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu, C vitamini, grubunda ***FSH değeri*** Sildenafil ®+C vitamini grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Sham grubu ve Sildenafil ®+C vitamini grupları arasında ***FSH değeri*** anlamlı (p> 0.05) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-18).

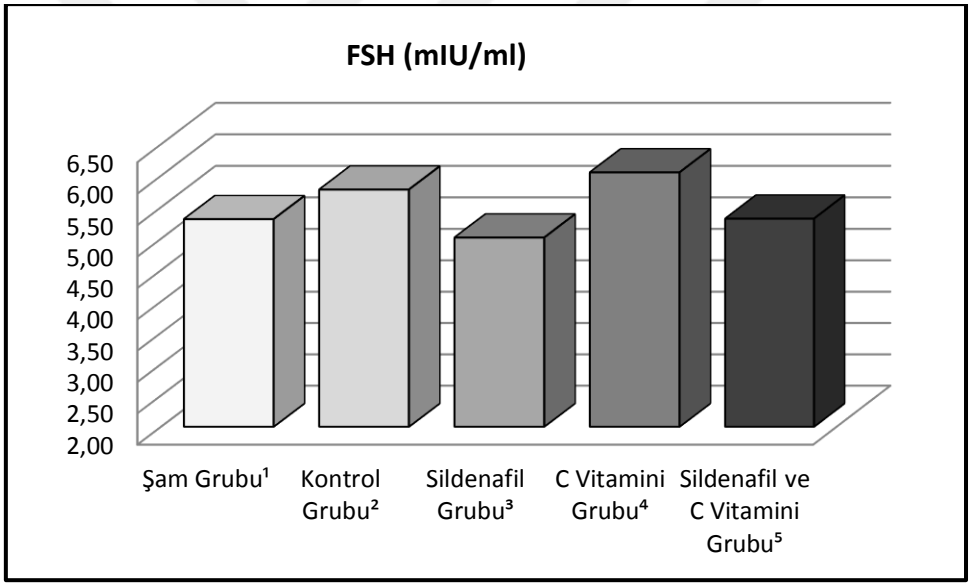
FSH analizinde en düşük veri 5.02 mIU/ml (s/d 0.07) ile sildenafil ® grubunda elde edilmiştir. 5.31 mIU/ml (± 0.06) Sham grubunda, 5.32 mIU/ml sildenafil ®+ c vitamini grubunda (± 0.05), 5.78 mIU/ml kontrol (±0.06), en yüksek olarak da 6.05 mIU/ml c vitamini grubunda tespit edildi (± 0.07) (Tablo 14-18).

	FSH (mIU/ml)			p	
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s		
Sham Grubu[1]	5,23 - 5,38	5,32	5,31 ± 0.06[234]		
Kontrol Grubu[2]	5,69 - 5,88	5,78	5,78 ± 0.06[345]		
Sildenafil Grubu[3]	4,91 - 5,08	5,06	5,02 ± 0.07[45]	***0,000***	K
C Vitamini Grubu[4]	5,96 - 6,14	6,06	6,05 ± 0.07[5]		
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	5,25 - 5,39	5,32	5,32 ± 0,05		

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

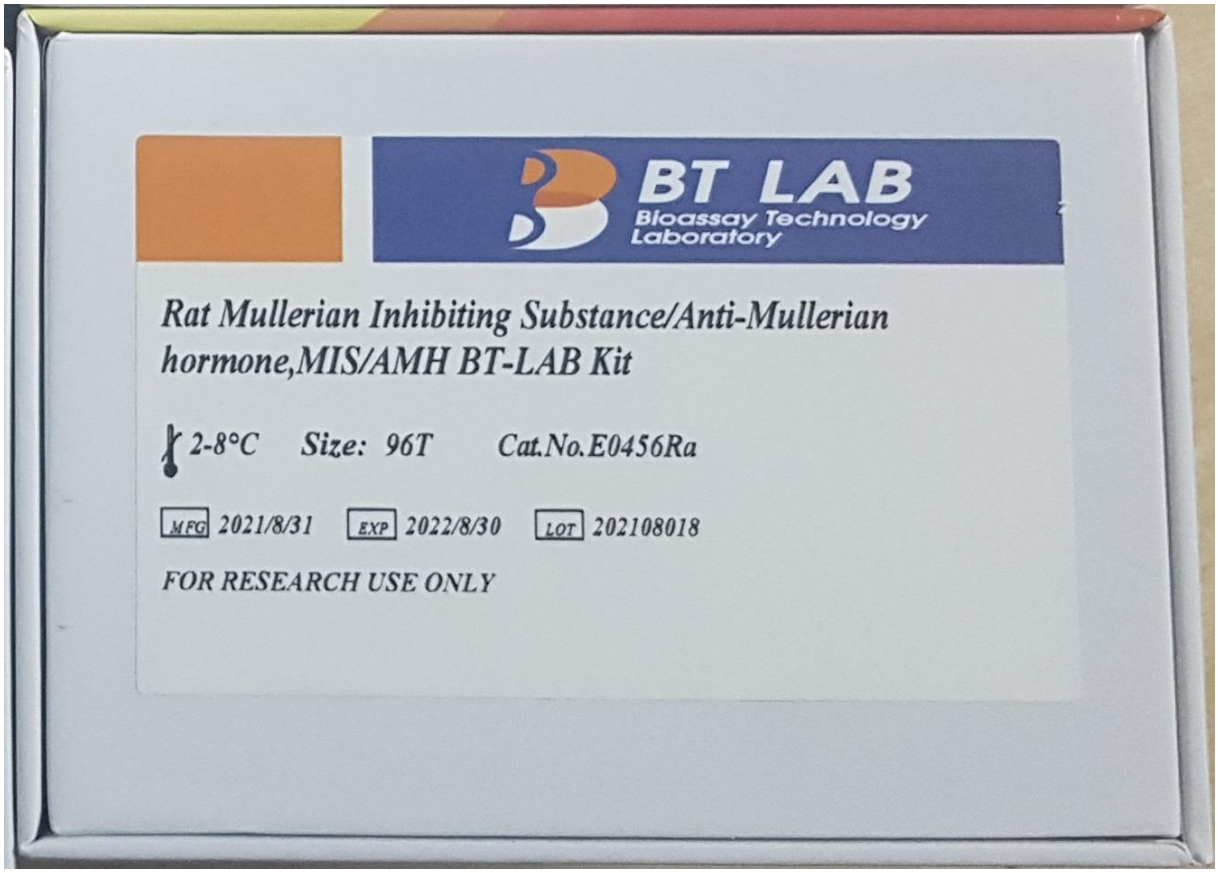
[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-18 FSH analizinde denek ortalamalarını gösterir tablo.

14.7. Serum Numunelerinden AMH Ölçüm Parametresi

Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen yaklaşık 5 ml kan örnekleri dakikada 2000 devir ile 20 dakika santirfüj edildi. En az 1 en çok 3 petri olacak şekilde şekilde -20 C^{o} de 6 ay saklandı. "FARMASILAB ©" firmasına istenilen analiz kitlerinin gelmesi ile 6 ay sonra analizi yapıldı. Bu işlem için "BT LAB firmasının MIS/AMH BT-LAB Kit (Cat.No:E0456Ra)" analiz kiti kullanıldı (Resim 14-7).



Resim 14-7 Elisa analizi için sipariş edilen AMH kitleridir.

Kitler "FARMASILAB ©" firmasında laboratuvar analizine tabi tutulmuşlardır. Kit, yarışmalı ELISA sistemini (competetive enzyme-linked immunosorbent assay) kullanmaktadır. Düşük miktardaki enzim absorbansı yüksek miktarda antijenin varlığını göstermektedir (Resim 14-7).

Nicel bağımsız verilerin analizinde “Kruskal-wallis, mann-whitney u test” kullanıldı. “P<0.05” anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmamda, “IBM SPSS Statistics Version 27 bilgisayar programı” kullanılmıştır.

AMH değeri en düşük kontrol grubunda (3 ± 0.08 ng/ml) en yükse ise c vitamini grubundan (4.71 ± 0.06 ng/ml) elde edildi. Gruplar arası farklılıklar anlamlıydı (p<0.005). İkinci en düşük değer sildenafil ® grubuydu (3.47 ± 0.05 ng/ml) fark yine anlamlı olarak bulundu (p<0.05). AMH değeri Sham grubunda ara bir değer olarak hesaplanmıştı (3.90 ± 0.076 ng/ml). İkinci en yüksek değer sildenafil ® ve C vitamini birlikte verilen grupta tespit edildi (4.38 ± 0.02 ng/ml).

Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda ***AMH değeri*** Sham grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Sham grubu, Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda ***AMH değeri*** kontrol grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. Sildenafil ®+C vitamini ve C vitamini grubunda ***AMH değeri*** sildenafil ® grubundan grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti. C vitamini grubunda ***AMH değeri*** Sildenafil ®+C vitamini grubundan grubundan anlamlı (p <0.05) olarak daha yüksekti (Tablo 14-19).

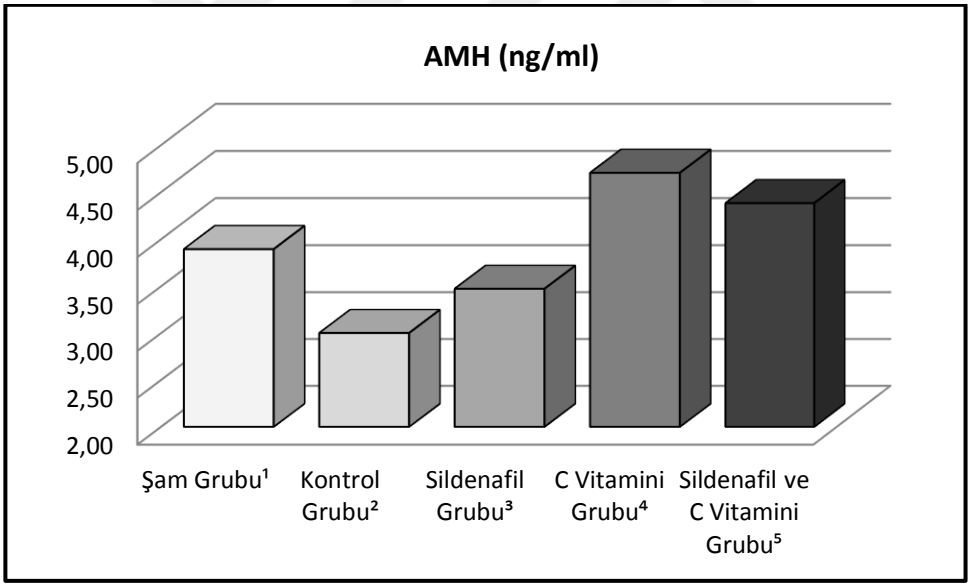
Sakrifiye edilen deneklerden alınan serum örneklerinden yapılan analiz sonucu değerlerinde gruplara dair ortalamalar için AMH değeri en düşük kontrol grubunda (3 ± 0.08 ng/ml) en yükse ise c vitamini grubundan (4.71 ± 0.06 ng/ml) elde edildi (Tablo 14-19).

	AMH (ng/ml)			p	
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s		
Sham Grubu[1]	3,75 - 3,95	3,93	3,90 ± 0.076[2345]		
Kontrol Grubu[2]	2,93 - 3,14	2,98	3,00 ± 0.08[345]		
Sildenafil Grubu[3]	3,39 - 3,53	3,48	3,47 ± 0.05[45]	***0,000***	K
C Vitamini Grubu[4]	4,61 - 4,76	4,72	4,71 ± 0.06[5]		
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	4,35 - 4,41	4,39	4,38 ± 0,02		

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

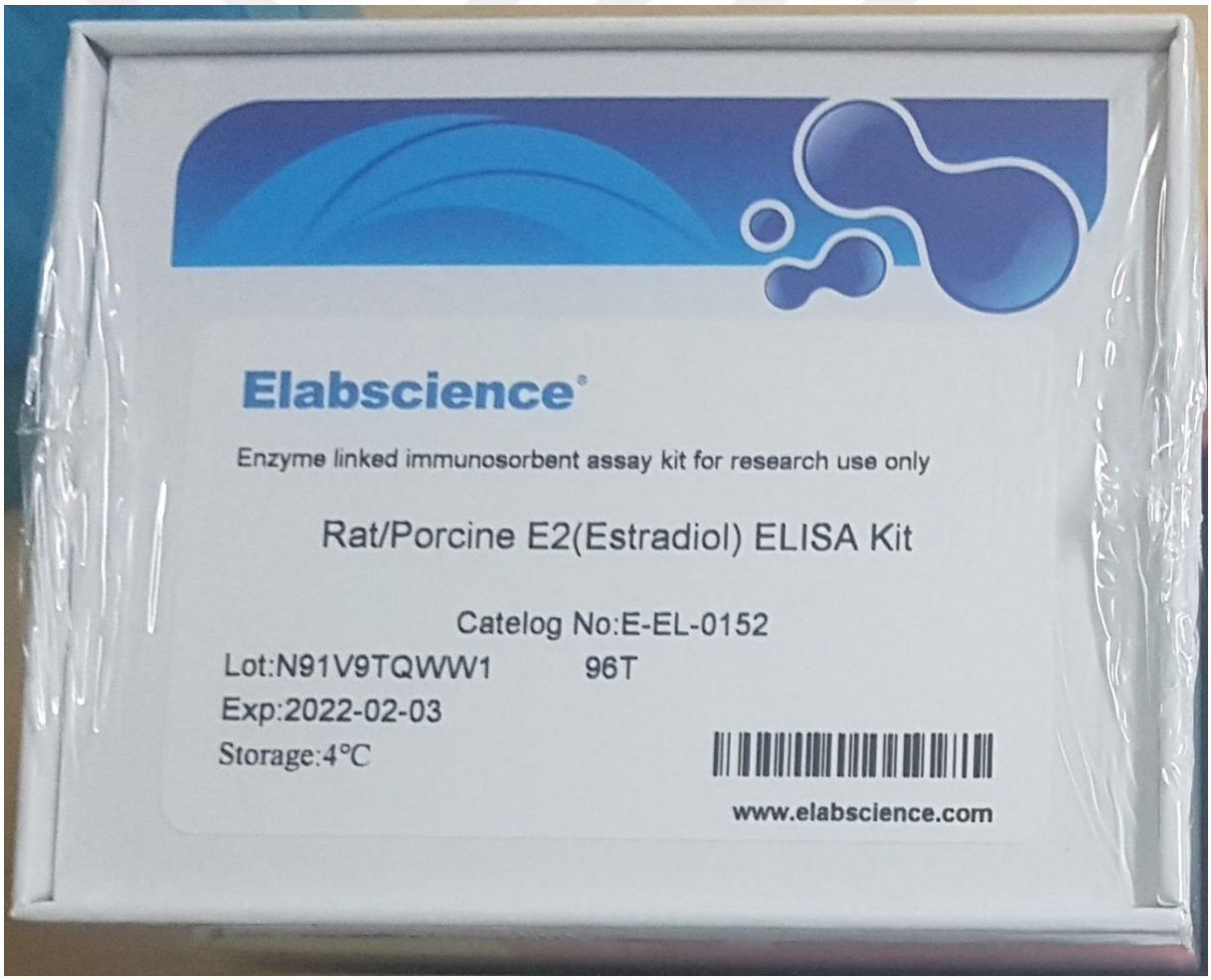
[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-19 Grupların AMH değer ortalamalarını gösterir tablo/grafik.

14.8. Serum Numunelerinden E_2 (Estradiol) Ölçüm Parametresi

Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen yaklaşık 5 ml kan örnekleri dakikada 2000 devir ile 20 dakika santirfüj edildi. En az 1 en çok 3 petri olacak şekilde şekilde -20 C^o de 6 ay saklandı. "FARMASILAB ©" firmasına istenilen analiz kitlerinin gelmesi ile 6 ay sonra analizi yapıldı. Elabscience © firmasının "Rat/Porcine E2(estradiol) ELISA Kit (Cat.No: E-EL-0152)" ile de estradiol (E2) analizi yapılmıştır (Resim 14-8).



Resim 14-8 Elisa analizi için sipariş edilen E_2 kitleridir.

Kitler FARMASILAB © firmasında laboratuvar analizine tabi tutulmuşlardır. Kit, yarışmalı ELISA sistemini (competetive enzyme-linked immunosorbent assay) kullanmaktadır.

Düşük miktardaki enzim absorbansı yüksek miktarda antijenin varlığını göstermektedir (Resim 14-8).

Estradiol için yapılan çalışmada ise gruplar arası fark anlamlıydı ($p<0.05$). En düşük değer kontrol grubunda 1.50 pg/ml (s/d 0.05) tespit edildi. En yüksek değer ise 3.66 pg/ml (± 0,05) olarak sildenafil medikasyonu yapılan grupta tespit edilmiştir. İkinci en yüksek değer sildenafil ve c vitaminin birlikte verildiği grupta 3.52 pg/ml (s/d 0.09) olarak bulundu. Orta değer 3.17 pg/ml (s/d 0.05) ile Sham grubuna ait serum örneklerinden bulundu. C vitamini grubunda E2 değeri ortalaması 2.79 pg/ml (± 0.07) tespit edilmiştir.

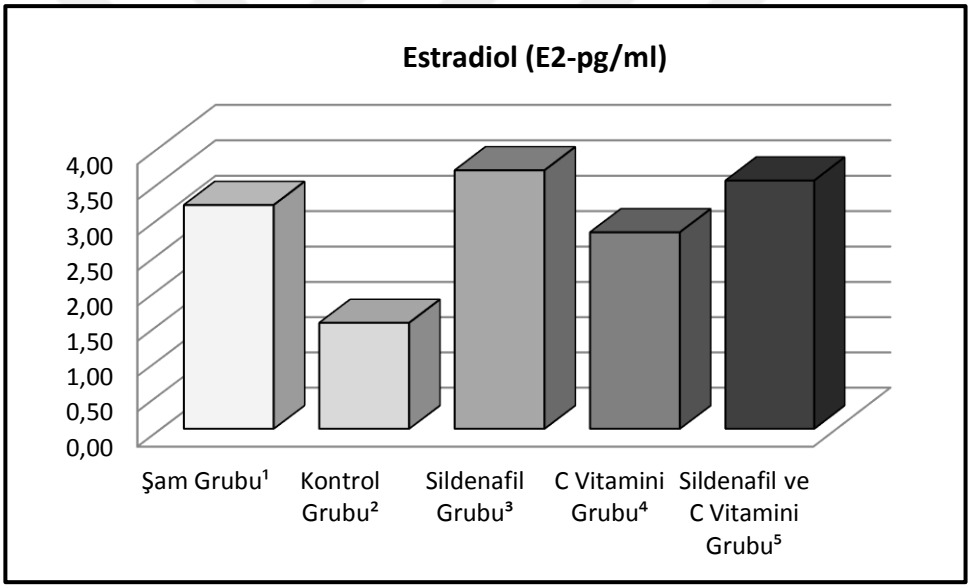
Sildenafil ® grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda ***Estraiol değeri*** Sham grubundan anlamlı ($p <0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubu, Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda ***Estraiol değeri*** kontrol grubundan anlamlı ($p <0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubu, sildenafil ® grubu, Sildenafil ®+C vitamini grubunda ***Estraiol değeri*** c vitamini grubundan anlamlı ($p <0.05$) olarak daha yüksekti. Sildenafil ® grubunda ***Estraiol değeri*** Sildenafil ®+C vitamini grubundan grubundan anlamlı ($p <0.05$) olarak daha yüksekti. (Tablo 14-20)

	Estradiol (E2-pg/ml)			p	
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s		
Sham Grubu[1]	3,10 - 3,25	3,17	3,17 ± 0.05[2345]		
Kontrol Grubu[2]	1,43 - 1,57	1,52	1,50 ± 0.05[345]		
Sildenafil Grubu[3]	3,59 - 3,73	3,68	3,66 ± 0.05[45]	***0,000***	K
C Vitamini Grubu[4]	2,67 - 2,87	2,80	2,79 ± 0.07[5]		
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	3,39 - 3,63	3,52	3,52 ± 0,09		

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

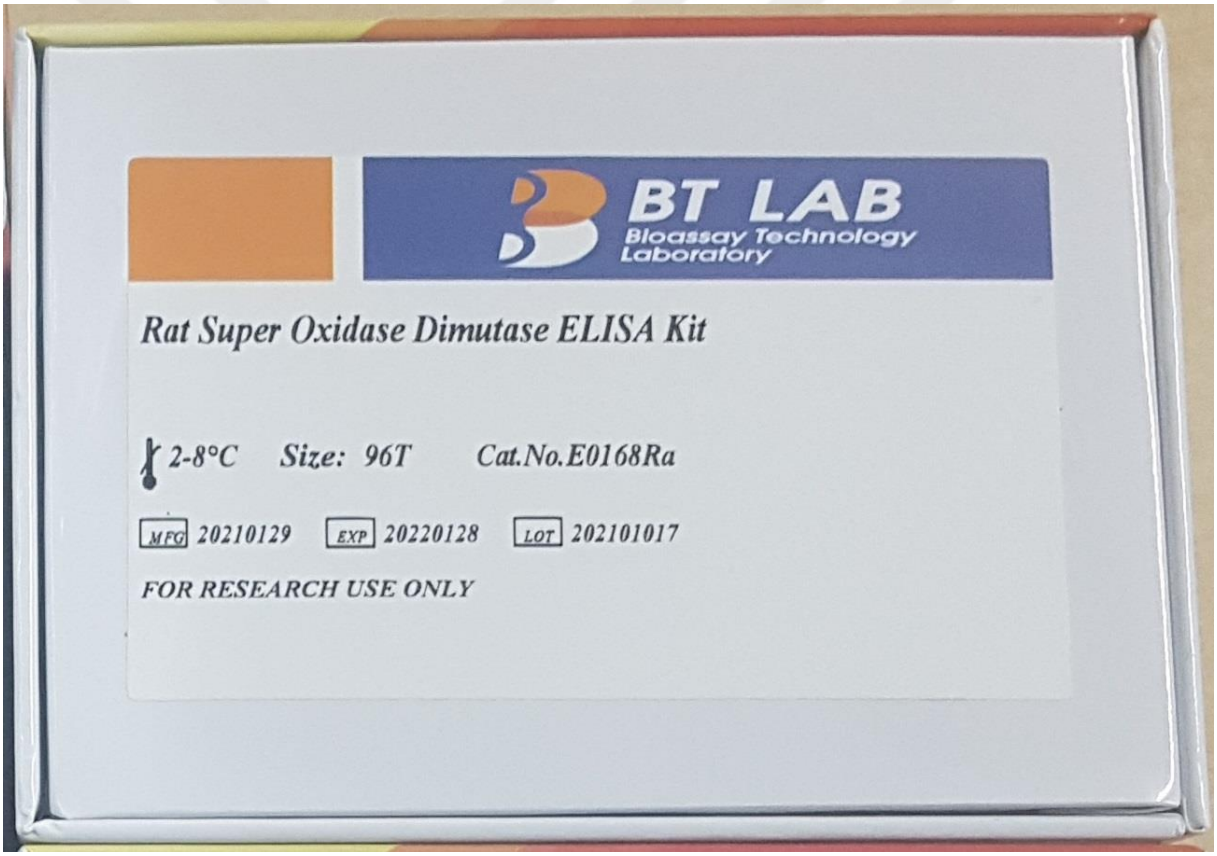
[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-20 Grupların E_2 değer ortalamalarını gösterir tablo/grafik.

14.9. Serum Numunelerinden SOD (Superoksid Dismutaz) Ölçüm Parametresi

Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen yaklaşık 5 ml kan örnekleri dakikada 2000 devir ile 20 dakika santrifüj edildi. En az 1 en çok 3 petri olacak şekilde şekilde -20 C^{o} de 6 ay saklandı. "FARMASILAB ©" firmasına istenilen analiz kitlerinin gelmesi ile 6 ay sonra analizi yapıldı. "BT-LAB ©" firmasına ait "Rat Super Oxidase Dismutase ELISA Kit (Cat.No: E0168Ra)" ile SOD analizi yapılmıştır (Resim 14-9).



Resim 14-9 ELISA için sipariş edilen SOD kitleridir.

Kitler "FARMASILAB ©" firmasında laboratuvar analizine tabi tutulmuşlardır. Kit, yarışmalı ELISA sistemini (competetive enzyme-linked immunosorbent assay) kullanmaktadır. Düşük miktardaki enzim absorbansı yüksek miktarda antijenin varlığını göstermektedir.

Superoksid dismutaz enzim analizi sonuçları şöyle bulundu; en düşük veri Sham grubunda (1.37 ng/ml ± 0.05), sırayla sildenafil ® grubu (1.89 ng/ml ± 0.08), kontrol grubunda (2.30 ng/ml ± 0.08), sildenafil ®+ c grubu (2.30 ng/ml ± 0.05) ve son olarak en yüksek değer de c vitamini grubunda (2.76 ng/ml ± 0.09) elde edilmiştir.

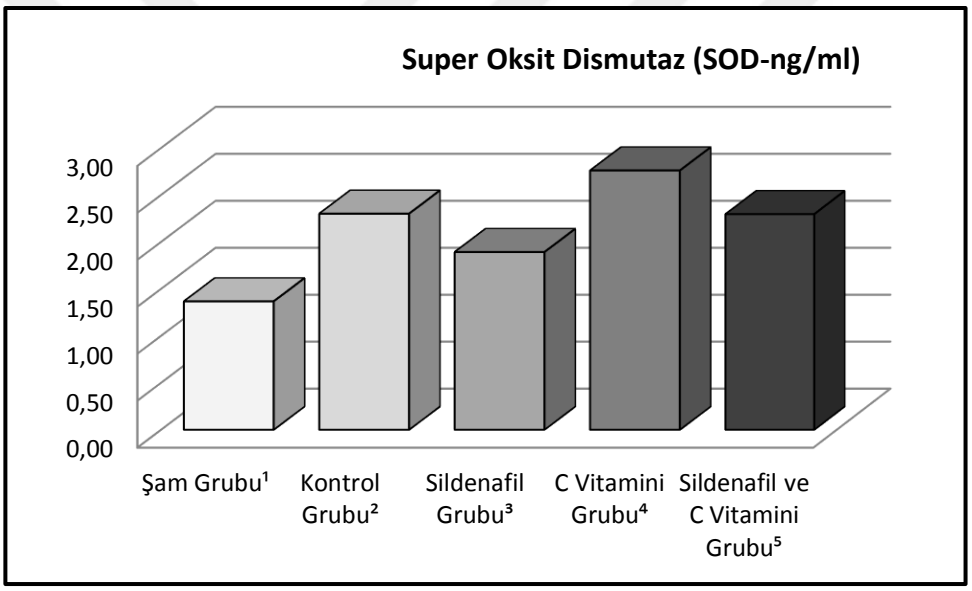
Kontrol grubu, Sildenafil ® grubu, C vitamini grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda ***SOD değeri*** Sham grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. C vitamini grubunda ***SOD değeri*** kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu, C vitamini grubu, Sidenafil ®+C vitamini grubunda ***SOD değeri*** sildenafil ® grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. C vitamini grubunda ***SOD değeri*** Sidenafil ®+C vitamini grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu ve Sildenafil ®+C vitamini grupları arasında ***SOD değeri*** anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 14-21).

	Super Oksit Dismutaz (SOD-ng/ml)			p	
	Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s		
Sham Grubu[1]	1,27 - 1,42	1,38	1,37 ± 0.05[2345]		
Kontrol Grubu[2]	2,18 - 2,41	2,32	2,30 ± 0.08[34]		
Sildenafil Grubu[3]	1,77 - 2,01	1,89	1,89 ± 0.08[45]	***0,000***	K
C Vitamini Grubu[4]	2,66 - 2,92	2,74	2,76 ± 0.09[5]		
Sildenafil ve C Vitamini Grubu[5]	2,24 - 2,37	2,30	2,30 ± 0,05		

[K] Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)

[2] Kontrol Grubu ile fark $p < 0.05$/ [3] Sildenafil Grubu ile fark $p < 0.05$

[4] C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$/ [5] Sildenafil ve C Vitamini Grubu ile fark $p < 0.05$



Tablo 14-21 Grupların SOD değer ortalamalarını gösterir tablo/grafik.

15. TARTIŞMA

Çalışmamızda otolog over transplantasyonunda c vitamini ve sildenafil ® kullanımının over rezervi üzerine etkisini analiz ettik.

Otolog over transplantasonu ile deneyimlemek istediğimiz konu çeşitli nedenlerle over dokusunun vitrifikasyon veya fresh transplantasyonu sonrası mümkün olduğunca over rezervinin korunmasıdır. Bu sebeple bugüne kadar birçok medikal ajan ve yöntem denenmiş over rezervinin muhafaza edilmesinde elde edilen başarı oranları sınırlı kalmıştır.

Over, türlü sebeplerle günümüzde dondurulup (vitrifikasyon) ilerideki bir dönemde kullanılmak üzere saklanmaktadır. Bu sebeplerin arasında özellikle çocukluk çağı kanserleri ve ileri yaş gebelik beklentisi önemli yer tutmaktadır[9]. Ancak, vitrifiye edilen over dokusunun retransplantasyonunda beklenen güçlüklerin başında transfer edilen dokunun histolojik düzeyde etkilenmesinden kaynaklı rezidü folikül kayıplarıdır. Zira foliküller rezerv kaybı ile overyan dokunun fonksiyonel başarısı son derece ilişkilidir. Transfer edilen dokuda ne denli fazla foliküller rezerv korunabilirse otoretransplantasyon ile elde edilmek istenen reprodüksiyon başarısı da o derece yüksek olacaktır. Çalışmalar göstermektedir ki otoretransplantasyon sonrası transfer edilen doku ile ilgili %50-90 arası bir folikül rezerv kaybı yaşanmaktadır [14].

Günümüzde özellikle çocukluk çağı kanserlerinde elde edilen remisyon ve tedavi başarısı sayesinde hastaların gelecek yaşam standartlarının da yükseltilmesi zorunlu hale gelmiştir. Üreme çağına gelen tedavi edilmiş çocukluk çağı kanser hastalarında üreme oldukça önemli bir sorun haline gelmiştir. Bununla birlikte düzenli adet görememe ve menapoz yaşının iatrojenik overyan yetmezlik nedeniyle erken olması bu kadınlar için önemli bir sağlık sorunu olarak karşımızda durmaktadır [6]. Ovaryan doku transplantasyonu, geçmişte vitrifiye edilmiş veya dondurulmuş over dokusu retransplantasyonu ile günümüzde 360 hastadan fazla kişiye tedavi protokolü uygulanmıştır. Bu hastalardan iki yüzden fazlasında canlı doğum sayısı yakalanmış olsa da otolog retransplantasyonlarda başarı oranlarının artırılması ve ovaryan rezervin korunması hala çözümlenmesi gereken ciddi bir sorundur [83, 93].

Literatürde bu konu ile ilgili önemli çalışmalar da vardır. C vitamininin ve antioksidan olarak kullanılan birkaç molekülün bu çalışmalarda yardımcı molekül olarak tedaviye eklenmesi araştırılmış, rezervin korunmasında etkinlikleri anlamlı bulunmuştur[16].

Biz çalışmamızda daha önceki benzer çalışmalarda overyan rezervin korunmasında etkinlik açısından anlamlı sonuçlar elde edilen C vitamini etkinliği ile sildenafil ® molekülünün etkinliği kıyaslamasını yaptık.

Sidenafil, Fosfodiesteraz 5 (PDE5) enziminin inhibitörüdür. Nitrik oksit (NO) üzerinden etki gösterir. Arteriyollerde vazodilatasyon, venüllerde ise vazokonstrüksiyona neden olur. Bunun sonucunda doku kanlanmasını artırmaktadır. NO, nitrik Oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile O_2 ve NADPH'nın katalizlediği bir reaksiyon sonucu L-Arjinin'den sentezlenmektedir. NOS enziminin 3 formu tanımlanmıştır. NOS1; nöronal NOS (nNOS) olarak bilinir ve sinir sisteminde etkinliği gösterilmiştir. NOS2; indüklenebilir NOS (iNOS). Son olarak NOS3; endotelial NOS (eNOS) damar endoteli içinde bolca bulunur ve etkisini vasküler yatakta gösterir. NO, guanilat siklaz (cGC) aktivitesi ile hücre membranından GTP (Guanozin tri fosfat) molekülünden cGMP (siklik guanozin mono fosfat) sentezini indükler. Sonuçta oluşan cGMP, cGMP bağımlı protein kinaz aktivitesini başlatır. Bu kinaz enzimleri sekresyon, düz kas hücreleri gevşemesi, endotel permeabilite artışları, trombosit inhibisyonu, gen transkripsiyonları gibi aktiviteleri başlatacaktır. cGMP, molekülü endotelde bulunan PDE5 enzimi aracılığı ile hızlıca GTP'ye dönüştürülür ve etkinliği sonlandırılır. cGMP, PDE5 enzimi sayesinde yarılanma ömrü oldukça kısa bir moleküldür. Sildenafil ®, tadalafil®, verdanafil® gibi PDE5 selektif enzim inhibitörleri, etki ettikleri bölgelerde cGMP yıkımını azaltarak daha fazla süre ile etki göstermesini sağlamaktadırlar. Bu sayede cGMP bağımlı kinaz proteinleri daha uzun süre etki gösterebilmektedirler [94]. Arteriyollerde vazodilatasyon yaparken, venüllerde vazokonstrüksiyon oluşturur, platelet inhibisyonu yaparken, sekretuar etki ile birtakım doku koruyucu moleküllerin üretimini artırmaktadır.

Literatürde erektil disfonksiyon tedavisi için kullanılmaya başlayan ve zamanla kardiyovasküler sistem ve psikiyatri alanlarında kendine uygulama alanı bulan "sildenafil ®" günümüzde plastik cerrahi, organ transplantasyonu ve jinekoloji alanlarında da sınanan bir molekül haline getirmiştir. Biz de çalışmamızda sildenafilin ® ototransplantasyon sonrası doku

iskemisini en az süreye indirecek etkinliği göstermesini ve transfer edilen dokunun transfer edilen bölgeye daha hızla uyum sağlamasını deneyimledik [21, 95-99].

C vitamini güçlü bir antioksidandır. Hücre membran ve organellerine hızla zarar veren bu sayede etkilenen hücreler için apopitoz süreçlerini başlatan serbest radikal etkisini ortadan kaldıran güçlü bir ajandır [16].

Doku transplantasyonu sonrası transfer edilen dokunun reperfüzyonu sağlanıncaya kadar ortaya çıkması beklenen en önemli sorun iskemi ve sonrasında perfüzyon sağlanınca da reperfüzyon hasarının oluşması olacaktır [100]. C vitamini güçlü bir antioksidan olduğu için, bu olumsuz durumun neden olduğu hasarın önlenmesi konulu çalışmalar yapılmış ve foliküller sağkalımı artırmada etkinliğinin olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur [16, 88, 89].

İskemi-reperfüzyon olaylarında ortaya çıkacak olan serbest oksijen radikalleri; hidroksil (OH^{*}) iyonu, süperoksit ($O_2^{*\sim}$), peroksil (ROO^{*}), alkoksil (RO^{*}) [101]. C vitamini, süperoksit radikalleriyle reaksiyona girer ve onları redükte eder.Serbest radikallerin hücre membranları üzerine yapacağı lipid peroksidasyonu gibi hasarlara engel olur. C vitamini, tromboksan sentezini azaltır, prostasiklin sentezini artırır. Bu sayede vazodilatasyon sağlar, nötrofil göçünü ve trombosit agregasyonunu engeller [16, 102].

Çalışmamızda otolog subkutan over transplantasyonunda ilk kez denen molekül olan sildenafil ® ‘in etkinliğine daitr daha önceden çalışılmış olan başka bir molekül olan C vitamini ile kıyaslanması da yapılmıştır.

Biz çalışmamızda Sham grubuna ve kontrol grubuna herhangi bir medikasyon yapmadık. Over rezervi açısından normal değerlerin, sadece cerrahi ve bakım stres faktörüne maruz bırakılan ratlardan elde etmeyi amaçladık. Bu grupta over transplantasyonu yapmadığımız gibi ilk cerrahi sonrası bakımda postop genel bakım harici medikasyon da yapılmamıştır.

Kontrol grubunda sadece cerrahi işlem uygulanmış olup postop medikasyonun over rezervi açısından herhangi bir koruyucu etkisine maruz bırakılmamışlardır. Yirmi bir gün süreyle sadece bakım stres faktörü eşit olsun diye gavaj yapılmış ve tıpkı Sham grubu gibi ilaç uygulaması yapılmamıştır.

Sildenafil ® grubunda birinci cerrahi prosedür uygulanıp postop genel bakım harici 20 gün süreyle 15 mg/kg/gün günde iki kerede gavaj yoluyla oral medikasyonu sağlanmış olup 21. gün deneklerden numuneler alınmak üzere sakrifikasyon işlemi yapılmıştır.

C vitamini grubunda yine ilk cerrahi presedür operasyonunun ardından 20 gün süreyle 500 mg/kg/gün po gavaj yoluyla medikasyon işlemi uygulanmıştır.

Çalışmamızda, c vitamini ile sildenafil ® verdiğimizde elde edilen sonuçları da deneyimledik. Bu medikasyon işlemi grup 5 olarak belirlendi.

Biz rezerv tayini yaparken birçok parametre kullandık. Denek ağırlıklarını, sağ ve sol over ağırlıklarını toplam over ağırlıklarını kaydettik. "Primordiyal folikül", "primer folikül", "antral folikül", "graf folikül", "toplam folikül miktarı", "korpus albikans", "korpus luteum", "toplam korpus yapıları" gibi histolojik incelemelerin yanı sıra, "FSH", "AMH", "E_2", "SOD" gibi laboratuvar parametrelerini de kullandık. Tüm bu verilerle birlikte rezidü over dokusu analiz edilmiş ve grup içi ortalamaları alınarak kıyaslama yapılmıştır. Sonuçta analiz ettiğimiz molekülün etkinliğini deneyimlemiş olduk.

Denek ağırlıkları ve over ağırlıkları ile ilgili korelasyon elde edemedik. Zira tüm deneklerin ağırlıkları minimum 250-310 gr arasında olup gruplar arasından farklılık tespit edilmedi. Over ağırlıkları açısından inflamasyonun ve dolayısıyla granülasyon dokusunun fazlalığı nedeniyle makroskobik olarak ayıklama yapılmış olup özellikle sildenafil ® ve c vitamini uygulanan grupta en yüksek ortalama tespit edildi. Bu grupta ve diğerlerinde debridman yapılırken over dokusu kaybından endişesiyle aşırı yıkama işleminden kaçınılmıştır. En düşük ortalama kontrol grubundan elde edilmiş olup grup ortalaması 657,5 mg (±139,8) olarak hesaplanmıştır. Over ağırlıkları, folikül sayıları ve laboratuvar parametreleri arasında spearman korelasyon analizine göre korelasyon gösterilememiştir ($p>0,05$).

Primordiyal folikül açısından en yüksek sayı ortalamaları Sham grubunda (14,7 adet ±1,63), ikinci veri sildenafil ® ve c vitamininin birlikte verildiği grupta (11,50 adet ±2,43), üçüncü ortalama c vitamininin verildiği grupta, dördüncü sırada sildenafil ® verilen grupta ve en az primordial folikül sayı ortalaması kontrol grubunda (3 adet ±1,26) olarak gözlenmiştir. Primordial folikül baz alınarak yapılan analizde medikasyon yapılmayan grupta %80 e varan bir rezerv kaybı yaşanmışken, sildenafil ® + c vitamini birlikte verilmesiyle bu kayıp sadece

%21 civarında kalmıştır. Başka açıdan bakıldığında rezervin %79'unun korunduğunu söyleyebiliriz.

Primer foliküller açısından da durum benzerdir. En yüksek ortalama Sham grubunda (27 adet ±2,75), sırasıyla sildenafil ® + c vitamini grubu (21,67 adet ±1,51), c vitamini, sildenafil ® gruplarında sayıldı. Kontrol grubunun primordial folikül sayım ortalaması 2,50 adet ±1,04 olarak tayin edildi. Bu durumda herhangi bir medikasyonun yapılmaması durumunda primordial folikül açısından rezervin %90 ından fazlası kaybedilmekteyken, sildenafil ® ve c vitamininin birlikte verildiği beşinci gruptaki kayıp sadece %19 ile sınırlı kalmıştır. Primer folikül açısından rezervin %80 inden fazlası korunduğunu söyleyebiliriz. Sildenafilin ® yalnız verildiği gruptaki kayıp %53 olarak tespit edilmiştir.

Ovaryan rezev belirlemede daha az etkili ancak retransplante over fonksiyonu değerlendirmesi açısından önem arzeden antral folikül ve graf folikül açısından durum şöyledir.

Antral foliküllerde Sham grubuna kıyasla kontrol grubunda %85 lik ortalama bir kayıp yaşanmışken, sildenafil ® verilen gruptaki bu kayıp %30 dan azdı. Her iki medikasyonun ilave edildiği beşinci gruptaki kayıp sadece %17 ile sınırlı kalmıştır.

Graf folikül açısından da durum benzerdir. Kontrol grubunda 5 adet (±1,41) ortalama graf folikül sayılmışken kontrol grubunda ortalama 1 adet (±0,63) graf folikül gözlenmiştir. Kayıp yaklaşık %80 civarındadır. Oysa sildenafil ® verilen grupta bu kayıp %36 civarındayken hem sildenafil ® hem de c vitaminin birlikte verildiği beşinci gruptaki ortalama graf folikül kaybı %4 ün altındadır. Yani transplantasyon sonrası graf folikül açısından overler neredeyse tama yakın fonksiyon göstermekteydiler.

Toplam olarak tüm folikül yapıları değerlendirildiğinde, Sham grubu ortalaması 54,50 adet (±5,08) olmaktaydı. Oysa kontrol grubunda tüm folikül sayıları toplamı ortalaması 7,67 adet (±1,86) olarak hesaplanmıştır. Tüm folikül rezerv ortalaması açısından kaybın %86 civarındaydı. Sildenafil ® verilen grupta bu kayıp %47, c vitamini verilen grupta bu kayıp %42, hem c vitamininin hem de sildenafil ® birlikte verildiği grupta ise rezerv kaybının %18 ile sınırlı kaldığını tespit ettik.

Korpus sayıları açısından durum folikül sayılarına benzemektedir.

Korpus luteum açısından kontrol grubunda %80 az sayı ortalaması elde edilmiştir. C vitamini verilen grupta sayı ortalaması kaybı %56, sildenafil ® sadece verilende ise %44 daha az sayı ortalamasını elde ettik. Her iki tedaviyi birlikte uyguladığımız beşinci gruptaki korpus luteum ortalaması kaybını %36 olarak saptadık.

Korpus albikans açısından kontrol grubunda 4,67 adet (±2,16) ortalama elde ettik. Bu ortalamaya göre kontrol grubundaki düşüş %86, c vitaminin birlikte verildiği gruptaki ortalama azalması %72, sildenafil ® verilen gruptaki korpus albikans sayı ortalamalarındaki azalma %57 iken sildenafil ® ve c vitamininin birlikte verildiği gruptaki korpus albikans sayı ortalamaları düşüşü sadece %46 olarak saptanmıştır.

Sonuçta tüm korpus sayıları arasında kontrol grubu ortalaması %82 oranında düşerken, c vitamini için bu düşüş %62, sildenafilin ® yalnız verildiği gruptaki azalma %50, her iki medikasyonun uygulandığı gruptaki korpus azalması ise sadece %40 idi.

Çalışmamda yaptığım spermanın korelasyon analizine göre denek ağırlıkları ve over ağırlıklarının patolojik verilerle kıyaslandığında korelasyon gösterilememişken ($p>0,05$), primordial folikül sayıları, primer folikül sayıları, antral folikül sayıları, graf folikül sayıları, toplam folikül sayıları, korpus albikans sayıları, korpus luteum ve toplam korpus sayıları arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir ($p<0,05$).

Çalışmamdaki patoloji verilerine göre over rezervi korunmasında sildenafil ® ve c vitamininin birbiriyle kıyaslanmasında tüm parametreler açısından aralarında anlamlı bir fark bulunamamışken ($p>0,05$) (Kruskal-wallis, mann-whitney u test), her iki ilacın birlikte uygulandığı beşinci grup ile aralarında anlamlı fark vardı ($p<0,05$). Aynı şekilde kontrol grubu verileri de tüm gruplardan anlamlı derecede düşük olarak hesaplandı ($p<0,05$).

Patoloji verileri açısından kıyaslandığında sildenafil ® ve c vitamini uygulaması arasında fark yokken, her iki medikasyonun yapılmasıyla over rezervinin neredeyse %90 ına yakınının korunduğu anlaşılmaktadır. Her iki medikasyonun birlikte yapılması ile ayrı ayrı yapılması açısından fark da anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Kruskal-wallis, mann-whitney u test).

Sapmaz ve arkadaşlarının [16] yaptığı çalışmada otolog over transplantasyonunda c vitamininin e vitaminine kıyasla over rezervini korunmasında daha etkili olduğunu göstermişlerdi. Bu sayede bizim bulgularımızla elde ettiğimiz sonuçların söz konusu çalışmayla örtüştüğünü söylemekteyiz. Bununla birlikte sildenafil ® molekülünün test edildiği bir çok çalışmada gerek transplante dokuların korunması [95, 99, 103] gerek iskemi reperfüzyon hasarlarının önlenmesinde [21, 98, 104, 105], gerekse de AMH düzeyine olan katkıları [18] ile ilgili benzer sonuçlar bulmuşlardı. Bu çalışmalarla da bizim verilerimiz örtüşmektedir.

Çalışmamızda doku iskemisini ölçmedik. Bunun için hem doku hem plazma MDA düzeyleri ile ilgili ek analiz gerektirmekteydi. Amacımız hem patolojik hem de laboratuvar verileri ile ovaryan rezerv konusunda fikir sahibi olabilmekti. Ancak çalışmamıza doku iskemisini de dahil etmememiz bir eksiklik olarak değerlendirilebilir. Böyle bir analiz için ek maliyet ve zaman kaybından kaçındık.

Doku iskemisi ve sonrasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ilk önce süperoksit dismutaz (SOD) daha sonra da katalaz ve beraberinde gulutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından bertaraf edilir. Herhangi bir sebeple artmış radikallerin durumunda bu mekanizmalar hızlıca tüketilir. Sonuçta yetmezlik oluştukça iskemiye ve sonrasında reperfüzyona bağlı hücre membranları başta olmak üzere birçok hücre içi yapılar zarar görmeye başlar. Sonuçta hücreler parçalanır dokuda nekroz ortaya çıkar. Ovaryan rezerv tüketilmesinde bu hasarın daha çok büyümeye başlayan hücreler olan başlıca granülosa hücrelerinde gözlenmeye başlamaktadır. Zarar görmüş granülosa hücreleri ile çevrilmiş foliküller yapılar dejenere olur ve atrofik yapılar halini alırlar [22]. Doku kanlanmasını hızlıca yerine koyabilmek için kullanılan bir yöntem olarak doku kalınlığının azaltılmasıyla over rezervinin daha iyi korunduğu araştırılmıştır [106-108]. Sildenafil ® molekülünün NO üzerinden etki göstererek cGMP üretilmektedir. cGMP yi dokuda ve endotel düzeyinde tekrar GTP (guanozin tri fosfat) dönüşümünü sağlayan fosfodiesteraz 5 enzimini inhibe eden molekül olarak sildenafil ® ortamda hızlıca GTP ye dönüşecek olan cGMP nin daha uzun süre etki göstermesini sağlamaktadır. cGMP, Protein kinazları aktifleyerek arteriol dilatasyonu ve venül daralması yapar, bu sayede doku perfüzyonunu artırır. Transplante dokuya giden kan akımının artması sayesinde yine hızlıca perfüzyonun onarılması etkisini göstermektedir [94]. Çalışmamız göstermiştir ki sonuçta bu her iki molekülün bir arada kullanılması sayesinde olumlu yöndeki etkileri potansiyelize olmuştur.

Bu sayede Sham grubuna en yakın veriler beşinci grup olan her iki molekülün birlikte verilmesiyle elde edilmiştir.

Laboratuvara iletilen serum örnekleri en son grup sakrifiye edildikten 6 ay sonra elisa çalışma kitlerinin gelmesiyle analiz edilebilmiştir.

FSH, gonadotropik bir hormondur ve hipotalamus kaynaklı GnRH uyarısı ile hipofiz bezinden üretilir. Etkisini gonadlardaki folikül hücreleri üzerinde gösterir. Glukoprotein yapılı bu hormonun reseptörleri granüloza hücre zarı üzerindedir. Granüloza hücrelerinin büyüme ve farklılaşması yönünde etki gösterir [25]. Bu sayede büyüyen ve gelişen granüloza hücrelerinden salgılanan inhibitör etki gösteren inhibin b (I-b), FSH miktarını azaltıcı etki ile folikül seçimini gerçekleştirir. Hangi mekanizmalarla foliküllerin gelişme komutu alarak farklılaştıklarını açıklayıcı mekanizmalar henüz tam olarak ortaya konulmasa da over dokusu üzerindeki travma ve meydana gelen inflamasyon süreçlerinin foliküllerin önemli bir kısmında aktive olması yönünde etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Buna burn-out etki denmektedir [22]. Sonuçta folikülogenezin erken dönemlerinde maksimum olan FSH miktarı çoğalan folikül sayısına bağlı olarak artan I-b düzeyleri ile ilişkili serum seviyesi azalmaktadır.

Biz çalışmamızda folikül rezervi saptamak açısından fikir vermesi için ratlarda aynı östrus döneminde serum FSH tayini yaptık.

Buna göre yaptığımız analizde en yüksek FSH seviyesi ortalaması 6,05 mIU/ml ile c vitamini grubundan elde ettiğimiz serum örneklerdeydi. Sırayla kontrol grubundan 5,78 mIU/ml, 5,32 mIU/ml ile sildenafil ® + c vitamini ve aynı değerde Sham grubu serum örnekleri ortalaması ile son olarak en az düzeyi 5,02 mIU/ml ile sildenafil ® grubu örnek ortalamasında tespit ettik. Sham grubu ile sildenafil ® + c vitamininin birlikte verildiği grup arasında fark anlamlı değilken ($p>0,05$) diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Transplantasyon sonrası burn out etki ile sağ kalan çok fazla miktarda folikülün gelişmeye yönlendiğini varsaydığımızda sildenafil ® grubunda en az düzeyde FSH saptanmasını açıklayabiliriz. C vitamini bu burn out etkiyi kısmen azaltmış, gelişmeye çalışan foliküllerden daha az oranda I-b salgılanması sayesinde FSH miktarı daha yavaş baskı altına

alınabilmiştir. Zira en yüksek FSH düzeyini c vitamini uygulanan gruptan elde ettik. Sildenafil ® uygulaması FSH miktarını azaltıcı yönde etki gösterdiğini tespit ettik.

Anti müllerian hormon (AMH), kadın reprodüksiyonunda inhibitör etki gösteren transforming growth faktör β (TGF-β) ailesine ait bir glikopeptit yapıda hormondur. Erkek fetüs farklılaşmasında anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Ancak dişi gonad yapısından da sentezlendiği gösterilmiştir. Özellikle primordial foliküllerden sentezlenen bu hormon, over rezervi belirlenmesinde en değerli parametre olarak gösterilmiştir [109]. AMH saptanmasından önceki dönemlerde FSH için over rezervini en iyi gösteren parametre olarak gösteriliyordu. Erken foliküller fazda bakılan FSH, I-b, E_2, ovaryan rezerv bakılması için önemli parametrelerdi. Ovaryan yaşlanma ve rezerv düşüklüğü ile I-b, E2 seviyeleri düşerken, FSH miktarı artmaktaydı. Bunu daha az folikül hücresi ve hipotalamo hipofizer aksın azalan over rezervine cevaben daha çok sitimülan hormon salgılaması şeklinde yorumlamak doğru olacaktır. Ancak bu moleküller anlaşılacağı üzere hipotalamohipofizer aksın sağlıklı çalışmasına ve dönemsel olarak alınan cevaba göre değişken karakter taşımaktaydılar. Böylece rezerv konusunda standart veri sunmamaktaydılar [75]. AMH düzeyi, östrus siklus, gebelik durumu, emosyonel durumlar gibi değişkenlerden bağımsız olarak folikül havuzunu gösteren en ideal parametre olduğu gösterilmiştir [110].

Çalışmamızda AMH düzeyleri açısından da patolojik bulguları destekleyen kanıtlara ulaştık. Şöyle ki;

AMH düzeyi ortalamasını en düşük kontrol grubunda tespit ettik (3,0 ng/ml ± 0,08). Bu durum bize azalmış over rezervini net olarak göstermekteydi. Sidenafil grubunda 3,47 ng/ml (±0,05) yine bize hızlıca rezervin tüketildiğini göstermekteydi. Sham grubu verisi ara bir değer olarak karşımıza çıktı; 3,90 ng/ml (±0,076). Bize ortalama değer vermesi anlamlıydı çünkü rezervin korunma sırasında zamana yayılan aktiflenmiş primordial hücrelerin bazal düzeyini saptamamızı sağladı. Zira c vitamininin etkisiyle sildenafil ® ile dengelenerek ikinci en yüksek değeri vermiştir (4,38 ng/ml ±0,02). En anlamlı sonucu aktif halde rezervin korunduğu ve primordial foliküllerin en çok üretken olduğu c vitamini uygulanan grup verisiydi; 4,71 ng/ml (±0,06).

AMH, tek sıralı yassı granülosa hücreleri ile çevrilmiş oositlerin FSH etkisine cevaben kuboid yapıya dönüşerek tek sıralı kübik granülosa ile çevrilmiş profaz 1 safhasında bekleyen

oositin varlığını en net şekilde göstermiştir. Antral öncesi granülosa hücrelerinden sentezlenen AMH, rezervin tüketileceği ana kadar azalacak ve rezervin tüketilmesiyle birlikte seviyesi neredeyse tamamen ortadan kalkacaktır. Bu durumda rezervin en çok düştüğünü histolojik çalışmayla gösterdiğimiz kontrol grubundaki en düşük veriyi elde etmemiz çalışmamızdaki en değerli bulgumuz olmuştur.

AMH öncesi dönemde ovaryan rezerv tayini yaparken başvurduğumuz bir başka parametre olan E_2 açısından da durum pek farklı değildir. Estradiol, gelişen granülosa hücrelerinden folikül içi ortama salınmaktadır. Buradan bazal lamina aracılığı ile kana geçen E_2 belirli ve kritik bir düzeye kadar, tıpkı Inhibin-B ve AMH gibi negatif feedback ile hipotalamus üzerinde baskılayıcı rol üstlenir. FSH sentezini azaltacaktır. Sonuçta foliküller fazın ilerleyen safhalarına kadar düzeyi gitgide artacak, ovulasyonla birlikte maksimum değere ulaşacaktır.

Biz vajinal sitoloji ile östrojen hakimiyetinin baskın olduğu östrus fazındaki deneklerimizden elde ettiğimiz serum örneklerini analiz ettik. Sonuçta saptadığımız E_2 seviyeleri bizim için anlamlıydı.

E_2 serum düzeyini en çok sildenafil ® grubundan elde ettik (3,66 pg/ml ±0,05). İstatistiksel olarak aralarındaki farkı ispatlayamadığımız sildenafil ® + c vitamini grubunda ikinci en yüksek değer olan 3,52 pg/ml (±0,09) tespit ettik. Folikül aktivasyonunun en çok bu gruplarda olduğunu söyleyebiliriz. İlginç olan ise Sham grubundan elde ettiğimiz ara değerdi (3,17 pg/ml ±0,05). C vitamini grubunda ikinci en düşük değer olan 2,79 pg/ml (±0,07) ölçümledik. E_2 düzeyi en düşük olan grup beklediğimiz üzere kontrol grubuydu (1,50 pg/ml ±0,05).

E_2 serum seviyeleri bize gelişmekte olan foliküllerdeki granüloza hücre yapılarındaki aktiviteyi göstermektedir. Sildenafil ® ve sildenafil ® ile c vitamini verdiğimiz gruptaki yüksek saptadığımız serum E_2 düzey ortalaması fazlalığı istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Ancak bu iki grup arasındaki fark da istatistiksel olarak sildenafil ® lehine anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

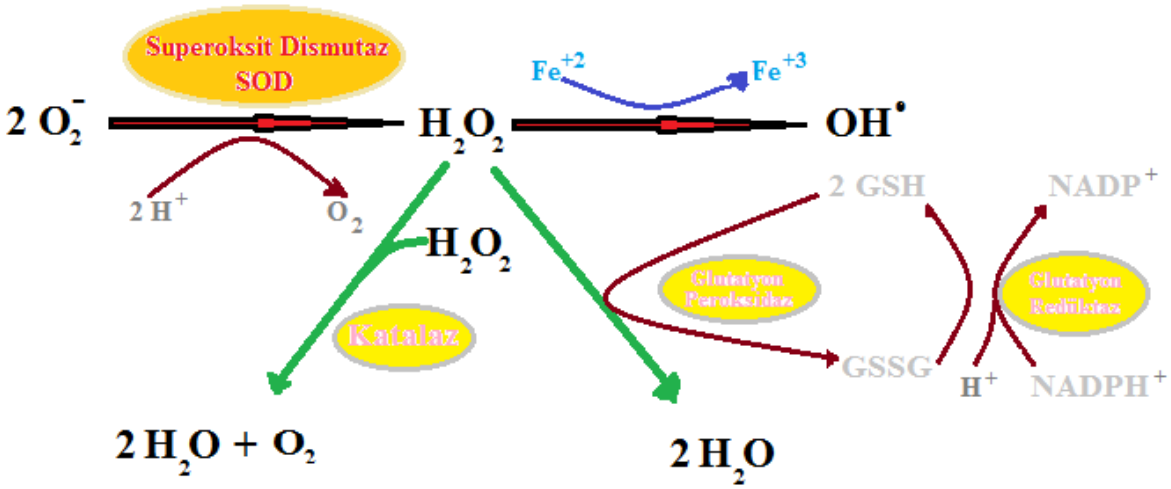
SOD (superoksit dismutaz) enzimi, serbest oksijen radikallerinin ortamdan uzaklaştırılması için tepkimeye giren son derece kritik öneme sahip bir enzimdir (Resim 15-1).

Oluşan oksijen radikalleri daha hemen SOD ile tepkimeye girerek hidrojen peroksit (H_2O_2) oluştururlar. Daha sonra bir dizi yine bu görece daha az toksik moleküller katalazi glutatyon peroksidaz, ve glutatyon redüktaz enzimleri aracılığı ile su gibi yaşamsal moleküllere kadar bu radikalleri detoksifiye edeceklerdir. Ancak burada en kritik basamak $O_2^{\sim}$ gibi oksijen radikallerinin hidrojen perokside dönüştürülmesidir. Bu basamağın anahtar enzimi SOD, eritrositlerde bolca bulunmaktadır. Aynı zamanda serum içinde, interstisyel boşlukta ve diğer hücre yapılarında da bulunmaktadır. SOD, ihtiyaç olduğu taktirde hızla miktarını artırarak mevcut radikallerin dönüşümlerini katalizler. Bununla birlikte iskemi / reperfüzyon hasarı sırasındaortamda bulunan bolca radikal daha ilk basamakta bu enzim tarafından hidrojen peroksite dönüştürülecektir. Ortamda bulunan c vitamini ve diğer antioksidan moleküller bu hayati öneme sahip enzim miktarını pozitif yönde etkilerler. Daha çok antioksidan madde varlığında miktarı çoğalır.

Bizim çalışmamızda ortamdaki c vitamini antioksidan olarak daha ilk basamakta oksijen radikallerini uzaklaştırmaya başlamaktadır. Bu sayede SOD miktarı ortamda fazlaca bulunmasını beklemekteydik.

C vitamini ve otolog over transplantasyonu ile ilgili çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir [16].

Çalışmamızda deneklere ait serum örneklerindeki SOD ortalamalarında en yüksek değeri beklediğimiz üzere sadece c vitamini verdiğimiz grupta elde ettik (2,76 ng/ml ±0,09). Daha sonraki en yakın değer olan beşinci grup sildenafil ® +c vitamini verilen grupta 2,30 ng/ml (±0,05) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bu değer kontrol grubundaki değerle aynıdır (±0,08). Her iki durum da sildenafil ® in tek başına verildiği grup olan üçüncü gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (1,89 ng/ml ±0,08) ($p<0,005$). En düşük değeri beklediğimiz üzere Sham grubundan elde ettik (1,37 ng/ml ±0,05).



Resim 15-1 Ortamdan oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasını gösterir şema.

Superoksit Dismutaz (SOD) enzimi oksijen radikallerini hidrojen peroksit üzerinden uzaklaştırırken aynı zamanda ortamdan H^+ iyonu da tamponlamaktadır. Ardından oluşan nispeten daha az toksik olan ama hala oksidatif özelliği olan H_2O_2 molekülü demiri oksitleyebileceği gibi ortamdaki katalaz sayesinde nötr oksijen ve su molekülene dönüştürebilecektir. Diğer taraftan da glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz varlığında okside glutatyona (GSSG) dönüşür ve hidrojen peroksidi su molekülü haline dönüştürerek kendisi okside formuna dönüşür. C vitamini, E vitamini selenyum gibi antioksidan moleküller $NADPH^+$ varlığında ortamdan H^+ de uzaklaştırarak okside glutatyonu yeniden antioksidan işlev görebileceği redükte formuna dönüştüreceklerdir. Bu sayede ortamdan tüm radikaller uzaklaştırılmış olurlar (Resim 15-1).

Sadece c vitamininin verildiği grupta ortamdaki fazla miktardaki antioksidan molekülün SOD miktarını yükselttiğini söylemek mümkündür. Diğer c vitamini konulu çalışmalarla da benzer sonuçlar elde edilmiştir [16, 91].

Çalışmamızda gözlemlediğimiz beklemediğimiz bir sonuç da ikinci cerrahi prosedür esnasında özellikle c vitamini ve c vitaminiyle birlikte uyguladığımız sildenafil ® grubunda yüksek miktardaki fibrozis varlığıydı. İmplante ettiğimiz over dokusunun fibrotik katlardan ayrılması ve eksize edilmesi not ettiğimiz önemli bir bulguydu.

Yapılan çalışmaların gösterdiği üzere [111-115] fibrozisin transplante edilen over dokusunda foliküller stabilite sağlamaktadır. Çalışmamızda biz de c vitamini ve c vitamini ile birlikte verilen sildenafil ® grubunda bol miktarda fibrozisin geliştiği bunun da over rezervinin korunmasında etkili olabilecek bir diğer faktör olabileceği kanaatine vardık. Her nekadar elde ettiğimiz preperatlarda fibrozisi gösterebilecek Ki-67 immünhistokimyasal inceleme yapmamış olsak da overyan dokunun her alanında gözlemlediğimiz fibrozisi, foliküller rezervin korunmasında önemli rol oynamış olduğunu düşündük.

Çocukluk çağı kanserlerinde tedavi sonrası genç erişkinlerin ve dahi orta yaş kadınların çocuk beklentisi, sosyal gerekçeler gibi sebeplerle over dokusunun dondurulması ve sonradan transplantasyonu günümüzün önemli jinekolojik gelişmeleri ve ümit vadeden tedavi tekniklerindendir. Moleküler tıp ve genetik alanında yaşanan baş döndürücü gelişmeler sonucunda yapay over dokusu üretebilmek konulu çalışmalar da gündemdedir. Bu açıdan bakıldığında transfer edilen dokuda ovaryan rezervin mümkün olduğunca korunabilmesi oldukça önemli bir sorundur. Biz çalışmamızda bu rezervin korunmasında denenen birçok medikal ajanın yanında fosfodiesteraz enzim inhibitörü olan ve başkaca endikasyonlarla onay alıp kullanılmakta olan sildenafil ® molekülünü irdeledik.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, ***over rezervi korunmasında c vitamini kadar etkili bulduğumuz sildenafil ®, c vitaminiyle birlikte kullanılırsa over rezervini orta ve uzun dönemde korumada daha başarılı sonuçlar verecektir.*** Transfer edilen over dokusundan elde edilmek istenen sonuçlar açısından tedavi seçeneği olarak s***ildenafil ® ve c vitaminin birlikte kullanılabilir***. Bu konuda ileri düzey araştırmaların da yapılması tavsiye edilmektedir.

16. KAYNAKLAR

1. Kase, N.G., *CHAPTER 2A - The Normal Human Ovary Part I: Reproductive and Endocrine Functions*, in *Diagnosis and Management of Ovarian Disorders (Second Edition)*, A. Altchek, L. Deligdisch, and N.G. Kase, Editors. 2003, Academic Press: San Diego. p. 11-32.

2. Cunningham, F.G., editor., *Williams obstetrics / [edited by] F. Gary Cunningham, Kenneth J. Leveno, Steven L. Bloom, Catherine Y. Spong, Jodi S. Dashe, Barbara L. Hoffman, Brian M. Casey, Jeanne S. Sheffield.* 24th Edition ed. 2014, New York: McGraw-Hill Education/Medical, [2014]. 1354.

3. Foster;, P.M.D. and J. L. Earl Gray, *Toxic Responses of the Reproductive System*, in *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology*, W.J.e. Klaassen CD, Editor. 2010, The McGraw-Hill Companies, Inc.: USA. p. 279-293.

4. Kocabaş, N., Bozkurt, Z . *Rat ve Farede Doğumda Yavru Sayısı ve Ana Ağırlığının Erken Dönem Büyüme Üzerine Etkisi.* Kocatepe Veterinary Journal JF, 2008. **1**(1): p. 12.

5. Onur, H. and T. Ayan. *Rahim.* Kadın İç Genitalyası 2008 15 Şubat 2021 [cited 2008 4 June 2008]; Mahmut Tolga AYAN Tarafından yeniden düzenlenmiştir]. Available from: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/52/Illu_ovaryb_tr.PNG.

6. Dolmans, M.-M. and J. Donnez, *Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue.* Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2021. **70**: p. 63-80.

7. Donnez, J., et al., *Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue.* Lancet, 2004. **364**(9443): p. 1405-10.

8. Demeestere, I., et al., *Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood.* Hum Reprod, 2015. **30**(9): p. 2107-9.

9. Dolmans, M.-M., J. Donnez, and L. Cacciottola, *Fertility Preservation: The Challenge of Freezing and Transplanting Ovarian Tissue.* Trends in Molecular Medicine, 2020.

10. Nisolle, M., et al., *Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice.* Fertility and Sterility, 2000. **74**(1): p. 122-129.

11. Amorim, C.A., et al., *Long-term follow-up of vitrified and autografted baboon (Papio anubis) ovarian tissue.* Human Reproduction, 2019. **34**(2): p. 323-334.

12. Balachandren, N. and M. Davies, *Fertility, ovarian reserve and cancer.* Maturitas, 2017. **105**: p. 64-68.

13. Lotz, L., et al., *Ovarian Tissue Transplantation: Experience From Germany and Worldwide Efficacy*. Clinical Medicine Insights: Reproductive Health, 2019. **13**: p. 117955811986735.

14. Donnez, J., D.D. Manavella, and M.M. Dolmans, *Techniques for ovarian tissue transplantation and results.* Minerva Ginecol, 2018. **70**(4): p. 424-431.

15. CAN, S.T., *Ratlarda otolog intraperitoneal over transplantasyonunda benfotiamin ve n-asetilsistein kullanımı/The effect of benfotiamine and n-acetylcysteine in autologous intraperiyoneal transplantation of the ovary in rats.* 2016.

16. Ekrem SAPMAZ, N.İ., AYGEN ALTUNGÜL, NUSRET AKPOLAT *RATLARDA OTOLOG SUBKUTAN OVER TRANSPLANTASYONUNDA ANTİOKSİDAN OLARAK VİTAMİN C VE VİTAMİN E KULLANIMININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ.* Türk Fertilite Dergisi, 2002. **10**: p. 99-106.

17. Celik, M., et al., *Sildenafil Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovary: Biochemical and Histopathological Evaluation.* Gynecologic and Obstetric Investigation, 2014. **78**(3): p. 162-167.

18. Alkaş, D., *Ratlarda over torsiyonu modelinde sildenafil kullanımının anti müllerian hormon seviyesi üzerine etkileri var mı?* 2016.

19. Danehpoya, F., et al., *Effects of n-acetylcysteine on ovarian tissue autografted intogranulation tissue compared to back muscle in rats.* Turk J Med Sci, 2017. **47**(6): p. 1931-1939.

20. Şahin, Ç., et al., *Tadalafil attenuates ischemic damage as well as reperfusion injury in the rat ovary.* Journal of the Turkish-German Gynecological Association, 2020. **21**(1): p. 35-40.

21. Sakin, O., et al., *Comparison of the protective effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil treatments in ischemia-reperfusion injury in rat ovary.* Ginekologia Polska, 2019. **90**(9): p. 513-519.

22. Gavish, Z., et al., *Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness.* Human Reproduction, 2014. **29**(5): p. 989-996.

23. Uccella, S., et al., *Sentinel-node biopsy in early-stage ovarian cancer: preliminary results of a prospective multicentre study (SELLY).* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2019. **221**(4): p. 324.e1-324.e10.

24. Dewailly, D., et al., *The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women.* Human Reproduction Update, 2014. **20**(3): p. 370-385.

25. Tal, R., et al., *Endocrinology of Pregnancy*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc.Copyright © 2000-2021, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).

26. Lew, R., *Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure.* Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2019. **55**: p. 2-13.

27. Hadhazy, A. *Did one woman really give birth to 69 children?* 2015 [cited 2015 21st October 2015]; According to a local monastery's report to the government in Moscow, between 1725 and 1765 Mrs Vassilyev popped out 16 pairs of twins, seven sets of triplets and four sets of quadruplets, over 27 separate labours. The grand total: 69 children.]. Available from: https://www.bbc.com/future/article/20151020-did-one-woman-really-give-birth-to-69-children.

28. TUİK. *Dünya Nüfus Günü, 2020*. 2020 [cited 2020 06.07.2020]; Sayı: 33707 [Toplam doğurganlık hızı 1,88 oldu.]. Available from: https://tuikweb.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=33707.

29. Yiğit, A.A., G. Böyük, and R. Kabakçı, *Dişi Ratlarda Üreme Fizyolojisi.* Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2019. **12**(ARALIK 2019): p. 163-167.

30. Ben-Chetrit, A., et al., *Ovarian Response to Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone in Luteinizing Hormone-Depleted Women: Examination of the Two Cell, Two Gonadotropin Theory.* Fertility and Sterility, 1998. **69**(3, Supplement 2): p. 59S-65S.

31. Evans, T.J. and V.K. Ganjam, *Chapter 2 - Reproductive Anatomy and Physiology*, in *Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)*, R.C. Gupta, Editor. 2017, Academic Press. p. 7-37.

32. Satie, A.-P., et al., *Excess Type I Interferon Signaling in the Mouse Seminiferous Tubules Leads to Germ Cell Loss and Sterility*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(26): p. 23280-23295.

33. Hubscher, C., D. Brooks, and Johnson, Jr., *A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle.* Biotechnic & Histochemistry, 2005. **80**(2): p. 79-87.

34. Peters, H., *A correlation of structure and function in mammals.* The Ovary, 1980.

35. Accialini P., H.S.F., Abramovich D., Tesone M., *The Rodent Corpus Luteum*, in *The Life Cycle of the Corpus Luteum*, M. R., Editor. 2017, Springer, Cham: Switzerland. p. 117-131.

36. Petroianu, A., et al., *The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation.* Journal of Surgical Research, 2005. **124**(2): p. 175-179.

37. Rao, R.P. and B.B. Kaliwal, *Monocrotophos Induced Dysfunction on Estrous Cycle and Follicular Development in Mice.* INDUSTRIAL HEALTH, 2002. **40**(3): p. 237-244.

38. Medicine, P.C.o.t.A.S.f.R., *Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion.* Fertility and Sterility, 2015. **103**(3): p. e9-e17.

39. Tal, R. and D.B. Seifer, *Ovarian reserve testing: a user's guide.* Am J Obstet Gynecol, 2017. **217**(2): p. 129-140.

40. Rodriguez-Wallberg, K.A. and K. Oktay, *Fertility Preservation Medicine: Options for Young Adults and Children With Cancer.* Journal of Pediatric Hematology/Oncology, 2010. **32**(5): p. 390-396.

41. Gürkan Uncu, A.P.Ç. *TSRM Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği Bülteni*. Blast, 2016. **5**, 56.

42. Francesca E. Duncan, R.E.B., Teresa K. Woodruff, *Fertility Preservation*, in *Yen and Jaffes Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*, R.B. Jerome F. Strauss III, Editor. 2014, Elsevier Inc.: Philadelphia, PA. p. 791-822.

43. Benard, J., et al., *Fertility Preservation in Women*, in *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, I. Huhtaniemi and L. Martini, Editors. 2019, Academic Press: Oxford. p. 603-614.

44. Kwee, J., *Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study*. Human Reproduction, 2004. **19**(3): p. 590-595.

45. Broekmans, F.J., et al., *A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome*. Human Reproduction Update, 2006. **12**(6): p. 685-718.

46. Roberts, J.E., et al., *Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization.* Fertility and Sterility, 2005. **83**(1): p. 37-41.

47. Broer, S.L., et al., *The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count.* Fertility and Sterility, 2009. **91**(3): p. 705-714.

48. Shaw, C.M., et al., *Serum antimüllerian hormone in healthy premenopausal women.* Fertility and Sterility, 2011. **95**(8): p. 2718-2721.

49. Butts, S.F. and D.B. Seifer, *Racial and ethnic differences in reproductive potential across the life cycle.* Fertility and Sterility, 2010. **93**(3): p. 681-690.

50. Seifer, D.B., et al., *Variations in serum müllerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women.* Fertility and Sterility, 2009. **92**(5): p. 1674-1678.

51. Lawrenz, B., et al., *Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: Evaluation by using anti-Muellerian hormone.* Lupus, 2011. **20**(11): p. 1193-1197.

52. Şenateş, E., et al., *Serum anti-Müllerian hormone levels are lower in reproductive-age women with Crohn's disease compared to healthy control women.* Journal of Crohn's and Colitis, 2013. **7**(2): p. e29-e34.

53. Wang, E.T., et al., *BRCA1 germline mutations may be associated with reduced ovarian reserve.* Fertility and Sterility, 2014. **102**(6): p. 1723-1728.

54. Pastore, L.M., et al., *AMH in women with diminished ovarian reserve: potential differences by FMR1 CGG repeat level.* Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2014. **31**(10): p. 1295-1301.

55. Hagen, C.P., et al., *Individual serum levels of anti-Mullerian hormone in healthy girls persist through childhood and adolescence: a longitudinal cohort study.* Human Reproduction, 2012. **27**(3): p. 861-866.

56. Tal, R., et al., *Characterization of women with elevated antimüllerian hormone levels (AMH): correlation of AMH with polycystic ovarian syndrome phenotypes and assisted reproductive technology outcomes.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2014. **211**(1): p. 59.e1-59.e8.

57. Lin, Y.-H., et al., *Antimüllerian hormone and polycystic ovary syndrome.* Fertility and Sterility, 2011. **96**(1): p. 230-235.

58. Dólleman, M., et al., *Reproductive and Lifestyle Determinants of Anti-Müllerian Hormone in a Large Population-based Study.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. **98**(5): p. 2106-2115.

59. Bleil, M.E., et al., *Race/ethnic disparities in reproductive age: an examination of ovarian reserve estimates across four race/ethnic groups of healthy, regularly cycling women.* Fertility and Sterility, 2014. **101**(1): p. 199-207.

60. Chang, H.J., et al., *Impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve: serial changes of serum anti-Müllerian hormone levels.* Fertility and Sterility, 2010. **94**(1): p. 343-349.

61. Pacchiarotti, A., et al., *Evaluation of serum anti-Mullerian hormone levels to assess the ovarian reserve in women with severe endometriosis.* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2014. **172**: p. 62-64.

62. Rey, R., *Anti-Müllerian hormone is a specific marker of Sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors.* Human Pathology, 2000. **31**(10): p. 1202-1208.

63. Iliodromiti, S., R.A. Anderson, and S.M. Nelson, *Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response.* Human Reproduction Update, 2015. **21**(6): p. 698-710.

64. Freour, T., et al., *Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve.* Reproductive BioMedicine Online, 2008. **16**(1): p. 96-102.

65. Tsepelidis, S., et al., *Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women.* Human Reproduction, 2007. **22**(7): p. 1837-1840.

66. Anderson, R.A., et al., *Pretreatment anti-Müllerian hormone predicts for loss of ovarian function after chemotherapy for early breast cancer.* European Journal of Cancer, 2013. **49**(16): p. 3404-3411.

67. Dillon, K.E., et al., *Pretreatment antimüllerian hormone levels determine rate of posttherapy ovarian reserve recovery: acute changes in ovarian reserve during and after chemotherapy.* Fertility and Sterility, 2013. **99**(2): p. 477-483.e1.

68. Dennis, N.A., et al., *The Level of Serum Anti-Müllerian Hormone Correlates with Vitamin D Status in Men and Women But Not in Boys.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012. **97**(7): p. 2450-2455.

69. Evers, J.L.H., et al., *Elevated Levels of Basal Estradiol-17β Predict Poor Response in Patients with Normal Basal Levels of Follicle-Stimulating Hormone Undergoing In Vitro Fertilization.* Fertility and Sterility, 1998. **69**(6): p. 1010-1014.

70. McIlveen, M., J.D. Skull, and W.L. Ledger, *Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population.* Human Reproduction, 2007. **22**(3): p. 778-785.

71. Hendriks, D.J., et al., *The clomiphene citrate challenge test for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review.* Fertility and Sterility, 2006. **86**(4): p. 807-818.

72. Mercé, L.T., et al., *Intraobserver and Interobserver Reproducibility of Ovarian Volume, Antral Follicle Count, and Vascularity Indices Obtained With Transvaginal 3-Dimensional Ultrasonography, Power Doppler Angiography, and the Virtual Organ Computer-Aided Analysis Imaging Pr.* Journal of Ultrasound in Medicine, 2005. **24**(9): p. 1279-1287.

73. Jayaprakasan, K., et al., *A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation.* Fertility and Sterility, 2010. **93**(3): p. 855-864.

74. Ke, H. and L.-z. Yan, *Predictive factors for clinical pregnancies of poor responders diagnosed according to the Bologna criteria in ovarian stimulation in vitro fertilization (IVF).* Journal of Reproduction and Contraception, 2015. **26**(3): p. 141-145.

75. Riggs, R.M., et al., *Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone: a comparison of the predictive value of anti-Müllerian hormone, follicle-stimulating hormone, inhibin B, and age.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2008. **199**(2): p. 202.e1-202.e8.

76. Rosen, M.P., et al., *A characterization of the relationship of ovarian reserve markers with age.* Fertility and Sterility, 2012. **97**(1): p. 238-243.

77. Toftager, M., et al., *Cumulative live birth rates after one ART cycle including all subsequent frozen–thaw cycles in 1050 women: secondary outcome of an RCT comparing GnRH-antagonist and GnRH-agonist protocols.* Human Reproduction, 2017.

78. Sönmezer, M., et al., *Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles.* Fertility and Sterility, 2011. **95**(6): p. 2125.e9-2125.e11.

79. Oktay, K., et al., *Fertility Preservation in Breast Cancer Patients: A Prospective Controlled Comparison of Ovarian Stimulation With Tamoxifen and Letrozole for Embryo Cryopreservation.* Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(19): p. 4347-4353.

80. Rienzi, L., et al., *Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance.* Human Reproduction Update, 2016.

81. Crawford, S., et al., *Cryopreserved oocyte versus fresh oocyte assisted reproductive technology cycles, United States, 2013.* Fertility and Sterility, 2017. **107**(1): p. 110-118.

82. Van Der Ven, H., et al., *Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates.* Human Reproduction, 2016. **31**(9): p. 2031-2041.

83. Andersen, S.T., et al., *Ovarian stimulation and assisted reproductive technology outcomes in women transplanted with cryopreserved ovarian tissue: a systematic review.* Fertility and Sterility, 2019. **112**(5): p. 908-921.

84. Jensen, A.K., et al., *86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children.* Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2017. **34**(3): p. 325-336.

85. Wallace, W.H.B., T.W. Kelsey, and R.A. Anderson, *Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: the role of ovarian tissue cryopreservation.* Fertility and Sterility, 2016. **105**(1): p. 6-12.

86. Shalom-Paz, E., et al., *Fertility preservation for breast-cancer patients using IVM followed by oocyte or embryo vitrification.* Reproductive BioMedicine Online, 2010. **21**(4): p. 566-571.

87. Liu, Y., et al., *The effect of donor and recipient race on outcomes of assisted reproduction.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2021. **224**(4): p. 374.e1-374.e12.

88. Kang, K.-K., et al., *Vitamin C Improves Therapeutic Effects of Adipose-derived Stem Cell Transplantation in Mouse Tendonitis Model.* In Vivo, 2017. **31**(3): p. 343-348.

89. Yang, H., et al., *Vitamin C plus hydrogel facilitates bone marrow stromal cell-mediated endometrium regeneration in rats.* Stem Cell Research & Therapy, 2017. **8**(1).

90. Khaki, A.A., A. Khaki, and S.S. Ahmadi, *The effect of Non- ionizing electromagnetic field with a frequency of 50 Hz in Rat ovary: A transmission electron microscopy study.* Int J Reprod Biomed, 2016. **14**(2): p. 125-32.

91. Kolac, U.K., et al., *The Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Salvia officinalis on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Rats.* Journal of Medicinal Food, 2017. **20**(12): p. 1193-1200.

92. Salehian, M.T., et al., *Allograft en bloc vagino-utero-ovarian avascular transplant versus autograft implantation in rats.* Exp Clin Transplant, 2008. **6**(4): p. 307-11.

93. Shapira, M., et al., *Evaluation of ovarian tissue transplantation: results from three clinical centers.* Fertility and Sterility, 2020. **114**(2): p. 388-397.

94. Andersson, K.E., *PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery.* Br J Pharmacol, 2018. **175**(13): p. 2554-2565.

95. Barral, S.M., et al., *Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps.* Acta cirurgica brasileira, 2011. **26**(4): p. 314-319.

96. Kaya, B., et al., *Comparison of the effects of systemic sildenafil, tadalafil, and vardenafil treatments on skin flap survival in rats.* Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery, 2015. **49**(6): p. 358-362.

97. Li, L., et al., *Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area detected by MRI after administration of sildenafil to rats with embolic stroke.* Brain Research, 2007. **1132**: p. 185-192.

98. Shih, P.-K., et al., *Pretreatment with sildenafil alleviates early lung ischemia-reperfusion injury in a rat model.* Journal of Surgical Research, 2013. **185**(2): p. e77-e83.

99. Uzun, H., et al., *The Effects of Sildenafil Citrate on Ischemic Colonic Anastomotic Healing in Rats: Its Relationship Between Nitric Oxide and Oxidative Stress.* World Journal of Surgery, 2008. **32**(9): p. 2107-2113.

100. Kolbe, T., I. Walter, and T. Rülicke, *Influence of graft size, histocompatibility,and cryopreservation on reproductive outcome following ovary transplantation in mice.* J Assist Reprod Genet, 2019. **36**(12): p. 2583-2591.

101. Richard, M.J., et al., *Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure.* Nephron, 1991. **57**(1): p. 10-5.

102. Oudemans-van Straaten, H.M., A.M. Spoelstra-de Man, and M.C. de Waard, *Vitamin C revisited.* Crit Care, 2014. **18**(4): p. 460.

103. Sarifakioglu, N., et al., *The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study.* British journal of plastic surgery, 2004. **57**(8): p. 769-772.

104. Celik, M., et al., *Sildenafil reduces ischemia-reperfusion injury in rat ovary: biochemical and histopathological evaluation.* Gynecol Obstet Invest, 2014. **78**(3): p. 162-7.

105. Choi, D.E., et al., *Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats.* American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2009. **297**(2): p. F362-F370.

106. Gavish, Z., M. Ben-Haim, and A. Arav, *Cryopreservation of Whole Murine and Porcine Livers.* Rejuvenation Research, 2008. **11**(4): p. 765-772.

107. Kagawa, N., S. Silber, and M. Kuwayama, *Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue.* Reproductive BioMedicine Online, 2009. **18**(4): p. 568-577.

108. Ferreira, M., et al., *The Effects of Sample Size on the Outcome of Ovarian Tissue Cryopreservation.* Reproduction in Domestic Animals, 2010. **45**(1): p. 99-102.

109. Iwase, A., et al., *Clinical application of serum anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker: A review of recent studies.* J Obstet Gynaecol Res, 2018. **44**(6): p. 998-1006.

110. Kevenaar, M.E., et al., *Serum Anti-Müllerian Hormone Levels Reflect the Size of the Primordial Follicle Pool in Mice.* Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3228-3234.

111. Olesen, H.Ø., et al., *N-acetylcysteine protects ovarian follicles from ischemia-reperfusion injury in xenotransplanted human ovarian tissue.* Human Reproduction, 2021. **36**(2): p. 429-443.

112. Souza, S.S., et al., *Heterotopic autotransplantation of ovarian tissue in a large animal model: Effects of cooling and VEGF.* PLOS ONE, 2020. **15**(11): p. e0241442.

113. Amorim, C.A., et al., *Vitrification and xenografting of human ovarian tissue.* Fertility and Sterility, 2012. **98**(5): p. 1291-1298.e2.

114. Herraiz, S., et al., *Optimizing ovarian tissue quality before cryopreservation: comparing outcomes of three decortication methods on stromal and follicular viability.* Fertility and Sterility, 2020. **113**(3): p. 609-617.e3.

115. Dath, C., et al., *Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites.* Human Reproduction, 2010. **25**(7): p. 1734-1743.

17. HAM VERİLER

17.1. Denek Ağırlıkları ve Over Ağırlıkları

Tablo 17-1 de denek ağırlıkları ve denek over ağırlıkları ham verileri yer almaktadır.

Case Summaries[a]

				Denek Ağırlığı	Sağ Over Ağırlığı	Sol Over Ağırlığı	Toplam Over Ağırlıkları
Deney Grubu	Şam Grubu	1		270	417	465	882
		2		280	515	535	1050
		3		260	487	503	990
		4		250	589	621	1210
		5		270	405	438	843
		6		260	475	516	991
		Total	N	6	6	6	6
	Kontrol Grubu	1		300	333	165	498
		2		300	553	310	863
		3		280	264	247	511
		4		280	417	320	737
		5		280	410	291	701
		6		280	282	353	635
		Total	N	6	6	6	6
	Sildenafil Uygulanan Grup	1		270	773	579	1352
		2		280	609	744	1353
		3		260	755	671	1426
		4		250	1322	396	1718
		5		270	814	1841	2655
		6		260	768	743	1511
		Total	N	6	6	6	6
	C Vitamini Verilen Grup	1		290	952	977	1929
		2		305	1488	695	2183
		3		310	702	1771	2473
		4		295	1029	393	1422
		5		300	692	1370	2062
		6		290	1095	907	2002
		Total	N	6	6	6	6
	Sildenafil ve C Vitamini Verilen Grup	1		300	1331	1794	3125
		2		310	1646	1314	2960
		3		305	1125	936	2061
		4		295	2096	936	3032
		5		300	1595	2415	4010
		6		290	1201	807	2008
		Total	N	6	6	6	6
	Total	N		30	30	30	30

Tablo 17-1Denek ağırlıkları ve over ağırlıkları.

17.2. Folikül Sayım Verileri

Tablo 17-2 de folikül sayıları ham verileri yer almaktadır.

Case Summaries

				Primordial Folikül Sayısı	Primer Folikül Sayısı	Antral Folikül Sayısı	Graf Folikül Sayısı	Toplam Folikül Sayısı
Deney Grubu	Şam Grubu	1		14	28	8	4	54
		2		13	25	7	5	50
		3		15	29	7	6	57
		4		17	31	10	5	63
		5		13	25	9	7	54
		6		16	24	6	3	49
		Total	N	6	6	6	6	6
	Kontrol Grubu	1		2	3	1	0	6
		2		3	2	0	1	6
		3		5	1	1	1	8
		4		2	2	2	1	7
		5		2	3	1	2	8
		6		4	4	2	1	11
		Total	N	6	6	6	6	6
	Sildenafil Uygulanan Grup	1		7	17	5	2	31
		2		8	14	7	4	33
		3		9	11	4	5	29
		4		5	7	3	2	17
		5		6	13	6	3	28
		6		8	15	8	3	34
		Total	N	6	6	6	6	6
	C Vitamini Verilen Grup	1		11	18	7	2	38
		2		7	13	4	4	28
		3		8	18	2	1	29
		4		10	19	6	5	40
		5		7	14	5	3	29
		6		9	12	4	3	28
		Total	N	6	6	6	6	6
	Sildenafil ve C Vitamini Verilen Grup	1		11	22	5	4	42
		2		13	23	8	6	50
		3		15	21	7	5	48
		4		10	22	8	7	47
		5		12	23	4	3	42
		6		8	19	7	4	38
		Total	N	6	6	6	6	6
	Total	N		30	30	30	30	30

Tablo 17-2 Folikül sayımı verileri

17.3. Korpus Sayım Verileri

Tablo 17-3 korpus sayım ham verileri yer almaktadır.

Case Summaries

				Korpus Luteum	Korpus Albicans	Toplam Korpus Sayısı
Deney Grubu	Şam Grubu	1		7	3	10
		2		8	4	12
		3		8	5	13
		4		6	6	12
		5		5	8	13
		6		4	2	6
		Total	N	6	6	6
	Kontrol Grubu	1		1	1	2
		2		2	0	2
		3		1	1	2
		4		1	0	1
		5		1	0	1
		6		2	2	4
		Total	N	6	6	6
	Sildenafil Uygulanan Grup	1		4	3	7
		2		3	2	5
		3		4	2	6
		4		5	3	8
		5		2	1	3
		6		3	1	4
		Total	N	6	6	6
	C Vitamini Verilen Grup	1		5	2	7
		2		3	1	4
		3		1	0	1
		4		3	2	5
		5		2	1	3
		6		3	2	5
		Total	N	6	6	6
	Sildenafil ve C Vitamini Verilen Grup	1		3	3	6
		2		4	5	9
		3		5	4	9
		4		5	3	8
		5		4	0	4
		6		3	0	3
		Total	N	6	6	6
	Total	N		30	30	30

Tablo 17-3 Korpus sayım verileri

17.4. Laboratuvar Verileri

Tablo 17-4 de FSH, AMH, E_2, SOD ham verileri yer almaktadır.

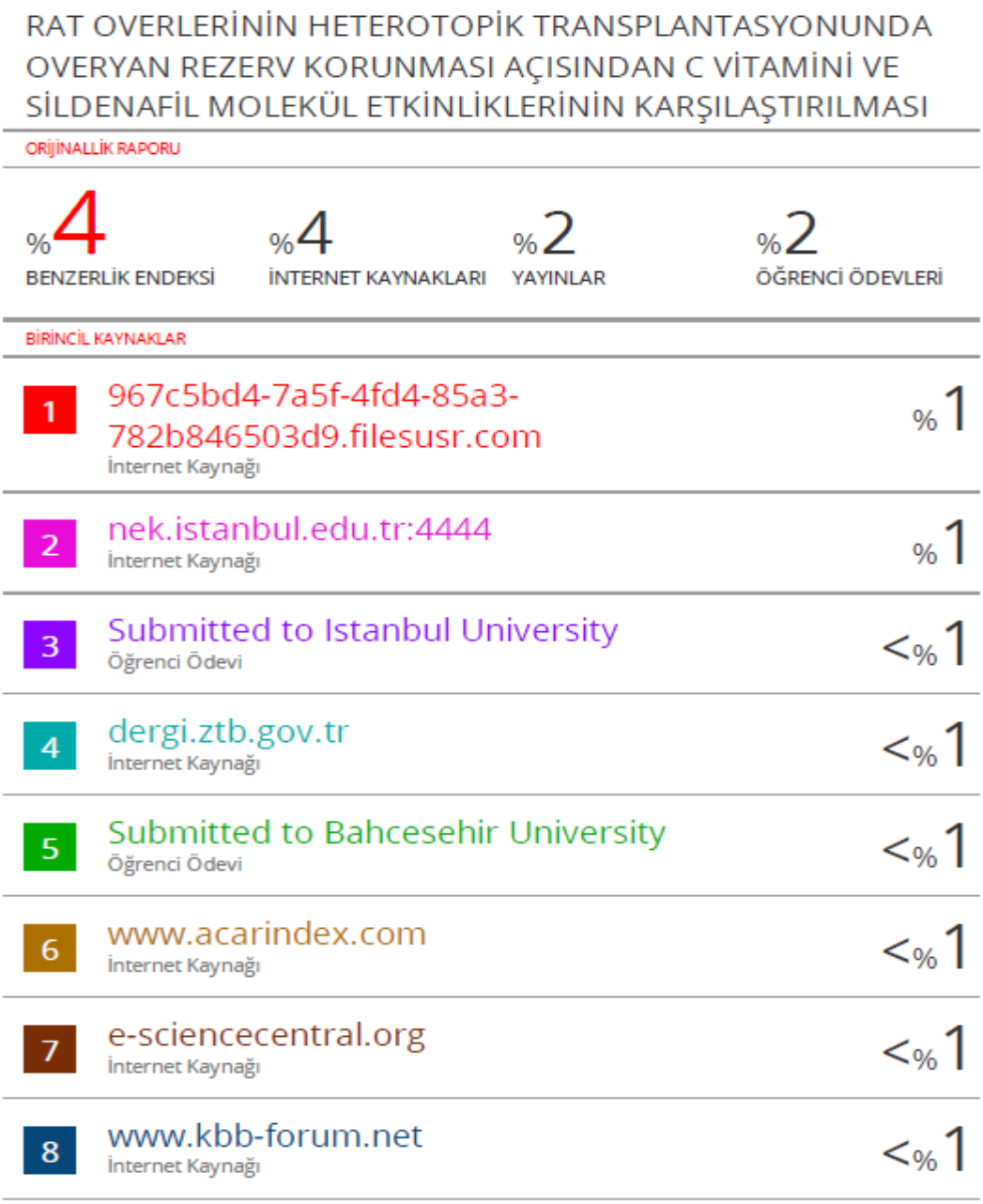
Case Summaries

				FSH (mIU/ml)	AMH (ng/ml)	Östradiol (E2-pg/ml)	SuperOksitDismutaz(SOD-ng/ml)
Deney Grubu	Şam Grubu	1		5,240	3,930	3,100	1,410
		2		5,230	3,750	3,130	1,350
		3		5,290	3,950	3,180	1,380
		4		5,350	3,950	3,150	1,420
		5		5,370	3,920	3,250	1,270
		6		5,380	3,870	3,210	1,370
		Total	N	6	6	6	6
	Kontrol Grubu	1		5,770	2,950	1,430	2,180
		2		5,780	2,930	1,440	2,220
		3		5,750	2,980	1,530	2,320
		4		5,690	2,970	1,540	2,320
		5		5,880	3,040	1,510	2,350
		6		5,810	3,140	1,570	2,410
		Total	N	6	6	6	6
	Sildenafil Uygulanan Grup	1		5,080	3,510	3,590	1,770
		2		4,940	3,490	3,680	1,840
		3		5,040	3,450	3,670	1,840
		4		5,070	3,390	3,610	1,930
		5		4,910	3,470	3,730	1,960
		6		5,070	3,530	3,680	2,010
		Total	N	6	6	6	6
	C Vitamini Verilen Grup	1		6,070	4,760	2,790	2,920
		2		6,140	4,710	2,670	2,660
		3		5,960	4,750	2,720	2,830
		4		6,120	4,730	2,850	2,750
		5		5,980	4,670	2,870	2,670
		6		6,050	4,610	2,810	2,730
		Total	N	6	6	6	6
	Sildenafil ve C Vitamini Verilen Grup	1		5,310	4,380	3,500	2,240
		2		5,390	4,400	3,450	2,240
		3		5,340	4,370	3,390	2,330
		4		5,290	4,350	3,630	2,370
		5		5,250	4,410	3,530	2,310
		6		5,330	4,390	3,590	2,280
		Total	N	6	6	6	6
	Total	N		30	30	30	30

Tablo 17-4 Laboratuvar verileri.

18. İNTİHAL RAPORU

Resim 19-1 de intihal raporu ilk sayfası yer almaktadır.



RAT OVERLERİNİN HETEROTOPİK TRANSPLANTASYONUNDA OVERYAN REZERV KORUNMASI AÇISINDAN C VİTAMİNİ VE SİLDENAFİL MOLEKÜL ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%4	%4	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	967c5bd4-7a5f-4fd4-85a3-782b846503d9.filesusr.com İnternet Kaynağı	%1
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
4	dergi.ztb.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	<%1
6	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<%1
7	e-sciencecentral.org İnternet Kaynağı	<%1
8	www.kbb-forum.net İnternet Kaynağı	<%1

Resim 18-1 İntihal raporu ilk sayfası

19. ÖZGEÇMİŞ

Dört Ocak 1978 Trabzon'da doğdum. İlk orta ve lise eğitimimi Trabzon'da devlet okullarında tamamladım. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi'ne 1994 yılında kaydoldum. GATA'dan 1998 yılında 4. sınıfta ayrıldım. Karadeniz Teknik Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Uluslararası İlişkiler Bölümü'ne 2000 yılında kaydoldum. 2004 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi' ne yarım kalan tıp eğitimimi tamamlamak için kaydoldum. 2007 Yılında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Mecburi hizmetimi Bayburt ili Sağlık Müdürlüğü'ne bağlı muhtelif kadrolarda tamamladım. Devlet hastanesi acil servis hekimliği, Toplum sağlığı merkezi hekimliği, 112 Acil Servis ve Komuta Kontrol Merkezinde görev yaptım. İl merkezi, ilçe merkezi, belde ve köy birimlerinde aile hekimliği kadrolarında çalıştım. İstanbul ili Arnavutköy ilçesinde aile hekimliği görevi yaptım. 2012 Yılından itibaren muhtelif firmalarda işyeri hekimi olarak çalıştım. Eylül 2017 tarihinde Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü'nde asistanlık eğitimime başladım.

İleri düzey İngilizce, orta düzey Almanca ve Rusça dillerini bilmekteyim

Evliyim, Aytuğ ve Aysima adında 2 çocuğum var.