

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA
KİSSPEPTİN UYGULAMASININ
mTOR MEKANİZMASINA ETKİSİ**

CANSU BEKDEMİR

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2016

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970150

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA
KİSSPEPTİN UYGULAMASININ
mTOR MEKANİZMASINA ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

CANSU BEKDEMİR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Işıl TEKMEK

(Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2015.KB.SAG.022 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970150

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim
Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Çansu
BEKDEMİR 'Deneysel Olarak Oluşturulan Polikistik Over Sendromunda Kisspeptin
Uygulamasının mTOR Mekanizmasına Etkisi' konulu yüksek lisans tezini 14.12.2016
tarihinde başarılı/başarısız olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Işıl TEKMEK

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Ülker CANKURT

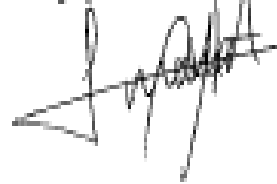
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Selen BAĞÇECİ

ÜYE

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Güven ERBİL

ÜYE (YEDEK)

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Meltem KURUŞ

ÜYE (YEDEK)

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	4
1.GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Dişi Üreme Sistemi.....	9
2.2. Ovaryum	10
2.2.1. Ovaryum Embriyolojisi	10
2.2.1.1. Gonadların Oluşumu.....	10
2.2.1.2. Cinsiyetin Farklanması.....	11
2.2.2. Ovaryumun Anatomisi.....	12
2.2.2.1. Ovarium Arterleri.....	12
2.2.2.2. Ovarium Venleri.....	12
2.2.2.3. Ovarium Lenf Damarları.....	13
2.2.2.4. Ovarium'un Sinirleri.....	13
2.2.3. Ovaryum Histolojisi.....	13
2.2.3.1. Ovaryum Korteksi	14
2.2.3.2. Ovaryum Medullası.....	14
2.2.4. Foliküler Gelişim (Folikülogenez).....	14
2.2.4.1. Primordiyal Foliküller	14
2.2.4.2. Büyümekte Olan Foliküller.....	15
2.2.4.2.1. Primer Folikül	15
2.2.4.2.2. Sekonder Folikül.....	17

2.2.4.3. Graaf (Olgun) Folikül.....	19
2.2.5. Oogenezis	20
2.2.5.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (Prenatal Maturasyon)	20
2.2.5.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturasyon).....	20
2.2.6. Ovulasyon	22
2.2.7. Korpus Luteum.....	23
2.2.8. Ovaryum Fizyolojisi	24
2.2.9. Foliküler Atrezinin Morfolojik Değerlendirilmesi	24
2.2.10. Rodentlerde Folikül Gelişiminin Kronolojisi.....	26
2.3. Polikistik Over Sendromu Tanımı ve Tarihçesi.....	27
2.3.1. Epidemiyoloji	28
2.3.2. Tanı Kriterleri.....	28
2.3.3. Etiyopatogenez.....	30
2.3.3.1. Gonadotropin Sekresyon Defekti	30
2.3.3.2. Steroidogenez Değişiklikleri.....	31
2.3.3.3. İnsülin Etki ve Salınım Bozuklukları.....	31
2.3.3.4. Genetik Faktörler	32
2.3.4. Klinik ve Laboratuvar Bulguları	33
2.3.5. PKOS’da Folikülogenez.....	34
2.3.6. Dehidroepiandrosteron (DHEA) ve PKOS	34
2.4. mTOR.....	35
2.4.1. mTORC1 (mTOR Kompleks1).....	36
2.4.2. mTORC2 (mTOR Kompleks 2).....	36
2.4.3. mTOR Sinyal Yolağı	37
2.4.4. mTOR İnhibisyonu	38
2.4.5. mTOR ile İlişkili Yolaklar.....	38
2.4.5.1. MAPK Sinyal Yolağı	38
2.4.5.2. PI3K Sinyal Yolağı.....	39
2.5. Kisspeptin	40
2.5.1. Kisspeptin Biyokimyası.....	40

2.5.2. Kisspeptin ve KISS1R'in Hücrelerdeki Lokalizasyonu	41
2.5.3. Kisspeptin İntrasellüler Etki Mekanizması.....	41
2.5.4. Kisspeptin-GPR54 Sistemi ve GnRH	42
2.5.5. Kisspeptin ve mTOR.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Araştırmanın Tipi	44
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	44
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	44
3.4. Çalışma Materyali	45
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	45
3.6. Veri Toplama Araçları	46
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	46
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler.....	46
3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	46
3.6.2.2. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi	47
3.6.2.3. Histokimyasal İncelemeler	47
3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü.....	48
3.6.2.3.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü	49
3.6.2.3.3. MassonTrikrom Boya Protokolü	50
3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler	51
3.6.2.4.1. Folikül Sayısının Tespiti	51
3.6.2.4.2. Folikül Çaplarının Ölçümü	52
3.6.2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	52
3.6.2.5.1. mTOR Boyama Protokolü.....	52
3.6.2.5.2. p-mTOR Boyama Protokolü	53
3.6.2.6. Biyokimyasal Analizler	54
3.6.2.6.1. Deneklerden Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	54
3.6.2.6.2. ELISA Yöntemi	54
3.6.2.6.2.1. Östradiol Ölçümü	54
3.6.2.6.2.2. Progesteron Ölçümü	55

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi	56
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	57
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	57
3.10. Etik Kurul Onayı	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	58
4.2. Histokimyasal Bulgular	59
4.2.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi	59
4.2.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi.....	69
4.2.3. MassonTrikrom Boya Değerlendirmesi.....	74
4.3. Morfometrik Bulgular	77
4.3.1. Folikül Sayısının Değerlendirilmesi	77
4.3.1.7. Korpus Luteum Sayısının Değerlendirilmesi.....	84
4.3.2. Folikül Çaplarının Değerlendirilmesi	85
4.3.2.4. Sekonder Folikül Granüloza Tabakası Kalınlığının Değerlendirilmesi	88
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	90
4.4.2. p-mTOR İmmünohistokimya Boyama Bulguları.....	95
4.5. Biyokimyasal Değerlendirme.....	101
4.5.1. Östradiol Bulguları Değerlendirilmesi.....	101
4.5.2. Progesteron Bulguların Değerlendirilmesi.....	102
5. TARTIŞMA.....	105
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	111
7. KAYNAKLAR.....	112
8. EKLER.....	130

TABLO DİZİNİ

TABLO 1: Konsensus Tanı Kriterleri.....	29
TABLO 2: Polikistik Over Sendromunda Klinik Bulgular Ve Sıklığı	33
TABLO 3: Rutin Doku Takip Protokolü.	47
TABLO 4: Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü	48
TABLO 5: Periyodik Asit Schiff (Pas) Boya Protokolü.....	50
TABLO 6: Masson Trikrom Boya Protokolü.....	51



SEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Kadın İç Genital Organların Şematik Çizimi.....	10
Şekil 2: Ovaryum Histolojisi.....	13
Şekil 3: Primordiyal Folikül Fotomikrografı.	15
Şekil 4: Primer Folikül Fotomikrografı.....	16
Şekil 5: Çok Tabakalı Primer Folikülün Fotomikrografı.	17
Şekil 6: Sekonder Folikül Fotomikrografı.	18
Şekil 7: Graaf Folikülünün Fotomikrografı.	19
Şekil 8: Atretik Folikül Yapısının Fotomikrografı.	26
Şekil 9: Rodentlerde Foliküler Gelişimin Aşamaları	27
Şekil 10: mTOR Kompleksi Yapısı.....	36
Şekil 11: mTOR Sinyal Yolağı.....	38
Şekil 12: Kisspeptin Yapısı.....	40
Şekil 13: Kisspeptin Sinyal Yolağı.....	42
Şekil 14: Grupların Deney Başlangıcı ve Deney Sonundaki Ağırlıkları.....	58
Şekil 15: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X4 Büyütme).....	60
Şekil 16: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X10 Büyütme).....	60
Şekil 17: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	61
Şekil 18: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X40 Büyütme).....	61
Şekil 19: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X4 Büyütme).....	62
Şekil 20: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	62
Şekil 21: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	63
Şekil 22: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X4 Büyütme).....	63
Şekil 23: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X10 Büyütme).....	64
Şekil 24: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	64
Şekil 25: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	65
Şekil 26: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X40 Büyütme).....	65
Şekil 27: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	66
Şekil 28: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti.. (H&E, X10 Büyütme).....	66
Şekil 29: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X4 Büyütme).....	67
Şekil 30: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X10 Büyütme).....	67
Şekil 31: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	68
Şekil 32: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (H&E, X20 Büyütme).....	68
Şekil 33: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme).....	69
Şekil 34: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme).....	70
Şekil 35: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme).....	70
Şekil 36: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme).....	71

Şekil 37: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme).....	71
Şekil 38: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme)	72
Şekil 39: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme)	72
Şekil 40: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme).....	73
Şekil 41: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (PAS, X40 Büyütme).....	73
Şekil 42: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (Masson Trikrom, X10 Büyütme).....	74
Şekil 43: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (Masson Trikrom, X10 Büyütme).....	75
Şekil 44: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (Masson Trikrom, X20 Büyütme).....	75
Şekil 45: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (Masson Trikrom, X10 Büyütme)	76
Şekil 46: Gruplar Arası Folikül Sayılarının Ortalaması.....	77
Şekil 47: Gruplar Arası Primordiyal Folikül Sayısı.	78
Şekil 48: Gruplar Arası Primer Folikül Sayısı.	79
Şekil 49: Gruplar Arası Sekonder Folikül Sayısı.....	80
Şekil 50: Gruplar Arası Graaf Folikül Sayısı.....	81
Şekil 51: Gruplar Arası Kist Folikül Sayısı.	82
Şekil 52: Gruplar Arası Atretik Folikül Sayısı.	83
Şekil 53: Gruplar Arası Korpus Luteum Sayısı.....	84
Şekil 54: Gruplar Arası Primer Folikül Çaplarının Ortalaması	85
Şekil 55: Gruplar Arası Primer Folikül Granüloza Tabakasının Kalınlık Ortalaması	86
Şekil 56: Gruplar Arası Sekonder Folikül Çaplarının Ortalaması.....	87
Şekil 57: Gruplar Arası Sekonder Folikül Granüloza Tabakasının Kalınlık Ortalaması	89
Şekil 58: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X100 Büyütme).....	91
Şekil 59: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X100 Büyütme).....	91
Şekil 60: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X100 Büyütme).....	92
Şekil 61: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X100 Büyütme).....	92
Şekil 62: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X40 Büyütme)	93
Şekil 63: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X100 Büyütme).....	93
Şekil 64: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X40 Büyütme).....	94
Şekil 65: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (mTOR, X100 Büyütme).....	94
Şekil 66: Kontrol Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR,X100 Büyütme)	96
Şekil 67: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X40 Büyütme).....	96
Şekil 68: Çözgen Grubuna Ait Ovaryum Kesiti.. (p-mTOR, X20 Büyütme).....	97
Şekil 69: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X40 Büyütme).....	97
Şekil 70: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X100 Büyütme).....	98
Şekil 71: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X20 Büyütme).....	98
Şekil 72: PKOS Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X100 Büyütme).....	99
Şekil 73: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X20 Büyütme).....	99
Şekil 74: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X40 Büyütme).....	100

Şekil 75: PKOS+Kisspeptin Grubuna Ait Ovaryum Kesiti. (p-mTOR, X100 Büyütme).....	100
Şekil 80: Gruplar Arası Östradiol Seviyesi Ortalaması.....	102
Şekil 81: Gruplar Arası Progesteron Seviyesi Ortalaması.	104



KISALTMALAR

PKOS: Polikistik Over Sendromu

LH: Luteinizan Hormonu

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

mTOR: the mammalian target of rapamycin

PI3K: Fosfatidilnozik 3-kinaz

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

GnRH: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon

BMP-4: Kemik Morfolojik Protein

PGH: Primordiyal Germ Hücreleri

ZP: Zona pellusida

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

IGF-2: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2

PAS: Periyodik Asit Schiff

NIH: National Institute of Health

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

AES: Androjen Excess Society

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

ACTH: Adrenokortikotropik Hormon

DHEA: Dehidroepiandrosteron

DHEAS: Dehidroepiandrosteron Sülfat

OD: Otozomal Dominant

mTORC1: mTOR Kompleks 1

mTORC2: mTOR Kompleks 2

S6K1: S6 Kinaz 1

4E-BP1: eIF4E Bağlayıcı Protein 1

ARC: Arkuat nükleus

AVPV: Anteroventral periventriküler nükleus



TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji eğitimim boyunca daima yol gösterici olan, tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, her konuda desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Işıl TEKME'ne,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı değerli hocalarından Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR, Prof. Dr. Ülker CANKURT, Prof. Dr. Güven ERBİL, Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK ve Prof. Dr. Kazım TUĞYAN'na,

Tezimin biyokimya çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR ve asistan arkadaşım Didem KELEŞ'e,

Tez dönemim boyunca yardımlarını esirgemeyen ve hayatımın her anında yanımda olduklarını hissettiğim dostlarım Selen YILDIRIM ve Müge ATALAR'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan ve dostluğu ile her anımı paylaştığım sevgili oda arkadaşım Ayşegül KİRAZ'a,

Tez çalışmamın deneysel kısmında yardımlarını esirgemeyen ve manevi destekleri ile yanımda olan doktora öğrencileri Pınar AKOKAY ve Nevin ERSOY'a,

Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisansım boyunca tanıdığım oda arkadaşım Uygur SAÇIK başta olmak üzere bölümümüzün diğer asistan arkadaşlarıma,

Hayatımın her anını paylaştığım ve manevi desteği ile beni motive eden sevgili Özgür ÖZTÜRK'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca, her anımda bana inanan ve yanımda olan, daima destekleyen aileme, teşekkürü borç bilirim.

CANSU BEKDEMİR

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA KİSSPEPTİN UYGULAMASININ mTOR MEKANİZMASINA ETKİSİ

CANSU BEKDEMİR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Narlídere, İzmir.

ÖZET

Amaç:

Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan polikistik over sendromunda, folikül gelişiminde görev alan mTOR sinyal yolağına Kisspeptin-10 uygulamasının ovaryum dokusu üzerine etkisini histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

Yöntem:

Çalışmamızda 27 adet 23 günlük Wistar suşu dişi sıçanlar (50-80g) kullanıldı ve denekler 4 gruba ayrıldı: GRUP 1 (Kontrol Grubu, n=6): Hiçbir uygulamanın yapılmadığı gruptur. GRUP 2 (Çözgen Grubu, n=7): 20 gün boyunca subkutan olarak 0.2 ml susam yağı verilen ve 20 gün boyunca intraperitoneal olarak serum fizyolojik sıvı (0.2 ml) verilen gruptur. GRUP 3 (PKOS Grubu, n=7): 20 gün boyunca PKOS modeli oluşturmak amacıyla subkutan olarak 0.2 ml susam yağında çözölen 6mg/100g DHEA (Dehidroepiandrostenedion) verilen ve 20 gün boyunca intraperitoneal olarak serum fizyolojik sıvı (0.2 ml) verilen gruptur. GRUP 4 (PKOS + Kisspeptin-10, n=7): 20 gün boyunca PKOS modeli oluşturulmak amacıyla subkutan olarak 0.2 ml susam yağında çözölen 6mg/100g DHEA verilen ve 20 gün boyunca 100 nmol intraperitoneal olarak Kisspeptin-10 verilen gruptur. Deneklerin deney

başlangıcında, 20. günde ve deney sonunda kan örnekleri alınmıştır. Histokimyasal incelemeler için kesitler Hematoksilen-Eozin, MassonTrikrom, Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyandı. İmmünohistokimyasal olarak mTOR ve p-mTOR antikorları ile boyama yapıldı. Morfometrik incelemeler için; folikül sayıları, primer ve sekonder foliküllerin çapları ve granüloza tabakası kalınlığına bakıldı. Biyokimyasal incelemeler için kan plazma östradiol ve progesteron düzeyleri ELISA yöntemi ile incelendi. Gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak Kruskal Wallis ve Mann Whitney-U testleri ile değerlendirildi.

Bulgular:

Yapılan histokimyasal incelemelerde PKOS grubunda kontrol grubuna göre kistik ve atretik foliküllerin sayısında artış olduğu ve medulla bölgesindeki damar yapılarının genişlediği gözlemlendi. Kollajen miktarının ise tüm gruplarda benzer olduğu gözlemlendi. PKOS+Kisspeptin grubunda ise PKOS grubuna göre kistik ve atretik folikül sayısında azalma olduğu izlendi. Primer folikül çapı bakımından PKOS grubunda kontrol grubuna göre azalma olduğu izlendi, sekonder folikül çapı bakımından ise PKOS grubunda kontrol grubuna göre artış olduğu izlendi. Ancak PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında primer folikül çapında değişim olmadığı, sekonder folikül çapının ise PKOS grubunda arttığı gözlemlendi. Primer folikülün granüloza tabakası kalınlığı bakımından incelediğimizde, PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubunda kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlemlendi. Sekonder folikülün granüloza hücre tabakasında PKOS grubunda kontrol grubuna göre azalma olduğu; PKOS+Kisspeptin grubunun ise PKOS grubuna göre granüloza hücre tabakasının azaldığı izlendi. Yapılan immünohistokimyasal incelemeler sonucunda, PKOS grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında granüloza hücrelerinde mTOR immünopozitivitesinin azaldığı izlendi. PKOS+Kisspeptin grubunda ise PKOS grubuna göre mTOR pozitif hücrelerinin sayısında azalma olduğu gözlemlendi. p-mTOR immünopozitivitesinin ise PKOS grubunda kontrol grubuna göre artma olduğu, PKOS+Kisspeptin grubunda ise PKOS grubuna göre azalma olduğu izlendi. Biyokimyasal olarak incelendiğinde östradiol ve progesteron düzeylerinde kontrol grubuna göre PKOS grubunda artma olduğu, PKOS+Kisspeptin grubunda ise PKOS grubuna göre azalma olduğu gözlemlendi.

Sonuç:

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgulara dayanarak deneysel PKOS modelinde Kisspeptin-10'un kistik folikül sayısına, hücre proliferasyonunda etkili olan mTOR sinyal yolağının etkinliğinin azalmasına ve plazma östradiol ve progesteron düzeylerinin azalmasına yol açtığını gözlemledik. Bu bulgular ışığında kompleks bir hastalık olan PKOS'da Kisspeptin-10'un uygulamasının literatürde yeni çalışmalar için yol gösterici olacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: PKOS, ovaryum, mTOR, Kisspeptin



THE EFFECT OF KISSPEPTIN ADMINISTRATION mTOR MECHANISM IN EXPERIMENTALLY INDUCED POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

CANSU BEKDEMİR

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Development of Histology and Embryology,

Narlıdere, İZMİR

ABSTRACT

Objective:

In this study, we aimed to investigate in the experimental polycystic over syndrome, the effect of Kisspeptin-10 administration on the ovarian tissue of the mTOR signaling pathway involved in follicle development histochemistry, immunohistochemistry and biochemistry.

Method:

In our study; Twenty-seven 23-day-old Wistar strain female rats (50-80 g) were used and the subjects were divided into 4 groups: GROUP 1 (Control Group, n = 6): No application was performed to this animals. GROUP 2 (Solvent Group, n = 7): 0.2 ml of sesame oil administered subcutaneously for 20 days and intraperitoneally administered saline solution (0.2 ml) for 20 days. GROUP 3 (PCOS Group, n = 7): In order to establish PKOS model for 20 days; subcutaneously administered with 6 mg / 100 g of DHEA (Dehydroepiandrosterone) dissolved in 0.2 ml of sesame oil and administered intraperitoneally with saline solution (0.2 ml) for 20 days. GROUP 4 (PCOS+Kisspeptin-10, n = 7): Kisspeptin-10 administered intraperitoneally to 100 nmol for 20 days with subcutaneous 6mg / 100g DHEA dissolved in 0.2 ml of sesame oil to form a PCOS model for 20 days. Blood samples were taken at the beginning of the experiment, on day 20 and at the end of the experiment. Sections for histochemical studies were stained with Hematoxylin-Eosin, Masson Tricrom, Periodic Acid Schiff (PAS). Immunohistochemically stained with

mTOR and p-mTOR antibodies. For morphometric examinations; follicle counts, diameters of primary and secondary follicles, and granulosa layer thickness. Blood plasma estradiol and progesterone levels for biochemical studies were examined by ELISA. Differences between the groups were evaluated statistically by Kruskal Wallis and Mann Whitney-U tests.

Results:

It was observed that the number of cystic and atretic follicles in the PCOS group increased and the vascular structures in the medulla region expanded in histochemical examinations. The amount of collagen was observed to be similar in all groups. In the PCOS+Kisspeptin group, there was a decrease in the number of cystic and atretic follicles according to the PCOS group. In terms of primary follicle diameter, it was observed that there was a decrease in the PCOS group compared to the control group, and as to the secondary follicle diameter, there was an increase in the PCOS group compared to the control group. However, when the PCOS and PCOS+Kisspeptin groups are compared, there was no change in the diameter of the primary follicle, and the diameter of the secondary follicle was increased in the PCOS group. When we examine the thickness of the granulosa layer of the primary follicle; PCOS and PCOS+Kisspeptin group were observed to be decreased according to the control group. There is a decrease in the PCOS group of the saccharide follicle compared to the control group in the granulosa cell layer; It was observed that the granulosa cell layer of PCOS + Kisspeptin group decreased according to the PCOS group. As a result of the immunohistochemical studies made; when the control group was compared with the PCOS group, it was observed that the mTOR immunopositivity decreased in the granulosa cells. In the PCOS + Kisspeptin group, there was a decrease in the number of mTOR positive cells compared to the PCOS group. p-mTOR immunopositivity in the PCOS group; Compared to the control group, it was observed that there was a decrease in PCOS+Kisspeptin group compared to the PCOS group. When biochemically analyzed, it was observed that the levels of estradiol and progesterone were increased in the PCOS group compared to the control group, and that in the PCOS+Kisspeptin group was decreased compared to the PCOS group.

Conclusion:

Based on the findings of our study; we observed that in the experimental PKOS model, the number of cystic follicles of the Kisspeptin-10 decreased, the efficiency of the mTOR signaling pathway, which is effective in energy metabolism and proliferation in the cell, decreased and the levels of plasma estradiol and progesterone hormones were decreased at high levels. We believe that the application of Kisspeptin-10 in PKOS, a complex disease in these findings, will provide guidance for new studies.

Key Words: PCOS, ovary, mTOR, Kisspeptin



1.GİRİŞ VE AMAC

Polikistik over sendromu (PKOS) merkezi sinir sistemi, hipofiz, overler, adrenal bezler ve ekstrasgladuler dokular arasındaki etkileşimlerin bozulması sonucu; üreme çağıının herhangi bir döneminde ortaya çıkan kronik seyreden, yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilen kompleks bir hastalıktır. Sendromun prevalansı %5-10 olarak bildirilmektedir.

PKOS genellikle peripubertal dönemden itibaren başlamakta olup, gonadotropin dinamiğinde değişiklikler, steroidogenez defektleri, insülin salınımı ve genetik faktörlere bağlı olarak menstrüel siklus düzensizliği (anovulasyon, oligo-amenore, disfonksiyonel uterus kanaması), hiperandrojenizm bulguları (hirsutizm, akne, ciltte yağlanma) ve infertilite ile karşımıza çıkmaktadır (1, 2).

PKOS'lu hastalarda luteinizan hormon (LH) seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek LH seviyesinin bu hastalarda; oosit maturasyonu ve fertilizasyon oranlarını, embriyo kalitesini ve gebelik oranlarını düşürdüğü ve gebelik kayıplarının artmasına neden olduğu bilinmektedir. Folikülogenez esnasında LH'ın fazla salınımı folikül uyarıcı hormonu (FSH) ile baskılanmakta, anormal granüloza hücre fonksiyonu meydana gelerek prematüre granüloza hücre luteinizasyonu, foliküler atrezi, oosit maturasyonu inhibitörlerinin baskılanması ile prematüre oosit maturasyonuna neden olmaktadır (3).

PKOS'da lipid metabolizmasında meydana gelen düzensizlikler kadınların aşırı kilo almasına neden olmaktadır. PKOS'daki bu bulgular, hücrenin enerji metabolizması ile direkt ilişkide olan mTOR (the mammalian target of rapamycin) sinyal mekanizmasına etki etmektedir. mTOR bir serin-trionin protein kinazdır. Beslenmenin bozulması ya da stres durumunda mTOR aktivitesinin ve hücrenin hacminin azaldığı, otofajinin indüklendiği gözlenmiştir (4).

mTOR aktivasyonu çeşitli büyüme faktörleri, besinler, hormonlar (insülin benzeri büyüme faktörü, leptin) ve stres koşulları tarafından düzenlenip, hücre proliferasyonu ve metabolizmasında önemli rolleri vardır (5, 6).

PKOS'da stres ve beslenme bozukluğu (PKOS'lu hastalarda yaygın olarak izlenen obezite sorunu), hormonal dengenin bozulması, mTOR mekanizmasını etkileyerek kistik yapıların gelişmesine ve ovulasyonun gerçekleşmemesine neden olmaktadır (7).

mTOR; fosfatidilinozitol3-kinaz (PI3K) aktivasyonunun sinyal iletiminde etkili temel bir kinazdır. Bu ailenin üyeleri hücre büyümesinin kontrolü, hücre siklusu, deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı kontrol noktaları ve rekombinasyon ya da telomer uzunluğunun korunması gibi temel hücresel fonksiyonlarda rol alırlar. PI3K ilişkili kinazlarda meydana gelebilecek bir fonksiyon bozukluğu neticesinde çeşitli kanser türlerinden immün yetmezliğe kadar çok sayıda hastalık ile karşılaşmaktadır (8).

Granüloza hücrelerinde mTOR sitoplazma ve nukleus etrafında bol bulunmaktadır. mTOR'un kinaz aktif serin 24-48 fosforile formu yani aktif olan formu p-TOR ise genellikle M fazında yüksek seviyede bulunmaktadır (7).

Kisspeptinler, KISS-1 olarak adlandırılan gen tarafından transkribe edilen bir öncül proteinden türeyen ve reseptörü GPR54 olan hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı etkileyerek gonadotropin salınımının kontrolünde anahtar rolleri olan ve pubertenin başlamasını sağlayan G protein bağlantılı reseptörler ailesinin bir üyesidir (9).

Metastaz baskılayıcı gen olarak bilinen KISS-1 geninin kodladığı ve C terminallerinde ortak RF-amid (Arg-Phe-NH₂) dizileri taşıyan 54, 14, 13 ve 10 aminoasitlik kisspeptin formları GPR54 reseptörüne bağlanarak agonist etki göstermektedir (10). Kisspeptin, gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) nöronları üzerindeki KISS1r'ye bağlanarak GnRH salınımını tetiklemekte LH ve FSH düzeylerinde artışa yol açmaktadır (11).

Kisspeptin intraserebroventriküler, intravenöz, intraperitoneal ya da subkutan yollar ile uygulandığında, LH ve FSH salınımını uyardığı gözlenmiştir (12).

Literatürde polikistik over sendromunda Kisspeptin-10 uygulamasının mTOR mekanizmasının etkisine ait bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada deneysel polikistik over sendromu oluşturulmuş sıçanlarda intraperitoneal Kisspeptin-10 uygulamasının mTOR mekanizmalarına etkisine immünohistokimyasal olarak bakılacaktır. Polikistik over sendromunu tedavisinde Kisspeptin-10 uygulamasının literatüre katkısı olacağı düşünülmektedir.

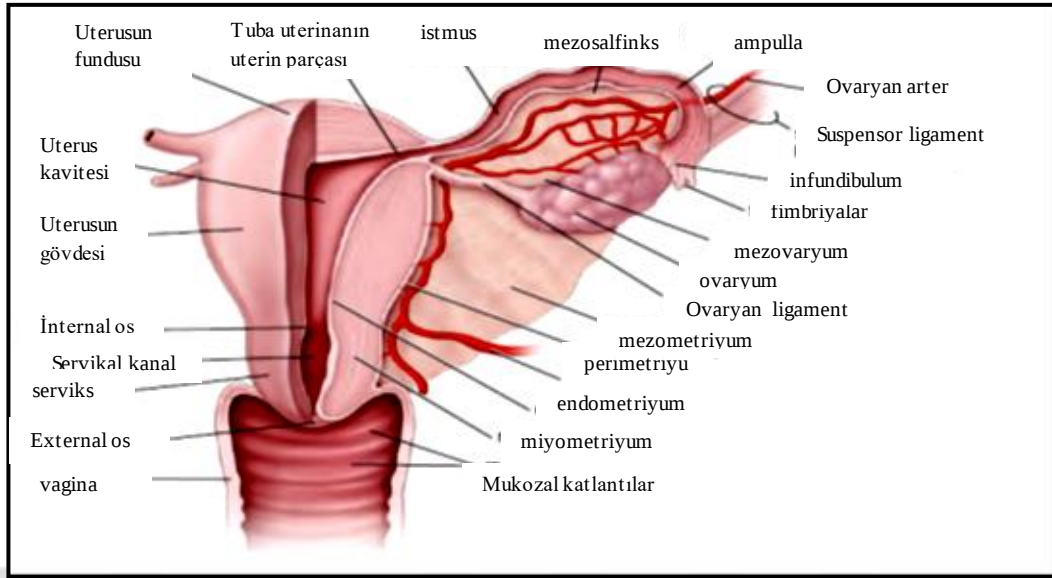
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi, iç (internal) genital organlardan ve dış (eksternal) genital organlardan oluşmaktadır. Dişi iç genital organları; pelviste yer alan ovaryumlar, tuba uterinalar (ovudükt veya fallop tüpleri), uterus ve vagina oluşturmaktadır. Dişi dış genital organları ise perineumun vulva adı verilen anterior bölgesinde olup mons pubis, labiyum majuslar ve minuslar, klitoris, vestibül, vagina açıklığı ve himen oluşmaktadır (Şekil 1).

Meme bezleri ve plasenta, genital organ olmamakla birlikte fonksiyonel olarak genital sistem ile ilişkilidirler.

Dişi üreme sisteminin temel işlevi dişi eşey hücreleri olan gametlerin üretimi ile embriyo ve fetüs evrelerinden doğuma kadar döllenmiş oositi taşımaktır. Ayrıca üreme sisteminin organlarını kontrol eden ve vücudun diğer organları üzerinde etkileri olan eşey hormonlarını da üretir. İlk menstrüasyon kanamalarının meydana geldiği menarştan (ilk adet) başlayarak üreme sistemi yapı ve işlevsel etkinlik bakımından siklik (döngüsel) değişiklikler gösterir. Bu değişiklikler hormonlar tarafından kontrol edilir. Menapoz ile siklik değişiklikler düzensizleşir ve sonuçta tümüyle ortadan kalkar. Menapoz sonrası dönemde üreme sisteminde yavaş bir gerileme görülür (13,14).



Şekil 1: Kadın iç genital organların şematik çizimi (15)

2.2. Ovaryum

2.2.1. Ovaryum Embriyolojisi

2.2.1.1. Gonadların Oluşumu

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositi döleyen sperm türüne bağlı olarak fertizasyonda (döllenmede) belirlenir. Erkek ve dişi morfolojik karakteristikler, embriyonun 7. haftasına kadar gelişime başlamazlar. Genital sistem erken dönemde her iki cinsten de birbirlerine benzer olduğundan genital sistemin gelişimin başlangıç evresi seksüel gelişimin farketilmemiş safhası olarak adlandırılır (16,17)

Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar:

1. Posterior abdominal duvarı döşeyen sölom epiteli (mezodermal epitel)
2. Sölom epitelinin altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
3. Primordiyal germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri) (PGH)

Gonad gelişiminin ilk safhalarının 5. haftasında, mezonefrozun medialinde, sağ ve solda, sölom epitelinin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması ile uzunluğuna

iki adet gonadal ya da genital kabartı (genital ridge) oluşur. Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital kabartı içerisinde germ hücreleri yer almazlar (Şekil 2).

Her iki gametin öncülleri embriyo dışı kökene sahiptirler. Primordiyal germ hücreleri ilk kez 4. hafta başında vitellüs kesesi (yolk ya da umbilikal kese) duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar (17).

Embriyonun katlanması sırasında, vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu katılma olaylanırken 4. ve 6. haftalar arasında, yaklaşık 10-100 primordiyal germ hücresi ameboid hareketlerle vitellüs kesesinden arka bağırsak ve mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına göç ederler.

Primordiyal germ hücrelerinin bu göçü Stella, Fragilis genleri ve Kemik Morfojenik Protein (BMP-4) tarafından düzenlenir (17). Arka vücut duvarında yaklaşık olarak 2500-5000 primordiyal germ hücresi 10.toraksik vertebra seviyesinde mezenşim içinde bulunurlar ve mezenşim hücreleriyle sölomik örtü epitelinin hücrelerini, bir çift genital kabarıklık oluşturmak üzere çoğalmaları için uyarırlar (18). Çoğalan sölom epitelinin hücreleri, altındaki mezenşime doğru düzensiz primitif cinsiyet kordonlarını meydana getirirler (19). Primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır ve bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya (ovarian medulla) bırakırlar. Dişi gonadın yüzey epiteli çoğalmaya devam eder ve yüzeye yakın kalmaya devam ederek kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonlar gelişir (20).

Kortikal kordonların boyutları arttığında primordiyal germ hücreleri onların içine girerler ve yaklaşık 16. haftada bu kordonlar izole hücre kümelerine parçalanarak primordiyal germ hücrelerinden köken alan bir oogonium ve onu çevreleyen yüzey epitelinden köken alan tek sıralı yassılaşmış folikül hücrelerini içerir (16, 20).

2.2.1.2. Cinsiyetin Farklanması

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, X kromozomuna sahip ovumun X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile fertilizasyonuna bağlıdır. 7. haftadan önce gonadların görünümü her iki cinste de birbirine benzer olduğu için farklanmamış gonad olarak isimlendirilir. Dişi fenotipinin gelişmesi için XX kromozomu gereklidir. Cinsiyetin belirlenmesinde X kromozomu üzerindeki pek çok gen ve bölgenin özel rolleri vardır.

Farklanmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirleyen kısa kolunda (Yp11) SRY genini (sex determining region on Y) taşıyan Y kromozomudur. Bu genin protein ürünü rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. Bu faktörün varlığı ile fetusun cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda da kız tipinde gelişir (16, 20). XX gonadın gelişimi birbirinden bağımsız olan Rspo1/Wnt4/ β -catenin yolağı ve Foxl2 transkripsiyon faktörünün Sox9 ve Fgf9 (fibroblast büyüme faktörü 9) transkripsiyon faktörlerinin inhibe edilmesine bağlı olarak gelişir (21).

2.2.2. Ovaryumun Anatomisi

Ovarium, uterusun her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda fossa ovarica adı verilen çukurlara yerleşik, badem şekilli, yaklaşık olarak 3-8 g ağırlığında, 3-5 cm uzunlukta 1.5-3 cm genişlikte ve 1-1.5 cm kalınlıkta olan bir çift organdır. Fossa ovarica, a. iliaca externa ile a. iliaca interna arasında yer alır. Fossa ovarica, alttan ve önden, lig. latum uteri'nin tabanı; yukarıdan, a. iliaca externa ve arkadan üreterler ile sınırlıdır. Çukurun dibinde ve peritonun altında a.- v. obturatoria ile n. obturatorius geçer (22).

Ovarium'ların anatomik olarak, facies lateralis ve facies medialis olmak üzere iki yüzü; margo liber ve margo mesoovaricus olarak iki kenarı; extremitas tubaria ve extremitas uterina olarak da iki ucu vardır (22).

2.2.2.1. Ovarium Arterleri

Aorta abdominalis'ten çıkan a. ovarica'lardır. A. ovarica, lig. suspensorium ovarii içerisinden ilerler. Daha sonra mesovarium'a gelir ve a. uterina'nın bir dalı olan ramus ovaricus ile anastomoz yapar. Ovarium'a arter, hilus ovarii'den girer, folliküllerin çevresinde zengin kapiller ağırları oluşturur. Damarlar folliküllerin gelişiminde genişler, ovulasyonda ise daralırlar (22, 23).

2.2.2.2. Ovarium Venleri

Venler, arterleri izleyerek hilum ovarii'den çıkarlar. Bu venler plexus pampiniformis denilen venöz ağı oluştururlar. Bu ağdan ayrılan venlerin bir bölümü plexus uterovaginalis'e, diğerleri ise lig. suspensorium ovarii içerisindeki v. ovarica'ya açılırlar. Sol v. ovarica v. renalis'e, sağ v. ovarica ise v. cava inferior'a açılır (22, 23).

2.2.2.3. Ovarium Lenf Damarları

Lenf damarları, lenf kapilleri olarak başlar ve kan damarları ile birlikte uzanırlar. Nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere açılırlar (22, 23).

2.2.2.4. Ovarium'un Sinirleri

Ovarium'un sinirleri, plexus hypogasticus inferior ve a. ovarica'nın çevresindeki plexus ovaricus'dan gelir. Parasempatikleri n. vagus'tan, sempatikleri ise n. splanchnicus minör ve bir kısmı torakal medulla spinalis segmentlerinden gelir (22, 23).

2.2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum en dıştan tek katlı yassı epitelden alçak boylu kübik epitele kadar değişkenlik gösteren bir epitel ile sarılmıştır. Ovaryum yüzeyindeki bu epitel tabakası, geçmişte embriyonik gelişim sırasında germ hücresi oluşum bölgesi olduğunun düşünülmesinden dolayı germinal epitel olarak adlandırılmıştır. Ancak şimdi, primordiyal germ hücrelerinin ekstragonadal kökenli olduğu ve embriyonik yolk kesesinden embriyonik gonadın korteksinin içine göç edip burada farklılaşarak ovaryumun farklılaşmasını indükledikleri bilinmektedir. Epitelin altında damardan fakir, sıkı kollajenöz bağ dokusundan yapılmış tunika albuginea bulunur. Enine kesitlerde her bir ovaryum'un sınırları kesin ayırt edilmeyen içte medulla, dışta korteks olarak iki bölümü ayırt edilir (18, 24) (Şekil 2).



Şekil 2: Ovaryum Histolojisi. İç kısmında medulla bölgesi onu çevreleyen korteks bölgesi gösterilmektedir (13).

2.2.3.1. Ovaryum Korteksi

Korteks, medullayı çevreleyecek şekilde ovaryum'un periferik bölgesinde yer alır (15). Stroma ve çeşitli gelişim evrelerindeki ovaryum foliküllerinden oluşur. Stroma, kollajen ve elastik lifler, retiküler lif ağları ve iç biçimli bağ dokusu hücrelerinden (fibroblastlar) yapılmıştır (14).

2.2.3.2. Ovaryum Medullası

Ovaryumun ortasında yer alan medulla fibroblastlar, elastik ve kollajen lifler içeren gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Medulla da ayrıca geniş kan ve lenf damarları ile sinirler bulunur. İnsan ovaryum medullasında menstrüasyon öncesi östrojen salgılayan küçük gruplar halinde epitelooid interstisyel hücreler yer alır. Yaşamın ilk yıllarından başlayarak ve ergenlik çağının erken evreleri süresince foliküller atreziye koştut olarak interstisyel hücrelerin sayısı artar ve interstisyel bezler oluşur. Ovaryum medullasındaki bir diğer epitelooid hücre grubu ise hilus hücreleridir. Hilus hücreleri organel dağılımı ve sitoplazmik içerikleriyle testislerdeki Leydig hücrelerine benzerler. Bu hücrelerden androjen salgılandığı bildirilmiştir. Gebelik ve menapozda çok belirginleşirler (15, 24, 25).

2.2.4. Foliküler Gelişim (Folikülogenez)

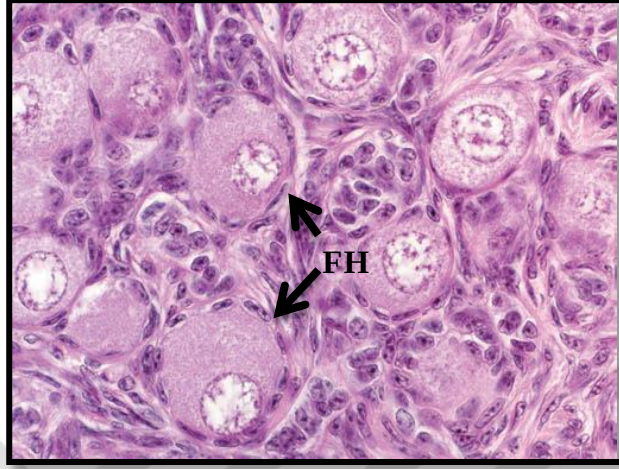
Gelişim evrelerine göre histolojik olarak 3 temel ovaryum folikülü tanımlanabilir (15):

1. Primordiyal Foliküller
2. Büyümekte Olan Foliküller
 - 2.1. Primer Folikül
 - 2.2. Sekonder (antral) Folikül
3. Olgun (Graaf) Folikül

2.2.4.1. Primordiyal Foliküller

Folikül gelişiminin en erken evresi primordiyal foliküllerin farklanması ile başlar. Primordiyal foliküllerin erken gelişimi gonadotropin stimülasyonundan bağımsız olarak gerçekleşir. Primordiyal foliküllerin gelişebilmesi NGF (nerve growth factor) ve SPO11

(spondation protein homolog 11) gibi faktörlerin etkisi ile gerçekleşir. Bunun dışında birçok büyüme faktörü de rol oynamaktadır. Kök hücre faktörü, lökemi inhibitör faktör, insülin gibi faktörler primordiyal hücre büyümesini artırmaktadır.



Şekil 3: Primordiyal folikül fotomikrografı. Tek tabakalı yassı folikül hücreleri (FH) tarafından çevrelenmiş oosit gösterilmektedir (15).

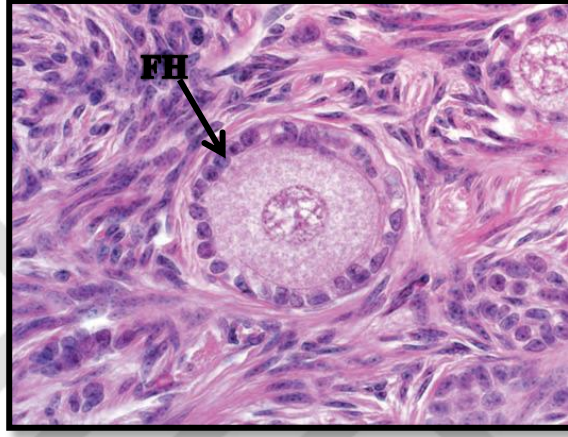
Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yer alırlar. Primordiyal foliküllerdeki primer oositler, 30 mikrometre (μm) büyüklükte olup bir veya birden fazla nukleolus içeren eksantrik büyük nukleusa sahiptirler. Oositin ooplazma adı verilen sitoplazması Balbini cisimciği içermektedir. Balbini cisimciği golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun ve çok sayıda mitokondriyonların ve lizozomların oluşturduğu bir kümedir. Primer oositler ince bir bazal lamina üzerine oturmuş tek katlı yassı folikül epiteli ile çevrilidirler (14, 15) (Şekil 3).

2.2.4.2. Büyümekte Olan Foliküller

2.2.4.2.1. Primer Folikül

Primordiyal folikül büyüyen folikül evresine geldiğinde oosit, folikül hücreleri ve stromada değişiklikler oluşmaya başlar. Bu evrede Kit ligand (KL), lökemi inhibitör faktör (LIF), kemik morfojenik protein 4 ve 7 (BMP4; 7), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü 2 ve 7 (FGF- 2;7)'in de içinde bulunduğu birçok faktörün düzenleyici rolü bulunmaktadır. Oositin büyümesi ile oositin etrafını saran yassı folikül hücreleri proliferasyon olarak kübik hale gelirler.

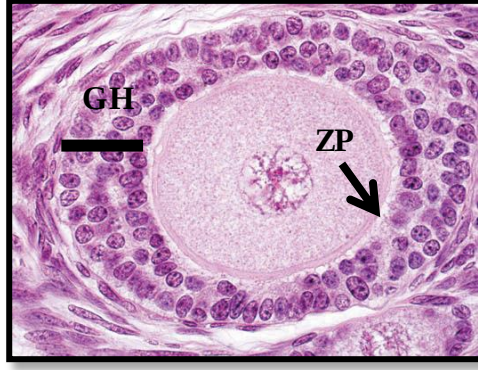
Folikül hücrelerinin kübik hale geldiği bu evrede folikül primer folikül olarak adlandırılır (15). Tek katlı kübik folikül hücre katmanı içeren foliküller tek katmanlı (ünilaminer) primer folikül olarak adlandırılır (Şekil 4). Folikül hücreleri çoğalmayı sürdürür ve çok katlı foliküller epitelî ya da granüloza tabakasını (stratum granulosum) oluştururlar. Folikül hücreleri artık granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. Buradaki hücreler gap junction aracılığıyla iletişim kurar ve bu durumdaki folikül çok katmanlı (multilaminer) primer folikül ya da preantral folikül olarak adlandırılır (13) (Şekil 5).



Şekil 4: Primer folikül fotomikrografı. Oositi çevreleyen tek katlı kübik folikül hücre (FH) tabakası gösterilmektedir (15).

Oosit büyüdükçe etrafındaki folikül hücreleri tarafından özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek asidofilik, ışık kırıcı ve homojen bir tabaka olan zona pellusida oluşur. Zona pellusida ışık mikroskobunda ilk olarak oositin etrafı kübik veya prizmatik folikül hücreleri ile çevrelendiğinde ve oositin çapı 30-50 μm 'ye ulaştığında gözlenir (15, 26).

İnsanda zona pellusida sülfatlı üç asidik zona pellusida (ZP) proteinlerinden oluşur. Bunlar 200 kDa ağırlığında ve dimerik yapıda olan ZP1; 120 kDa ağırlığında olan ZP2 ve 83 kDa ağırlığında olan ZP3'dür. Üçü arasında spermatozoa- bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyon indükleyici olan ZP3 en önemlisidir. Işık mikroskobunda zona pellusida asidofilik boyalarla ve periyodik asit schiff (PAS) boyası ile koyu boyanır (15, 18).



Şekil 5: Çok tabakalı primer folikülün fotomikrografı. Oositi çevreleyen çok katlı granüloza hücreleri (GH) görülmektedir. Oosit ile folikül hücreleri arasında zona pellusida (ZP) yapısı bulunmaktadır (15).

Granüloza hücreleri proliferasyona uğrayınca folikülün çevresindeki stromal hücreler, bazal laminanın hemen dışında teka adı verilen bir bağ dokusu hücre kılıfı oluşturur. Teka tabakası geliştikçe iki tabakaya farklılaşır:

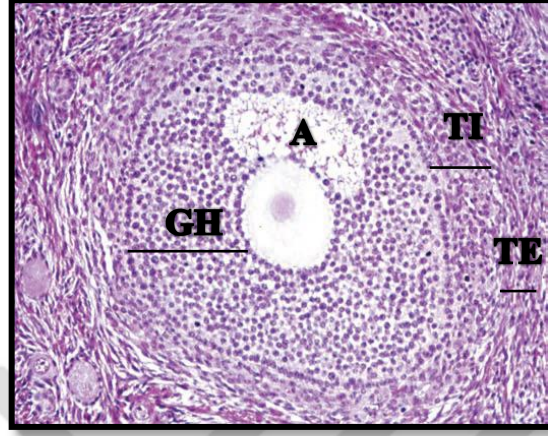
İç kısımda yer alan teka interna tabakası, kübik salgı yapan hücrelerden ve oldukça damarlanmış bir tabakadan oluşur. Teka interna hücreleri önceleri fibroblast benzeri hücrelerdir. Sonraki gelişme basamaklarında tamamen farklılaşarak steroid üreten hücreler haline gelirler. Bu hücreler çok sayıda LH reseptörü taşırlar. LH uyarımına yanıt olarak, östrojen prekürsörleri olan androjenleri sentezlerler ve salgırlar. Teka interna tabakası salgı hücrelerine ek olarak fibroblastlar, kollajen demetleri ve endokrin organların tipik özelliği olan zengin bir dolaşım ağına sahiptir.

Teka eksterna; dışta bulunan, düz kas hücreleri ile kollajen lif demetlerini içeren tabakadır. İki teka katmanı arasında kesin sınır belirgin değildir. Buna karşılık, granüloza tabakası ile teka interna tabakası arasındaki bazal lamina belirgin bir sınır oluşturmaktadır (13, 14, 15, 25).

2.2.4.2.2. Sekonder Folikül

Foliküller esas olarak granüloza hücrelerinin boyut ve sayılarının artması ile büyürler. Granüloza tabakası 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında hücrelerin arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlar. Hyaluronan bakımından zengin bu sıvı likör folikülü olarak adlandırılır. Bu sıvı dolu kaviteler birleşerek antrum adı verilen hilal biçimli tek bir kavite

oluşur. Folikül sekonder ya da antral folikül olarak adlandırılır (Şekil 6). Folikül sıvısı glikozaminoglikan, steroid-bağlayıcı proteinler, hormonlar, büyüme faktörleri, antioksidanlar ve steroidler bakımından zengindir (13, 15).



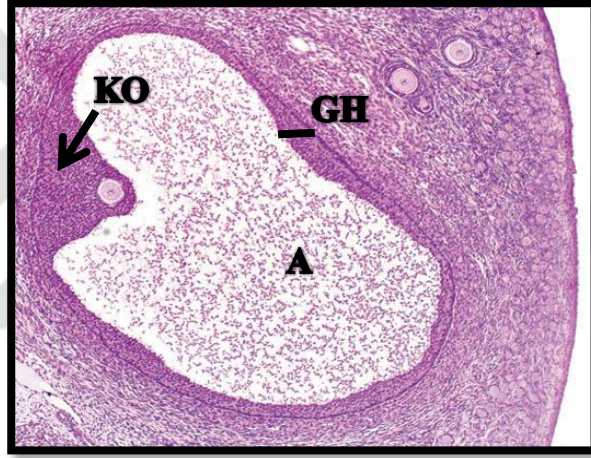
Şekil 6: Sekonder folikül fotomikrografi. Granüloza hücre tabakası (GH) içinde bulunan ve foliküler sıvı ile dolu olan antrum (A) görülmektedir. Sekonder folikülün bazal laminası dışında teka interna hücreleri (TI) ve teka eksterna hücrelerinin (TE) oluşturduğu çoklu tabakalar görülmektedir (15).

Yaklaşık 125 µm çapında, eksantrik yerleşimli oosit daha fazla büyümmez. Foliküler sıvının ilk ortaya çıktığı erken sekonder folikül de çapı 0.2 mm olan folikül, büyümeye devam eder ve çapı 10 mm ya da daha fazlasına ulaşır. Sekonder folikülün boyutu arttıkça antrum genişler ve granüloza hücre sırası farklılıklar gösterir. Primer oosit ile bağlantılı olduğu bölgede kalın, diğer bölgelerde ince ve eşit dağılım gösterir. Oosit çevresinde granüloza hücrelerinin oluşturduğu kümeye kumulus ooforus, kumulus ooforusun oositi çevreleyen ve ona en yakın konumda olan granüloza hücrelerine korona radyata denir. Bu hücreler ovulasyonda oosit ile birlikte atılır (14, 15, 25).

Belli bir çapa ulaşıp içinde antrum oluşan foliküller bu aşamadan sonra hormonlara bağımlı hale gelirler ve devam edebilmek için gonadotropinlere gereksinim duyarlar. Dominant (baskın) folikülün seçilebilmesi için insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I), vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGFs), BMPs, FSH ve LH'nin varlığında gerçekleşir (14, 15, 27).

2.2.4.3. Graaf (Olgun) Folikül

Genital siklusun 14. gününde maksimum büyüklüğe ulaşan sekonder folikül ovaryum korteksinin tüm kalınlığını kaplayarak yüzeyinde büyük veziküller oluştururlar. İçlerindeki artan folikül sıvısı nedeniyle granüloza hücre tabakası incelir (Şekil 7). 10 mm veya daha fazla çapta olan bu foliküllere olgun ya da graaf folikül adı verilir. Folikül büyümesinin son aşamasında, kumulus ooforus granüloza hücrelerinde mitoz bölünme azalmaya başlar. Hücreler arasında içi sıvı dolu boşlukların oluşması ile kumulus ooforus granüloza hücreleri ile oosit arasındaki bağlantı gevşer ve ovulasyona hazırlanır. Sonunda primer oosit, zona pellusida ve korona radiata hücreleri ile birlikte kumulus ooforustan ayrılırlar ve folikül boşluğunda serbest hale gelirler.



Şekil 7: Graaf folikülünün fotomikrografı. İçi sıvı dolu geniş antrum (A) yapısının etrafını çevreleyen granüloza hücre tabakası (GH) ve kumulus ooforus (KO) yapısı gösterilmiştir.

Folikül gelişiminin bu evresinde teka tabakaları daha belirgin hale gelir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıkları birikerek poligonal (çok köşeli) tipik steroid sentezleyen hücre görünümü kazanırlar. Granüloza hücrelerinin teka internadan ayıran folikül bazal laminası, kalınlaşarak membrana vitrea adını alır. Bu dönemde oositin büyümesi, folikül hücrelerinin çoğalması durur. Primer oosit çekirdeğine veziküla germinativa (GV), nukleolusuna ise makulla germinativa denir. Primer oosit sitoplazmasında çok sayıda vitellin granüller bulunur (13, 14, 15, 25).

2.2.5. Oogenezis

Oogonia denilen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesi ile gerçekleşen olaylar dizisine oogenezis denir (16). Oogenezisi doğum öncesi ve doğum sonrası olgunlaşma olarak ikiye ayırmak mümkündür.

2.2.5.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (Prenatal Maturasyon)

Primordiyal germ hücreleri (PGH), dişi gonada ulaşınca oogoniumlara farklırlar. Mitozla çoğalan oogoniumlar kümeler oluştururlar (20). Bu göç ve ardından gelen çoğalma, bir tirozin kinaz reseptörü olan c-kit ile ona bağlanan hücre membran ligandı olan kök hücre faktörü tarafından kontrol edilir. Hem c-kit reseptörü hem de kök hücre faktörü göç boyunca primordiyal germ hücreleri tarafından üretilir (18). 3. ayın sonunda yassı epitel hücreleri ile çevrenirler. Bu küme içerisinde yer alan oogoniumların tümü muhtemelen tek bir ilkel üreme hücresinden gelişirken, folikül hücreleri olarak bilinen oogoniumların çevresindeki yassı epitel hücreleri overin yüzey epitelinden köken alırlar (20).

Oogoniumların çoğunluğu mitoz ile bölünmeyi sürdürürken, bir kısmının ise hemen DNA'ları replike olur ve I. Mayoz bölünmenin profazındaki diploten aşamasında durarak primer oositlere farklırlar. Bundan sonraki birkaç ay içerisinde oogoniumların sayısı artar ve gelişimin 5. ayında over içerisindeki üreme hücrelerinin sayısı yaklaşık 7.000.000'a ulaşır. Bu dönemde, hem primer oositlerde hem de oogoniumlarda atrezi gözlenir. Yedinci ayda over yüzeyine yakın yerleşmiş olanların dışında oogoniumların çoğunluğu dejenere olmuş olur. Hayatta kalan primer oositlerin tümü birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve her biri ayrı ayrı tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşmuş tabaka ile sarılarak primordiyal folikül adını alır.

2.2.5.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturasyon)

Doğumda tüm primer oositler I. Mayoz bölünmenin profazının diploten evresindedir. Bu evrede oosit I çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılanma gösterdiği istirahat (dinlenme) evresine girer. Primer oositler, puberteye kadar dinleme evresinde kalırlar ve I. Mayoz bölünmelerini tamamlamazlar. Bu süre boyunca, oosit olgunlaşması folikül hücrelerince salgılanan oosit olgunlaşmasını baskılayıcı madde (OMI) ile baskılanır. Doğumda ovaryumlardaki primer oosit sayısı 700.000 ile 2.000.000 arasında değişir.

Puberteye değin bunların büyük çoğunluğu atretik hale geldiğinden, puberte başlangıcındaki bu sayı 400.000'e düşer ve 500'den daha azı ovulasyon ile atılır. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde dejenere olup atretik foliküller haline gelir. Geç olgunlaşan oositlerin bazıları 40 yıl süresince I. Mayoz bölünmenin profaz evresinde bekler.

Pubertenin başlaması ile dişi gonad; primordiyal foliküllerden beslenen bir folikül havuzu işlevi görür. Her ovaryal döngüde bu havuzdan seçilen 5 ile 15 arasında değişen primordiyal folikül, primer (preantral), sekonder (antral) ve Graaf (tersiyer, preovulatuvar) olarak adlandırılan 3 aşamadan geçerek olgunlaşmaya başlar. Bunlar arasında en uzun olanı antral folikül evresidir.

Preovulatuvar evre yaklaşık 37 saat sürer. I. Mayoz bölünmenin diploten evresinde dinleme aşamasında olan primer oosit büyümeye başlar. Oosit'i çevreleyen yassı epitel hücreleri önce kübikleşir. Bu foliküle gelişen (unilaminar) primer folikül denir. Daha sonra kübik biçimli folikül hücreleri çoğalarak çok sıralı epitel katmanını oluştururlar. Buna granüloza katmanı (stratum granulosum) denir. Bu biçimi alan foliküle multilaminar (preantral) pimer folikül adı verilir. Granüloza hücrelerinin çoğalması primer oositlerce salgılanan 'aktivin' denilen sinyal molekülünce sağlanır.

Primer folikül çevresinde, stromal hücre ve bağ dokusu yoğunlaşarak teka folikülü denilen bir kılıf oluştururlar. Bu arada granüloza hücreleri ve oosit glikoprotein yapıda bir madde salgılayarak oositin çevresinde zona pellusida denilen bir katman oluşturur. Folikül büyümeyi sürdürürken teka folikül hücreleri, içte salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve dışta fibroblast benzeri hücreler içeren bağ dokusundan yapıllı, fibröz bir kapsül olan teka eksterna adlı iki belirgin katman şeklinde farklanır. Aynı zamanda oositin çevresindeki folikül hücrelerinin küçük sitoplazmik uzantıları, zona pellusidayı geçerek oositin mikrovilluslarıyla gap-junctionlar aracılığıyla bağlantı kurarlar.

Gelişme ilerledikçe granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Bu boşlukların birbirleriyle birleşmesi ile antrum oluşur. Bu foliküle sekonder (antral) folikül denir. Başlangıçta küçük hilal görünümünde olan antrum zamanla genişler. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri kümülüs ooforus'u oluştururlar. Olgun bir sekonder folikül 10 mm ya da daha fazla çaptadır. İçte steroid salgı oluşturan hücrelerden yapıllı teka interna ve dışta teka

eksterna ile sarılıdır. Teka eksterna derece derece ovaryum stromasına karışır. Folikül ovulasyona yakın daha da büyür ve Graaf (tersiyer, preovulatar) folikül olarak adlandırılır.

Her menstrüel döngüde bir grup folikül gelişmeye başlasa da, bunlardan ancak bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde dejenere olarak atretik hale gelirler. Sekonder folikül olgunlaştıktan sonra LH etkisiyle ovulasyon öncesi (preovulatar) evreye girer. Primer oosit I. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak büyüklükleri farklı, ancak her biri 23 çift yapılı (2nDNA) kromozom içeren iki yavru hücre oluşturur. Bu hücrelerden biri sitoplazmanın büyük bölümünü alan sekonder oositir, diğeri ise çok az sitoplazma içeren I. kutup cismidir. Kutup cismi oositin; hücre zarıyla zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. I. Mayoz bölünme ovulasyondan hemen önce tamamlanır. I. Mayoz bölünmenin tamamlanmasından hemen sonra ve sekonder oositin çekirdeği dinlenme evresine geçmeden önce, DNA eşleşmesi olmaksızın hücre II. Mayoz bölünmeye girer. Sekonder oositin bölünme mekiği oluşur. Kromozomlar ovulasyondan 3 saat önce metafaz plağında dizildiklerinde ovulasyon gerçekleşir ve oosit dışarıya atılır. II. Mayoz bölünme ancak sekonder oositin, bir spermium ile döllenirse tamamlanır. Döllenme olmazsa ovulasyondan 24 saat sonra sekonder oosit dejenere olur. Böylece ovaryum'da oögonyum'lerden sekonder oosit oluşuncaya kadar gerçekleşen değişimlere Oögenesis denir (14, 15, 24, 25).

2.2.6. Ovulasyon

Ovulasyon puberteden menapozu kadar 28 günde bir olaylanır. Ovulasyon döngünün 14. gününde gerçekleşir.

Menstrüel döngünün 14. gününde gelişmekte olan Graaf folikülünün granüloza ve teka hücrelerinden salınan östrojen nedeniyle kandaki östrojen düzeyi artar. Östrojen düzeyinin artması ile uterus endometriyumunun proliferatif evreye girmesi hipofizi LH salgılanması için uyarıp, FSH salgılanmasını baskılar. Kan LH düzeylerindeki artıştan sonra birkaç dakika içerisinde ovaryumun kan akımında bir artış görülür ve kapiller ve postkapiller venüllerden plazma proteinleri sızarak ödeme yol açar. Bu proteinler prostaglandinler, histamin, vazopressin ve kolajenazdır. Granüloza hücreleri daha fazla hiyaluronik asit üretir ve gevşek bir hal alırlar. Folikül duvarının küçük bir kısmı, tunika albugineadaki kollajen yıkımı, iskemi ve bazı hücrelerin ölmesi nedeniyle zayıflar. Foliküler sıvı basıncındaki artış ve büyük olasılıkla düz kas hücrelerinin kasılmasıyla birlikte bu zayıflama, folikül dış duvarının

yırtılması ile ovulasyona yol açar. Ovulasyondan hemen önce folikül çıkıntısının üzerindeki ovaryan yüzeyin küçük bir alanında kan akımı durur. Bu bölgeye makula pellusida ya da foliküler stigma denir ve sonra yırtılır. I. Mayoz bölünmesini tamamlayan sekonder oosit tuba uterinanın fimbriya ovarikaları ile tutularak tuba uterina içerisine alınır. Oositin tuba uterina daki yolculuğu yaklaşık 3-4 gün sürer. Bu sürede bir spermiyum tarafından döllenirse II. Mayoz bölünmesini tamamlar. Ovum ve ikinci kutup cisimciği oluşur. Döllenme olmadığında sekonder oosit 24 saat içerisinde dejenere olur.

Graaf folikülünde ovulasyon sonrasında bir iç basınç düşmesi gerçekleşir. Teka katmanından kan sızması ile kısa süre sonra folikül içine kan toplanır. Bu yapıya korpus rubrum (korpus hemorajikum, kırmızı cisim) denir (15, 18, 24, 25).

2.2.7. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra yırtılan Graaf folikülün duvarında kalan granüloza ve teka interna hücreleri yaşamlarını çevrelerindeki damarlar yoluyla sürdürürler. Folikül sıvısının boşalması ile folikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Folikül boşluğuna bir miktar kanama olur, bu kan burada pıhtılaşır. Bu yapı korpus rubrumdur. Granüloza ve teka interna hücreleri yapısal değişikliklere uğrarlar, LH hormonunun etkisiyle hücrelerin sitoplazmasında sarımsı bir pigment birikmeye başlar. Bu hücreler büyüyerek granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerine dönüşürler. Granüloza lutein hücreleri yaklaşık 30 µm çapındadır ve steroid hormon salgılayan hücrelerin yapısal özelliklerini gösterirler. Teka lutein hücreleri 15 µm çapında, daha koyu boyanan hücrelerdir. Bu hücrelerin oluşturduğu geçici endokrin bez yapısına korpus luteum (sarı cisim) denir. Bu yapı ovaryumun korteks kısmında yer alır, progesteron ve östrojen hormonu salgılar. Bu hormonların katkısı ile, uterus mukozasının embriyonun implante olabilmesine uygun duruma geldiği sekretuar ya da progestasyonel evreye girmesi sağlanır (15, 18, 24).

Korpus luteum 10-12 gün süreyle hormon salgılamak üzere programlanmıştır. Hormonal uyarı olmaz ve gebelik oluşmaz ise, azalan progesteron hormonun etkisi ile dejenere olur ve menstürel kanama gerçekleşir. Buna menstruasyon korpus luteumu denir. Korpus luteumun bulunduğu yer fibroblastlarca kaplanır ve sıkı bağ dokusundan oluşan bir yapı gelişir. Buna korpus albicans (beyaz cisim) adı verilir.

Oositin döllemesi durumunda korpus luteumun dejenere olması gelişmekte olan embriyonun sinsityotrofoblastlarınca salgılanan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu tarafından engellenir. Böylece korpus luteum büyümesini sürdürür ve gebelik korpus luteumuna dönüşür. Sarımtırak renkli luteal hücreler 4. ayın sonuna değin progesteron salgılamayı sürdürür (15).

2.2.8. Ovaryum Fizyolojisi

Kadın genital hormon sistemi, üç ayrı hormon grubundan oluşur:

- Hipotalamik-serbestleştirici bir hormon olan, Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH)
- Hipofiz ön lobundaki hormonlardan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinizan Hormonu (LH). Bu hormonların her ikisi de hipotalamus'ta sentezlenen GnRH-serbestleştirici hormona yanıt olarak salgılanırlar.
- Ovaryum hormonları, östrojen ve progesterondur. Bu hormonlar hipofiz ön lobundan salgılanan iki hormona (FSH, LH) yanıt olarak salgılanır (28, 29).

2.2.9. Foliküler Atrezinin Morfolojik Değerlendirilmesi

Yenidoğan memeli ovaryumunda sınırlı sayıdaki primordiyal folikül stoğu pek çok kez ele alınmış bir konudur. Türe bağılı olarak, doğumun başlangıcında ya da kısa bir süre sonra az sayıda primordiyal folikül her gün aktive olmaya başlar. Foliküller atreziye girene kadar ya da (türe bağılı olarak) bir ya da daha fazla maturasyonunu tamamlayıp, ovulasyon ile sonuçlanana kadar folikülojenik büyüme devam eder. Erişkin hayatta, ilerleyen yaşlara doğru folikül kaynağı azalır, çünkü primordiyal havuz tükenir (30).

Foliküler atrezi apoptozis aracılı bir süreçtir (31). Apoptozis, seçici hücre azaltıcı bir işlem olarak aktif gen ekspresyonuna gerek duyar. Genellikle apoptotik hücreler doku içerisinde tek başına yer alırlar. DNA fragmentasyonu, plazma membranında şişme ve hücrenin büzüşmesi şeklinde biyokimyasal ve morfolojik belirtiler oluşturan bir süreçtir. Pek çok hormon, sitokinler ve büyüme faktörleri genelde dokuya spesifik koruma faktörleri olarak

aktivite göstererek apoptozisi önüyor olsa da pek çok hormonal faktör de apoptotik süreci indükleyici ya da hızlandırıcı etki göstermektedir (32, 33).

Apoptotik uyarım almış bir hücre tipik olarak büzüşmekte ve çevre hücrelerle bağlantısını kesmektedir (33).

Primordiyal ve küçük çaplı gelişen folikülde oosit küçülür ve dejenere olur. Sonra benzer değişiklikler folikül hücrelerinde gözlenir. Hücreler sindirilip görünmez hale geldiğinde, etrafındaki stromal hücreler oluşan boşluğa göç eder ve folikülden iz bırakmaz (15).

Atrezinin erken fazı; az sayıda, piknotik nükleuslu granüloza hücreleridir. Bu fazı, bazal membran düzensizliği ve lökositlerin granüloza hücre tabakalarına infiltrasyonu izler (34, 35) (Şekil 8). Bazal membran, granüloza hücrelerini teka hücrelerinden ayırır. Bu yapı dejenerasyonda granüloza hücrelerinden ayrılabilir ve kalınlaşarak kıvrımlı bir hyalin membran oluşturur. Bu da primatlarda ileri atrezi seviyesindeki folikülün özelliğidir (15).

Dejenere oositlerdeki nüklear değişiklikler kromatin kondensasyonu, piknoz ve fragmentasyon şeklinde iken sitoplazmik değişiklikler daha çok vakualizasyon ve fragmentasyon şeklindedir (35).

Preovulatar foliküllerde atrezi iki safhaya ayrılmıştır (36):

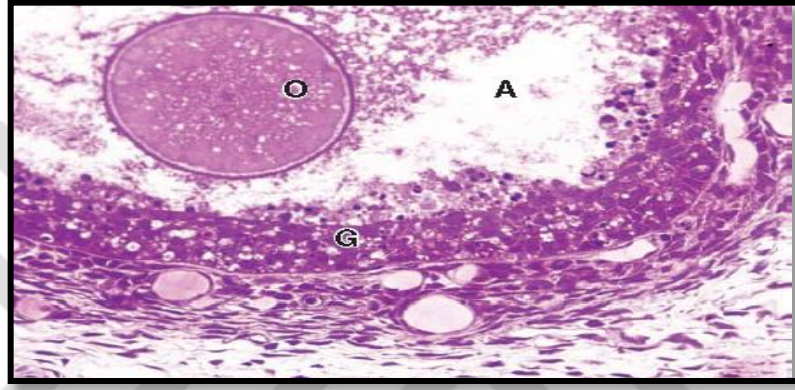
I. AŞAMA: Dejeneratif değişiklikler sadece granüloza tabakasında görülür. Hücre büzüşmesi, piknozis ve karyoreksis. Bu aşamada folikül hala sferik ya da ovaldir.

II. AŞAMA: Değişiklikler mayozun yeniden başladığını gösteren oositte de görülür. Pseudomaturasyon mekiğinin oluşup oluşmaması ile nüklear membranın yıkılması ve oosit fragmentasyonu. Antral folikülde granüloza hücreleri dejenere olduktan sonra oositler mayozu başlatma yeteneğindedir. Bu aşamada foliküllerin çoğu deforme edilir.

Zona pellusida; hücrelerde gözlenen otolitik değişikliklere dirençlidir ve folikül kavitesi içinde yavaşça yıkılarak katlanır ve kollabe olur. ZP'nin kalıntı hücresel artıklarının fagositozunu bağ dokudan invaze olan makrofajlar sağlar (37).

Bazı atretik foliküllerde teka interna hücreleri genişler ve teka lutein hücrelerine benzer. Radial olarak yerleşip zincirler oluşturur ve bağ dokuya dağılır. Bağ dokuda zengin kapiller ağ meydana gelir. Bu foliküllerin dejenerasyonu devam ederken hücre yığınının ortasında hyalin çizgisi bir skar gelişir ve küçük bir korpus luteum albicans izlenimi verir.

Ovariyan stroma dejenere oosit alanını istila ederken, folikül kaybolur. Luteal hücre kordonları hemen yok olmaz ancak parçalanır ve stromaya dağılır. Bu hücre kordonları ovaryumda steroid hormon üreten interstisyel bezleri oluşturur (38, 39).

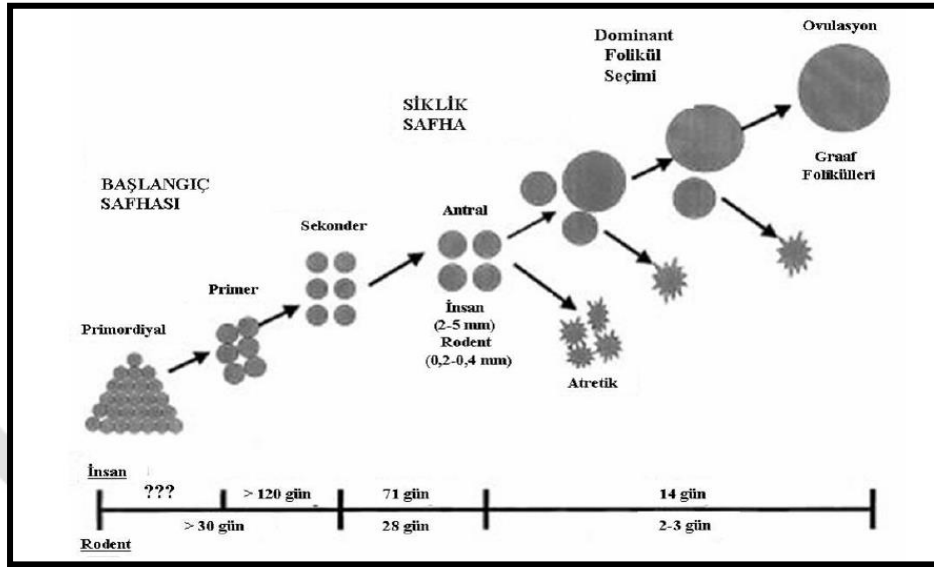


Şekil 8: Atretik folikül yapısının fotomikrografı. Oositi (O) çevreleyen granüloza hücrelerinin (G) infiltrasyonu gösterilmektedir (15).

2.2.10. Rodentlerde Folikül Gelişiminin Kronolojisi

Rodentlerde ovaryan gelişim insanlarınkine benzer ancak zamanlama farklıdır. Primordiyal germ hücreleri ileri embriyonik gelişiminde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, rat ovaryumu kordonlardan ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşurlar. İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur. İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (40, 41). Bu dönemde erken antral foliküller de gözlenir. Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda uzayan ve düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül gelişimi 25 μ m'den (primordiyal folikül) 500-800 μ m (preovulatar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün sekonder foliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir.

Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi $28 \pm 2-3$ gün olabilir. Bu durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de oldukça uzundur (42) (Şekil 9).



Şekil 9: Rodentlerde foliküler gelişimin aşamaları

2.3. Polikistik Over Sendromu Tanımı ve Tarihçesi

Polikistik over sendromu (PKOS) santral sinir sistemi, hipofiz, overler, adrenal bezler ve ekstrasglandüler dokular arasındaki etkileşimlerin bozulması sonucu; üreme çağıının herhangi bir döneminde ortaya çıkan, kronik seyreden ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilen kompleks bir hastalıktır (43).

1935 yılında Irving F. Stein ve Michael L. Leventhal kadınlarda anovulasyon ile ilişkili bir sendrom olarak tanımlamıştır. Hastalık yerine sendrom ifadesinin kullanılması, semptomlar ve bulgular topluluğunun varlığı ve tek bir tanı testi olmaması nedeni ile genel kabul görmüştür (44).

1958'de Mc Arthur, Ingersoll ve Worchester PKOS'lu kadınlarda yükselmiş LH ve testosteron seviyelerini tanıda kullanmaya başlarken, 1980'li yıllarda gonadotropin ve androjen sekresyonlarında anormallikler olduğu tespit edilmiştir. Serum LH/FSH oranının LH lehine bozulması tanıda yer almıştır.

Saurberi, Swanson ve Cooperberg 1981'de ilk kez USG'de 'polikistik over' görünümünü tanımlayarak transvajinal ultrasonografinin (TVUSG) kullanımı ile değerlendirme yapmanın daha üstün olduğunu ileri sürmüşlerdir (45).

PKOS; insülin direnci, santral obezite, dislipidemi, hipertansiyon, glukoz intoleransı ve tip 2 diabetes mellitus ile de ilişkisi olan bir sendromdur (46). Aradan geçen yıllar boyunca PKOS alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına rağmen günümüzde halen sendromun etiyopatogenezi ve tanı kriterleri ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Günümüzde PKOS; heterojen etiyolojili olduğu düşünülen, kronik anovulasyon, menstrual düzensizlik ve hiperandrojenizm bulgularıyla (hirsutizm, akne, erkek tipi saç dökülmesi) seyreden; cushing sendromu, hiperprolaktemi, tiroid hastalığı, androjen üreten tümörler ve geç başlangıçlı konjenital adrenal hiperplaziye gibi benzer kliniğe yol açabilecek nedenlerden dolayı ayırıcı tanısı yapılması gereken kompleks bir hastalıktır (47).

2.3.1. Epidemiyoloji

Sendromun prevalansı kullanılan tanı kriterlerine ve toplumlara göre değişiklik göstermektedir. Erişkin kadınlarda %6-8 olarak bildirilmiştir (48, 49). PKOS'un tahmini sıklığı çalışma yapılan popülasyon ve overlerin ultrasonografik görüntülenmesinin tanı kriterlerine dahil edilip edilmemesine göre değişebilir. Tipik klinik görünümünün varlığında sonografik olarak polikistik overlerin görülmesi sendromun tanısını desteklerken, hiperandrojenizm hikayesi olmayan normal ovulatuar kadınlarda da polikistik overlerin bulunabileceği gösterilmiştir (50). Sonuç olarak, tanı için polikistik overin tespiti klinik olarak yeterli değildir.

2.3.2. Tanı Kriterleri

PKOS tanı kriterleri konusunda tam bir fikir birliği sağlanamamış ve tanı için günümüze kadar; National Institute of Health (NIH) 1990, Rotterdam Consensus 2003, Androjen Excess Society (AES) 2006 ve PCOS Society 2009 olmak üzere toplam 4 konsensus bildirilmiştir. Bu konsensusların tanı kriterleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1: Konsensus tanı kriterleri (51, 52, 53)

NIH 1990	ROTTERDAM 2003	AES 2006	AES+PKOS SOCIETY 2009
İki kriteri de içerir	≥2		
Kronik anovulasyon	Oligo-anovulasyon		
Hiperandrojenizmin klinik ve/veya biyokimyasal belirtileri	Hiperandrojenizmin klinik ve/veya biyokimyasal belirtileri	Hiperandrojenizm (hisutizm ve/veya hiperandrojenemi)	Hiperandrojenizm (klinik veya biyokimyasal)
	Polikistik overler	Over disfonksiyonu: oligo-anovulasyon ve/veya polikistik overler	Over disfonksiyonu ve/veya polikistik morfoloji
	Diğer ilişkili hastalıkların dışlanması		

Bugün polikistik over sendromunun iki tanımı genel kabul görmektedir. İlki 1990 yılında US National Institutes of Health (NIH)'e bağlı National Institute of Child Health and Human Disease (NICHD) konsensusunda kararlaştırılmıştır. Buna göre polikistik over sendromunun majör kriterleri şöyledir:

- Hiperandrojenizm ve/veya hiperandrojenemi
- Oligo-anovulasyon
- Ve diğer bilinen hastalıkların ekarte edilmesi (51)

Diğer tanım 2003 yılında Rotterdam kentinde toplanan European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) ve American Society for Reproductive Medicine (ASRM) tarafından yapılmış ve aşağıdaki üç kriterden en az ikisinin varlığı polikistik over sendromu olarak ifade edilmiştir.

- Oligo ve/veya anovulasyon
- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
- Polikistik overler (52, 53)

Polikistik overlerin ultrasonografik tanımı her overde 2-9 mm çaplı ≥ 12 folikül olması, ≥ 10 ml over hacmi olarak yapılmıştır. Artmış stromal volüm veya ekojenite gibi sübjektif tariflere tanımda yer verilmemiştir. Tek bir overde görülmesi tanı için yeterlidir. Oligo-anovulasyon; yılda 8 veya daha az menstrüasyonu tanımlar (52, 53).

En geniş katılımlı konsensus 2009 yılında Androgen Excess Society PCOS Phenotype Task Force raporu ile açıklanmıştır. Sendromun özellikleri ve polikistik overler başlıkları altında özetlenmiştir. Androjen fazlalığı ile seyreden adrenal hiperplazi, ağır insülin rezistansı sendromları ve androjen salgılayan neoplaziler; idiyopatik hirsutizm vakaları; ovulatuvar disfonksiyona yol açan hiperprolaktinemi ve tiroid bozuklukları gibi durumların ekarte edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Polikistik over sendromunun gonadotropin anormallikleri, insülin direnci, obezite gibi bilinen bazı özellikleri tanı kriterleri arasında yer almamıştır (50, 52, 53, 54).

2.3.3. Etiyopatogenez

Etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte PKOS, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimleriyle ortaya çıkan, kompleks bir hastalıktır (55, 56). Fizyopatolojisindeki insülin salınımı ve etki bozuklukları, steroidogenez defekti, gonadotropin dinamiğinde değişiklikler ile genetik faktörler rol oynamaktadır. PKOS'un oluşmasında rol oynayan genler henüz tanımlanmamış olmasına rağmen çalışmalar sendromun gelişiminde tek bir genden ziyade multigenik özellik taşıdığı yönündedir.

2.3.3.1. Gonadotropin Sekresyon Defekti

Normal menstrüel siklusta hipotalamusun arkuat çekirdeğinden pulsatil (dalgalı) salınan GnRH hormonu ön hipofizden pulsatil FSH ve LH salınımına neden olur (57, 58, 59). PKOS olgularında hipotalamus-hipofiz-over aksının fonksiyonunda bozukluklar tanımlanmıştır. LH pulsatesinin amplitüdü ve frekansı ile ortalama serum LH konsantrasyonunda artış söz konusudur. Bu değişikliklere GnRH pulsatesinin sıklığının artışı, GnRH'ye yanıt artışı ve yüksek östrojen düzeylerinin neden olduğu düşünülmektedir (60). PKOS'lu olgularda kronik olarak yüksek seviyelerde karşılanmamış serbest östrojen, direkt olarak gonadotropin sentezine etki ederek ve/veya indirekt olarak GnRH'nin kendi GnRH reseptörlerini arttırmasını uyarak pitüiter sensitiviteyi arttırabilir. PKOS'lu hastalarda

pitüiter FSH sekresyonu erken foliküler fazda belirgin olarak düşük olduğu tespit edilmiştir. Düşük FSH düzeyinin nedeni tam olarak anlaşılmamakla birlikte, kronik karşılanmamış östrojenin 'negatif feedback' etkisi ile artmış GnRH pulsalitesinin LH β gen 8 ekspresyonunu FSH β gen ekspresyonuna göre daha fazla arttırması patogeneizde rol oynadığı düşünülen iki mekanizmadır (61, 62).

2.3.3.2. Steroidogenez Değişiklikleri

PKOS'da over/adrenal bez steroidogenezinde pek çok değişiklik bulunmuştur. Artmış LH düzeyi overlerde siklik adenzin monofosfat (cAMP) artışı ile steroidogenez androjenlerin üretimi yönünde etkiler ki bu durum folikül gelişiminde duraklamaya neden olur. Klinik olarak GnRH agonistlerinin PKOS'lu hastalarda kullanılması ile normal kadınlara göre teka hücrelerinde artmış androstenedion ve 17-OHPG (17-hidroksi progesteron) saptanması bu hücrelerde de novo steroidogenez farklılığını (sitokrom P450c17 gen ekspresyonu) düşündürmektedir (63). Teka hücrelerinde insülin, IGF-1, IGF-2 reseptörleri bulunmaktadır ve bu reseptörlerin uyarılmasının over androjen üretiminde etkileri olduğu saptanmıştır (64). İnsülin etkisi tam olarak bilinmemekle beraber hiperinsülineminin düzeltilmesi ile de LH'da değişiklik olmaksızın serum androjen düzeylerinde azalma gösterilmiştir. PKOS'lu hastaların %20-50'sinde artmış dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) ve androstenedion seviyeleri adrenal bezin artmış androjen üretimini göstermektedir (65). Ancak adrenokortikotropik hormon (ACTH) seviyeleri normal kadınlarınkine benzer düzeylerde tespit edildiğinden, farklılığın ACTH'ye yanıtta kaynaklanabileceği ya da ACTH dışı faktörler ile adrenal bezin uyarıldığı düşünülmektedir. PKOS'da DHEAS düzeyleri, bazal ve ACTH uyarısına artmış adrenal androjen sekresyon yanıtında genetik faktörler önemlidir (66).

2.3.3.3. İnsülin Etki ve Salınım Bozuklukları

İnsülin direnci ve beraberinde kompensatuar hiperinsülinemi hem zayıf hem de obez PKOS hastalarında sık görülen bir bulgudur. PKOS'da insülin direncinin değerlendirilmesinde çalışılan popülasyonun özellikleri ve kullanılan insülin direnci ölçüm metotları sonuçlar üzerinde önemli etkiye sahiptir (67). Sendromda insülin etki anormalliklerinin mekanizması net olarak bilinmemektedir (68). İlk kez 1980 yılında Burghen ve arkadaşları tarafından obez PKOS'lu hastalarda hiperandrojenizm ve hiperinsülineminin

pozitif linner korelasyonunun bulunmasının ardından birçok çalışmada zayıf ve obez PKOS hastalarında insülin direnci gösterilmiştir, ancak ne obezite ne de tek başına androjen fazlalığı PKOS'da görülen insülin etki bozukluluğunu açıklamamaktadır (68, 69). Ayrıca her PKOS hastasında insülin direnci olmadığı gibi, insülin direnci ölçümü PKOS tanı kriterleri arasında da yer almamaktadır (66). PKOS'da insülin direnci ve hiperinsülinemi, overde androjen sentezini ve SHBG (seks hormonu bağlayan globülin) düzeyinde azalmadan dolayı sT düzeyini arttırmaktadır. İnsülin direncini inceleyen bazı çalışmalarda, insülinin reseptöre bağlanması normal iken, insülin-aracılı glikoz transportunun azalmış olduğu (artmış serin fosforilasyonuna bağlı postreseptör defekti) saptanmıştır (68). HOMA insülin rezistansı ve beta-hücre fonksiyonunu ölçmek için kullanılan bir yöntem olup, ilk olarak 1985'te Mattheus tarafından bildirilmiştir (70).

2.3.3.4. Genetik Faktörler

PKOS hastalarında ailesel kümelenmenin olması genetik özelliklerin araştırılmasına neden olmuştur (71). İlk genetik çalışma Cooper ve arkadaşlarının yaptığı 18 hastalık çalışmadır. Ardından Givens ve arkadaşları 1970'lerde PKOS'un X'e bağlı kalıtım gösterdiğini belirtmişlerdir (72, 73). Bu çalışmalarda PKOS'un tanı kriterleri olarak, hirsutizm ile birlikte polikistik ve bilateral genişlemiş overlerini tanımlamışlardır. Daha sonraki yıllarda İngiltere'de yapılan çalışmalarla PKOS'un otozomal dominant (OD) kalıtımına dair yeni bilgiler literatüre eklenmiştir. Carey ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, %50 oranında OD geçiş gösterilmiştir (74, 75). Heterojen bir bozukluk olan PKOS'da klinik bilgilerin çoğu genin etyolojide sorumlu olabileceğini bildirmektedir (76).

Olası genetik defektlerin incelendiği değişik çalışmalar sendromun kompleks, poligenik bir bozukluk olduğunu göstermektedir. PKOS'un etyopatogenezinde önemli olabileceği düşünülen aday genlerin seçiminde 2 yaklaşım söz konusudur. PKOS'da fonksiyonları değiştiği bilinen proteinleri kodlayan genler ve PKOS'da fenotipik değişikliklerden sorumlu olabilecek proteinleri kodlayan genler şeklindedir (77).

2.3.4. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

PKOS genellikle peripubertal dönemden itibaren başlayan menstrüel düzensizlikler (oligomenore-amenore, disfonksiyonel uterus kanaması), hiperandrojenizm bulguları (hirsutizm, akne, ciltte yağlanma, androjenik alopesi) ve infertilite ile karşımıza çıkmaktadır. PKOS'da görülen klinik bulgular ve sıklığı Tablo-2'de verilmiştir. PKOS'lu olgularda %20'lere ulaşan sıklıkta menstrüel siklus düzenliliği olabileceği de bildirilmiştir (78).

TABLO 2: Polikistik over sendromunda klinik bulgular ve sıklığı (78)

BULGULAR	SIKLIK (%)
Hirsutizm	60-90
Akne	24-27
Obezite	40-60
İnfertilite	55-75
Amenore	26-71
Oligomenore	50-90
Regüler menstrüel siklus	22
Disfonksiyonel uterin kanama	29
Virilizasyon	0-28

PKOS'lu kadınlarda tipik olarak artmış oosit sayısı ile karakterize olmasına rağmen, oositler genellikle düşük kalitedir. Bu durum fertilizasyon, bölünme, implantasyon oranının düşük olmasına ve abortus riskinin de yüksek olmasına sebep olur (79).

PKOS'lu hastalarda, serum FSH düzeyi normal siklusun erken foliküler döneminden daha düşük olmasına rağmen yeni folikül gelişimi sürekli olarak uyarılmaktadır. Ancak FSH düşüklüğüne bağlı olarak, foliküllerde maturasyonun tamamlanamadığı ve gelişen foliküllerin ise ovulasyon aşamasına ilerleyemediği gösterilmiştir (80).

PKOS'lu olguların artmış over volümü (>10ml) ve/veya foliküllerin 2-8 mm çapında olması, 12 veya daha fazla sayıda küçük foliküler kistler şeklinde kalıp birkaç ay devamlılık göstermesi polikistik over (PKO) olarak tanımlanır (81). Bu bulguların tek bir overde olması yeterlidir (82).

Polikistik overlerde primer ve sekonder foliküllerin sayısının önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Oluşan bu foliküllerin atretik olmadığı, gelişimlerinin duraksadığı bildirilmiştir. Ayrıca foliküllerin gonadotropik uyarıma cevap verdiği ve steroid sentezinde aktif olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bu bilgiler ışığında oluşan foliküllerin atreziden hangi mekanizmalarla kurtulduğu ve yetersiz dominant folikül gelişiminin nedeni henüz açıklanamamıştır (83).

PKOS olgularının laboratuvar incelemesinde over ve adrenal kökenli androjenik hormonlarda artış ile karakterize hiperandrojenemi gözlenir. Ayrıca, LH düzeylerinde ve LH/FSH oranında artış olabilir. Yaklaşık olarak %25-60 olguda hiperinsülinemi ve insülin direnci gözlenmiştir (84, 85).

2.3.5. PKOS'da Folikülogenez

Over folikül gelişimi süresince, primordiyal foliküller büyüyen folikül havuzunun içinde gelişir, bir antral folikül ovulasyon için seçilir. Bu olaylar koordineli üreme, metabolik ve intraovaryan etkileşimleri gerektirir (86). PKOS'da ovaryan hiperandrojenizm, insülin direnci, hiperinsülinemi ve değişmiş intraovaryan parakrin sinyalizasyon folikülün büyümesini bozabilir. Folikül gelişiminin duraksamasına bağlı olarak, overin periferinde küçük antral foliküllerin birikiminin eşlik ettiği polikistik morfoloji gözlenmektedir. Bu nedenle; polikistik over, makroskobik olarak normal over büyüklüğünün 2-5 katı kadardır (87). PKOS'lu kadınlarda; folikülogenez sırasında, oosit maturasyonunda, fertilizasyon oranında ve embriyonik gelişim yetersizliği gözlenmektedir (88). Yapılan çalışmalarda, PKOS'ta primer ve sekonder folikül sayılarının normale göre yaklaşık 2 kat olduğu gözlenmiştir (89, 90, 91).

2.3.6. Dehidroepiandrosteron (DHEA) ve PKOS

PKOS hastalarının çoğunluğunda pubertede DHEA düzeylerinin artışıyla beraber semptom ve bulgular görülmeye başlar (92). Bu nedenle DHEA polikistik over modeli oluşturmak için iyi bir seçenek olarak düşünülmüş ve hayvan modeli oluşturmak amacı ile kullanılmıştır. İmmatür dişi sıçanlara DHEA uygulanması ile overlerde kistik değişiklikler, erken ovulasyon, asiklisite ve anovulasyon oluşmaktadır (93). Lee ve ark. dişi sıçanlara

DHEA uygulaması ile polikistik over görünümünü ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmış androjen, östrojen ve prolaktin konsantrasyonu tespit etmişler (94).

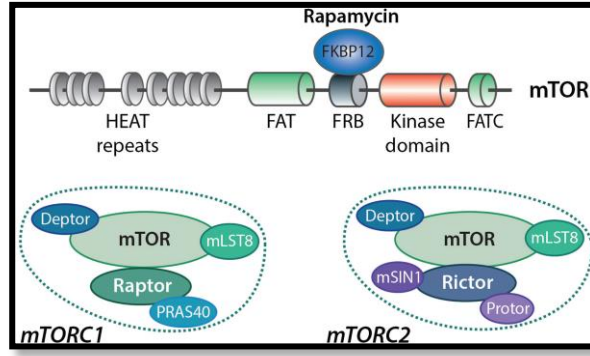
2.4. mTOR

TOR sinyal yolağı, organ nakledilen hastalarda bağışıklığı baskılamak amacı ile Streptomyces bakterilerinin bir suşundan üretilen rapamisin antibiyotiğinin etki mekanizmasının araştırılması sayesinde keşfedilen bir sinyal yolağıdır (95). Mayadan memeli hücrelerine kadar evrimsel süreç içerisinde iyi korunmuş olup fosfotidilinozitol 3 kinaz (PI-3K) ilişkili kinazlar ailesinin bir üyesidir (96). Memeli analogu ise mTOR olarak adlandırılmıştır (97). mTOR, hücre içi sinyal kaskatlarında merkezi bir yerleşim gösteren, 289 kDa ağırlığında bir serin/treonin protein kinazdır (98). mTOR hücre içerisinde golgi aparatı, endoplazmik retikulum, mitokondri, çekirdek ve sitoplazma gibi pek çok bölgede yerleşim göstermektedir. mTOR farklı kompleksler oluşturarak farklı bölgelerde lokalize olarak hücrede farklı görevleri yerine getirebilmektedir (99). mTOR; büyüme faktörleri, değişen besin şartları ve enerji dalgalanmaları gibi çevresel olaylara karşı geniş spektrumlu bir cevap oluşturmaktadır (100). Yapısal olarak mTOR;

- N-terminal domaini
- tandem HEAT (found in huntingtin, elongasyon faktör 3, protein fosfataz 2A alt ünitesi ve TOR proteini) tekrarlarını içeren bir bölge (protein-protein etkileşimlerine aracılık eder.)
- FAT (FRAP, ATM, TRRAP) domaini
- Katalitik domaini PI3K isoformları ile yüksek sekans homolojisine sahiptir.

C terminal bölgesinde FRB (FKBP12-rapamisin bağlanma bölgesi) ve FATC (FAT C-terminal, mTOR kinaz aktivitesini modüle eder) arasında yer alır (101, 102).

mTOR, mTORC1 (mTOR Kompleks1) ve mTORC2 (mTOR Kompleks2) olmak üzere yapısal ve fonksiyonel olarak farklı 2 kompleksin katalitik alt ünitesidir (103) (Şekil 10).



Şekil 10: mTOR Kompleksi yapısı (103)

2.4.1. mTORC1 (mTOR Kompleks1)

mTORC1, Raptor ve mLST8 diye adlandırılan iki proteinden oluşmaktadır (104). mTORC1 besinlerden özellikle glikoz, büyüme faktörleri, stres ve enerji ile düzenlenirler. Esas olarak protein sentezinden sorumludur (105). mTORC1 substratları; S6K1 (S6 Kinaz1) ve 4E-BP1 (eIF4E Bağlayıcı Protein 1) mRNA translasyonu ile ilişkilidir. Bir dizi fosforilasyon mekanizmasının ardından S6K1 ve 4EBP1 aktive olarak translasyonun başlamasını ve devamlılığını sağlar. mTORC1'in HIF1 α (hipoksiyle indüklenen faktör 1) üzerinden anjiyogenezi düzenlediği bilinmektedir (106).

Rapamisin adlı antifungal ilacın hedefi olması nedeniyle mTOR proteini bu ilaçla etkisiz hale gelebilmektedir. Rapamisin, mTORC1'de yer alan Raptor proteinine bağlanarak mTOR'un inhibisyonunu sağlar (107).

2.4.2. mTORC2 (mTOR Kompleks 2)

mTORC2, Rictor (mAVO3), Sin1 ve mLST8 diye adlandırılan proteinlerden oluşmaktadır (108, 109). mTORC2, hücre iskeleti düzenlenmesinde ve hücre polarizasyonunda görevlidir. Aynı zamanda mTORC2, hücre canlılığı, hücre döngüsünün ilerlemesi ve anabolizma ile ilişkili proteinler olan AGC kinaz ailesi üyelerini (Akt, SGK [serum ve glukokortikoid ile regüle olan kinazlar] ve PKC [Protein Kinaz C]'yi de fosforillemektedir (110, 111).

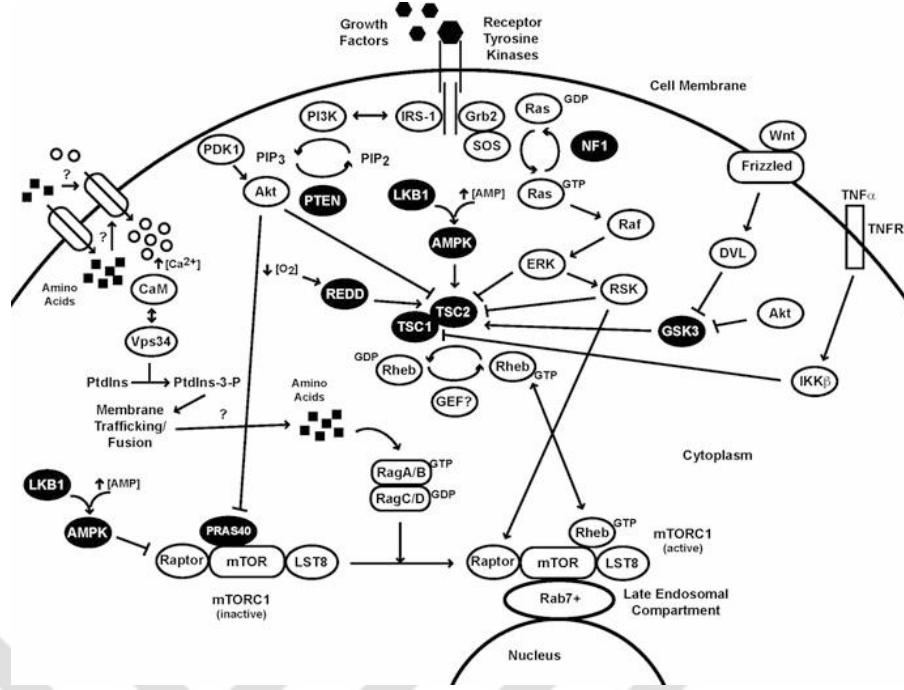
2.4.3. mTOR Sinyal Yolağı

mTOR sinyal yolağı memelilerde, organizmanın büyüme ve gelişmesine göre, ortamdaki aminoasit, glukoz, kolesterol, demir seviyeleri, IGF(İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü), PDGF (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü), stres, hipoksi, DNA hasarı, ısı şoku, ozmotik stres, oksidatif stres ve mitojenler ile düzenlenmektedir (112, 113, 114).

Normal hücrelerde mTOR sinyal yolağı, herhangi bir büyüme etmeninden almış olduğu sinyal veya glukoz ve amino asit seviyeleri ile düzenlenmektedir. Büyüme etmenlerinden biri tarafından sinyal yolağı etkinleştiğinde; PI3K'ı etkinleştirir. PI3K etkinleşmesi, PKB'nin etkinleşmesine PKB de Rheb'in engelleyicisi olan TSC1/TSC2'yi fosforilleyerek onların etkisizleşmesine neden olur (115, 116). Rheb-GDP/Rheb-GTP haline dönüşerek, Rheb-GTP mTOR'u etkinleştirir. mTOR Kinaz (S6K) ve 4EBP'i fosforiller. S6 Kinaz etkinleşerek, 5'TOP mRNA'ların yazılımını uyarır, böyle ribozom biyogenezi artar (117) (Şekil 11).

mTOR sinyal yolağının etkinleşmesi çeşitli proteinlerin sentezinin artışına neden olur. mTOR'un etkinleşmesi ile hücre döngüsü düzenleyicisi olan Siklin D1'in; anjiyogeneze yol açan HIF-1 α ve HIF-2 β ; hücrelerin sağkalımında görevli P21 ve survivin; besinlerin hücre içine alınmasında ve taşınmasında görevli olan GLUT1 ve LAT proteinlerin sentezi artar (118, 119, 120, 121).

Bu yolağın inhibisyonunu sağlayan proteinler TSC1 (Hamartin), TSC2 (Tuberin) ve pTEN (phosphatase and tensin homologue deleted)'dir. TSC1 ve TSC2, Rheb'in Rheb-GDP halinde kalmasını sağlayarak Rheb'in mTOR'u etkinleştirmesini engeller. pTEN ise fosfataz özelliği ile bu etkinliği sağlar (122, 123).



Şekil 11: mTOR Sinyal Yolağı

2.4.4. mTOR İnhibisyonu

mTOR'un PI3K sinyal iletim yolunu etkinleştirerek, hücresel katabolizma, anabolizma, çoğalma, hücre döngüsü kontrolü, anjiyogenez ve apoptozda temel bir düzenleyici olduğu yaygın oranda kabul görmüştür. Bu nedenlerden dolayı mTOR kanser tedavi ilaçlarının ve maddelerin hedefi olmaktadır (107).

Mayalarda ve memelilerde, Rapamisin mTORC1 aktivitesini inhibe eder ancak mTORC2'yi inhibe etmez. Rapamisin 12 kDa'luk FK506-bağlayıcı proteine bağlanır ve RAPTOR-bağlı mTOR'u inaktive eder. Rapamisin bu işlevini mTORC1'i RAPTOR'un mTOR'dan ayrılmasını önleyerek gerçekleştirir (124, 125).

2.4.5. mTOR ile İlişkili Yolaklar

2.4.5.1. MAPK Sinyal Yolağı

Evrimsel olarak korunmuş MAPK (mitojenle-etkileşen protein kinaz) sinyal sisteminde, mayadan insana kadar tüm ökaryotik hücrelerde sinyal iletiminde rol oynayan bir dizi protein kinazlar rol alır.

MAPK yolları, transkripsiyon faktörlerini aktive ya da inaktif ederek transkripsiyonu etkilerler. Bu etkilerini ya doğrudan çekirdeğe geçerek ya da fosforladığı bir sitoplazmik faktörün geçmesi ile geçmesiyle gerçekleştirirler. Bir diğer yol ise MAP kinazın başka bir inhibitör proteini fosforlayarak bağlı olduğu proteinden ayrılmasını ve bu proteini aktive ederek nukleusa girmesini sağlayarak gerçekleştirir (95, 126, 127).

Memeli hücrelerinde 3 temel altgrup MAPK aktivasyonunu gerçekleştirir. Bu altgruplar ise, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK), c-jun NH₂-terminal kinazlar (JNK) veya stresle aktive olan protein kinazlar (SAPKs) ve p38 MAP kinazlar olarak sınıflandırılır (128).

ERK yolağı, hücre çoğalması, büyümesi ve hücre farklılaşmasında aktive olurken, JNK ve p38 MAP kinaz yolları inflamasyon ve hücre ölümü durumlarında aktive olurlar.

Hormonlar ve büyüme faktörleri gibi hücre dışı uyaranlar, Ras-Raf-Mitogenle aktifleşen protein kinaz (MEK) yolağının aracılığıyla ERK_{1/2}'yi etkinleştirirler. Plazma zarındaki reseptör tirozin kinazların hücre dışı sinyaller tarafından etkinleşmesi Ras'ın fosforilasyonunu uyarır. Fosforillenen Ras, Raf'ı ve daha aşağıdaki (mitojenle etkinleşen protein kinaz kinaz) MEK_{1/2}'de ERK_{1/2}'nin Thr-Glu-Tyr aminoasit dizisini etkinleştirir. Aktive olan ERK_{1/2} hücre çekirdeğine geçer ve TSC2'nin fosforilasyonunu uyarak mTOR sinyal yolağını düzenler (129, 130, 131, 132, 133).

2.4.5.2. PI3K Sinyal Yolağı

Fosfoinozid-3 kinaz (PI3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir (134). İnsülin gibi hormonlar ve çeşitli büyüme faktörleri PI3K sinyal yolağını uyarak, hücre membranından inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Bu yolla oluşan lipid mediatörü olan fosfotidilinozitol trifosfat (PIP₃), PIP₃ bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur (135). Protein kinaz B, Akt 1 ve Akt 2 genleri tarafından kodlanan bir proteindir (136). AKT'nin aşağı hücre sinyal yolağı efektörlerinden (downstream effectors) en önemlisi mTOR'dur (137). AKT, mTOR'u tübero skleroz 2 (TSC2)'nin doğrudan fosforilasyonu ile veya AMPK'nin inhibisyonu ile aktive etmektedir.

Aktive olmuş AKT, TSC1 ve TSC2 tübero skleroz kompleksini içeren protein dimerinin, büyümeyi baskılayıcı etkilerini engellemektedir. TSC1/TSC2 kompleksinin

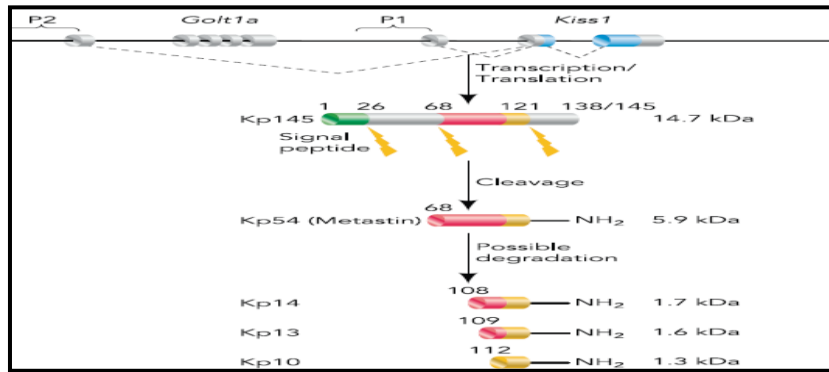
baskılayıcı etkilerinin engellenmesi RAS homologu Rheb'in mTOR'u aktive etmesine neden olur. Rheb, Ras'a benzer bir yapı gösteren GTP (guanozin trifosfat)hidrolizleyebilen özellikte olup, hücre büyümesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir hücre membran proteinidir (138).

2.5. Kisspeptin

Kisspeptin 1996 yılında Lee ve arkadaşları tarafından insan metastatik melanoma kanser hücreleri ile yapılan çalışmada metastaz baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (139). KISS-1 genindeki 'ss' takısı baskılayıcı diziyi (suppressor sequence) ifade etmektedir ve bu gen bölgesi ilk olarak ABD'nin Pennsylvania Eyaleti'nin Hershey şehrindeki bilim insanları tarafından keşfedilip, bu yörenin meşhur Kiss çikolatasına ithafen 'KI' ön eki getirilerek gene KISS-1 geni adı verilmiştir (139, 140).

2.5.1. Kisspeptin Biyokimyası

Kisspeptinler Kiss-1 geni (1q32) tarafından kodlanan nöropeptid ailesindendir (140). Bu genin ürünü pre-prokisspeptin, 145 amino asit içeren Kiss-1 proteinidir. İlk 19 amino asitlik kısım sinyal diziyi oluşturmaktadır, 57. ve 67. pozisyonda kesim noktası içerir. Bu öncül protein parçalanarak farklı sayıda amino asit içeren (Kiss-10, Kiss-13, Kiss-14 ve Kiss-54) fragmanları oluşturur (Şekil 12). Kisspeptin olarak bilinen bu peptidler G-protein-coupled receptor-54 (GPR54)'ün agonistidir. Kisspeptinlerin karboksil ucu RF Motifi (Arjinin-Fenilalanin) denilen amino asitleri içerir ve bu bölgeden amidleşirler (Arg- Phe-NH₂). Amidleştirilmiş bu kısım GPR54 reseptörüne bağlanmadan sorumludur (139, 141, 142, 143).



Şekil 12: Kisspeptin yapısı (139)

Kisspeptinin uzun süre substratı keşfedilmemiş (orphan) reseptör olarak bilinen GPR54'ü (sıçan) ve AXOR12'ü (insan) aktive ettiği gösterilmiştir. Ancak isimlendirmede karışıklığı önlemek amaca ile en yaygın kullanım GPR54 veya KISS1R olarak kabul edilmektedir (144).

2.5.2. Kisspeptin ve KISS1R'in Hücrelerdeki Lokalizasyonu

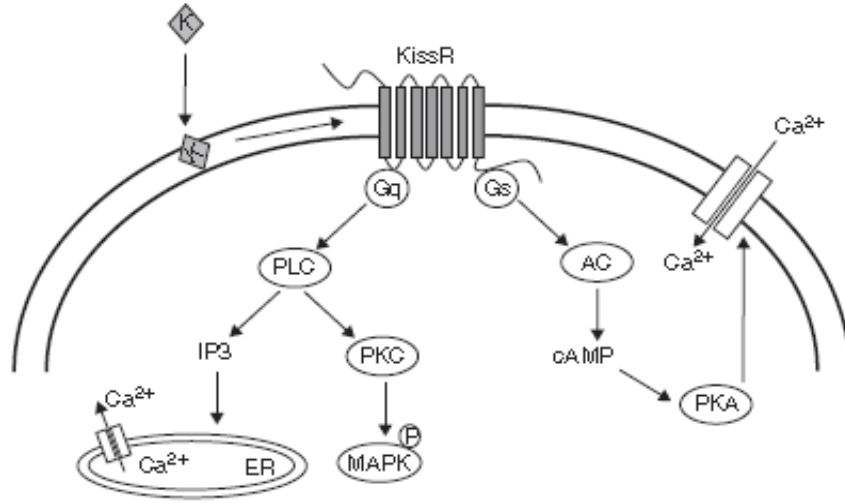
2003 yılında kisspeptinin üreme üzerine etkilerini incelemek amacı ile yapılan immünohistokimya (IHK) ve insitu hibridizasyon (ISH) çalışmalarında beyindeki ekspresyonlarının farklı türlerde farklı bölgelerde olduğu gösterilmiştir (145).

Hipotalamusta kisspeptin dağılımı 2 farklı bölge olan arkuat nükleus (ARC) ve anteroventral periventriküler nükleusun da dahil olduğu 3. ventrikülün rostral kısmında yoğun bir şekilde yer aldığı gösterilmiştir (146). Bununla beraber peptidin ovaryum, testis, pankreas, barsaklar ve plasentada da ekspresyonu belirlenmiştir (147). İnsan GPR54 reseptörünün kalp, kas, böbrek, karaciğer, timus, akciğerlerde de düşük miktarda sentezlendiği bilinmektedir (148, 149).

2.5.3. Kisspeptin İntrasellüler Etki Mekanizması

Kisspeptinlerin karboksil gruplarında bulunan Arg-Phe-NH₂ motifi, GPR54 reseptörüne bağlanmadan sorumlu olup bu reseptörün bağlanması ile hücre içi sinyal yolları aktive olur. Bu hücrel aktivasyon hormon sekresyonu, metastaz, proliferasyon, migrasyon üzerine etki eder (150).

Reseptör ligand bağlanmasını takiben Gαq/11 yolağını kullanarak, fosfolipaz-C (FLC) aktive olur ve hücre içinde PIP₂ hidrolizi ile inositol-1, 4, 5-trifosfat (IP₃) miktarını artırır. Bu değişim hücre içi depolardan Ca⁺² konsantrasyonunun artması ile iyon kanallarının geçirgenliği değişerek Protein kinaz C (PKC) aktive olur. Bu mekanizma ile ERK1/2 fosforilasyonu artar. ERK1/2'nin fosforillenmesi ile MAP kinaz yolağının aktivasyonu indüklenir (17, 148, 151). MAP kinaz yolağı, hücre döngüsü ve proliferasyonu kontrol etmesine rağmen, kisspeptin uyarımı hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır. MAP kinaz yolağının aktivasyonu, kisspeptinin GnRH nöronları üzerine olan etkisi için gereklidir. Kisspeptin MAPK kinaz yolağı dışında p38 ve PI3K sinyal yollarını indükler (152) (Şekil 13).



Şekil 13: Kisspeptin Sinyal yolağı (152)

2.5.4. Kisspeptin-GPR54 Sistemi ve GnRH

Beyindeki GnRH salınımını kontrol eden arkuat nükleus (Arc), periventriküler nükleus (PeN) ve anteroventral periventriküler nükleus (AVPV)'dan kisspeptin salgılanmaktadır. Yapılan çalışmalarda dişilerde kisspeptinin AVPV'dan daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (153). Gonadal steroidler Arc'deki KISS1 nöronlarını inhibe ederken (negatif geri bildirim), AVPV'deki KISS1 nöronlarını uyarmaktadır (pozitif geri bildirim) (154). Hipotalamustaki GnRH nöronlarında bulunan GPR54 reseptörlerine kisspeptinlerin bağlanmaları sonucunda oluşan sinyaller hipofizyal dolaşımda GnRH salınımını sağlar. Gonadotropin salgılatıcı hormon ise hipofizdeki GnRH reseptörlerine bağlanarak hipofizden gonadotropinlerin (FSH, LH) salınımını gerçekleştirir (155).

İnsanlarda ve farelerde yapılan çalışmada GPR54 genindeki mutasyonun idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizme (IHH) neden olduğu ifade edilmiş ve hem farelerde hem de insanlarda gonadotropin sekresyonunun yapılmadığı halde ekzojen olarak GnRH verildiğinde hipofizden FSH ve LH salınımının gerçekleştiği gözlenmiştir (156).

GPR54 ^{-/-} farelerde, reseptör-ligand ilişkisinin reseptör yönünden engellenmesi sonucunda pubertenin başlamasının etkilendiği gözlenmiştir (157). GPR54 mutasyonlu fare ve sıçanlarda yapılan çalışmada erkek farelerde testislerin küçüldüğü, dişilerde foliküler matürasyonun görülmediği ve vaginal açılmada gecikme olduğu saptanmıştır (158). GPR54

mutasyonlu fare ve sıçanlara periferik yolla verilen kisspeptinin dişi ve erkek sıçanlarda gonadotropin düzeylerini arttırdığı, prepubertal dişilerde ise ovulasyona neden olduğu tespit edilmiştir (159, 160).

Kisspeptinin intraserebroventriküler, intravenöz, intraperitoneal ya da subkutan yollar ile uygulandığında LH salınımını uyardığı gözlenmiştir (155).

2.5.5. Kisspeptin ve mTOR

Hücre büyümesi ve farklılaşmasında yer alan önemli bir sinyal yolağı olan mTOR, kisspeptin sinyallerinden etkilenmektedir (161). Besin alınınının düşük olduğu durumlarda mTOR aktivitesi düşer ve böylece enerji-bağımlı hücre döngüsünün inhibisyonu gerçekleşir. İntraserebroventriküler lösin (leucine-mTOR stimülatör) verilmesi plazma LH seviyesinin artmasına neden olmaktadır (162, 163). Buna karşın mTOR aktivasyonunun inhibe edilmesi (rapamisin ile) ARC'deki mRNA Kiss-1'lerin ekspresyonunun neredeyse yok olmasına ve plazma LH seviyesinin düşmesine neden olmaktadır (163).

Kisspeptin-GPR54 sistemi, üreme aksını ve üreme hastalıklarını tedavi etmede kullanılan ilaçlar için varsayılan bir hedeftir (164). Metabolik ve genetik bozukluklar ile ilişkili olan PKOS'da mTOR ve kisspeptinin birbirine olan ilişkilerini incelemek amacı ile bu çalışma yapılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma; 02/2014 – 05/2014 tarihleri arasında literatür araştırması ve tez konusunun belirlenmesi ile başlayıp, 06/2016 – 10/2016 tarihleri arasında tez yazımı ile sonlanmıştır. Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Biyokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam 4 grup oluşturulmuştur. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

GRUP 1 (Kontrol Grubu, n=6): Hiçbir uygulamanın yapılmadığı gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin ovaryum doku örnekleri histolojik olarak incelemek için alınmıştır. Deney başlangıcında, 20. günde ve 40. günde (deney sonunda) kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için alınmıştır.

GRUP 2 (Çözgen Grubu, n=7): 20 gün boyunca subkutan olarak 0.2 ml susam yağı verilen ve 20 gün boyunca intraperitoneal olarak 0.2 ml serum fizyolojik sıvı verilen gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin ovaryum doku örnekleri histolojik olarak incelemek için alınmıştır. Deney başlangıcında, 20. günde ve 40. günde (deney sonunda) kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için alınmıştır.

GRUP 3 (PKOS Grubu, n=7): 20 gün boyunca PKOS modeli oluşturmak amacıyla subkutan olarak 0.2 ml susam yağında çözölen 6mg/100g vücut ağırlığı dozunda DHEA (Dehidroepiandrostenedion) verilen ve 20 gün boyunca intraperitoneal olarak 0.2 ml serum fizyolojik sıvı verilen gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin ovaryum doku

örnekleri histolojik olarak incelemek için alınmıştır. Deney başlangıcında, 20. günde ve 40. günde (deney sonunda) kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için alınmıştır.

GRUP 4 (PKOS + Kisspeptin-10, n=7): 20 gün boyunca PKOS modeli oluşturulmak amacıyla subkutan olarak 0.2 ml susam yağında çözölen 6mg/100g vücut ağırlığı dozunda DHEA verilen ve 20 gün boyunca 100 nmol intraperitoneal olarak Kisspeptin-10 verilen gruptur. Deney bitiminde sakrifiye edilen deneklerin ovaryum doku örnekleri histolojik olarak incelemek için alınmıştır. Deney başlangıcında, 20. günde ve 40. günde (deney sonunda) kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için alınmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakölteı Araştırma Birimi'nden (DETFAB) temin edilen Wistar suşu toplam 27 adet 23 günlük dişi sıçan (50-80g) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20-22 °C oda sıcaklığında, %50-60 nisbi nem bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırılmıştır. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile ad libitum olarak beslenmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada Kontrol, Çözgen, PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubunun biyokimyasal incelemeleri için deney başlangıcında, 20. günde ve 40. günde (deney sonunda) kuyruk veninden kan alınmıştır. Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmadan deney sonunda histolojik incelemeler için sağ ve sol ovaryum doku örnekleri alınarak sakrifiye edilmiştir. Çözgen grubuna 20 gün boyunca subkutan olarak 0.2 ml susam yağı uygulanıp daha sonra 20 gün boyunca intraperitoneal olarak 0.2 ml serum fizyolojik uygulandıktan sonra deney sonunda histolojik incelemeler için sağ ve sol ovaryum doku örnekleri alınarak sakrifiye edilmiştir. PKOS grubuna subkutan olarak 0.2 ml susam yağında 6mg/100g dozunda DHEA (Sigma, ABD) çözölerek 20 gün boyunca uygulanıp daha sonra 20 gün boyunca intraperitoneal olarak 0.2 ml serum fizyolojik uygulandıktan sonra deney sonunda sağ ve sol ovaryum doku örnekleri alınarak sakrifiye edilmiştir. PKOS+Kisspeptin grubuna PKOS

modeli oluşturmak için 20 gün boyunca subkutan olarak 0.2 ml susam yağına 6 mg/100 g dozunda DHEA uygulanıp daha sonra 20 gün boyunca 100nmol Kisspeptin-10 (Gen Script) intraperitoneal olarak uygulandıktan sonra deney sonunda sağ ve sol ovaryum doku örnekleri alınarak kurban edilmektedir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada hayvan ağırlıklarını ölçmek için terazi, deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom ve su banyosu, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, buzluk, inkübatör ve ELISA cihazı kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen&Eozin, PAS (Periyodik Asit Schiff) ve MassonTrikrom, immünohistokimyasal olarak mTOR ve p-mTOR boyamaları yapılmıştır. Biyokimyasal değerlendirme için deney başlangıcında, 20. günde ve 40. günde alınan kan plazma örneklerinde ELISA yöntemi ile östradiol (E₂) ve progesteron hormon düzeylerine bakılmıştır.

3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneklerin ağırlıkları deney başlangıcında ve deney sonunda olmak üzere DHEA ve Kisspeptin-10 etkisini incelemek amacı ile ölçülmüştür. Deneklerin başlangıç ağırlıkları 50-80g olacak şekilde işleme tabi tutulmuştur. Sonuçlar SPSS 22,0 paket programında değerlendirildi. Deneklerin ağırlıklarının başlangıç ve deney sonundaki verilerinin, grup içinde karşılaştırılmasında $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.2. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi

Deney başlangıcında immatür olan dişi sıçanların vaginal açıklıkları oluştuktan sonra her gün 6-12 saat aralıklarla vaginal smear uygulandı. Vaginal smear ile alınan örnekler lama yayıldı. Hazırlanan preparatlar %96'lık, %80'lik, %70'lik azalan alkol serilerinden geçirilip, 5 dakika hematoksilende bekletildikten sonra, 5 dakika akarsuda bekletildi. Daha sonra 20 saniye eozinde bekletilip, %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirilip havada kurutuldu. Vaginal sitolojik veriler Schaberg (1992)'nin döngüsel değişimlerine bağlı olarak elde ettiği bulgular doğrultusunda değerlendirildi.

3.6.2.3. Histokimyasal İncelemeler

Mikroskopik incelemeler için alınan sağ ve sol ovaryum doku örnekleri %10'luk formolde 24-48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında bekletildi. Ardından 60°C'lik etüvde sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma işlemi için 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. İmmersiyonu sağlamak amacıyla 1'er saatlik 2 kere yumuşak parafine tabi tutulduktan sonra doku örnekleri sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan Rotary Mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığıyla 5 µm kalınlığındaki kesitler poly-L lysine kaplı lamalar (Isotherm) üzerine alındı (Tablo 3).

Tablo 3: Rutin doku takip protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
FİKSASYON	%10'luk Formol	24-48 saat
FİKSATİFTEN UZAKLAŞTIRMA	Akarsu	1 gece
REHİDRATASYON	%70, %80, %96'lık alkol serileri	20'şer dakika
POST FİKSASYON	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
ŞEFFAFLANDIRMA	Xylol 1-2	30'ar dakika
BLOKLAMA	Yumuşak Parafin 1-2	1'er saat
	Sert Parafin	

3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: Hematoksilen-Eozin boya protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalandıktan sonra boyanacak alan PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı. Kısıtlanan alana PAS boyama seti (04-130802 Bio-Optica, Milano, İtalya) içerisinde periyodik asit solüsyonundan 10 damla damlatıp 10 dakika bekletilerek oksidasyon işlemi sonucunda aldehit gruplarının oluşması sağlandı. Ardından kesitler distile su ile yıkanarak 10 damla Hotchkiss McManus schiff reagent damlatılarak 20 dakika bekletildi. Böylece schiff reagent'ın içerdiği sülfür fuksin, bazik fuksine benzer çözünmeyen işaretli bileşiklerdeki 2 komşu aldehit grubunun değişmesini sağladı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkanarak üzerine potasyum metabisülfid solüsyonundan 10 damla damlatılarak 2 dakika muamele edildi. Kesitlere yıkama olmadan üzerlerine 10 damla fiksatif solüsyonundan 10 damla damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler distile suda çalkalandıktan sonra Mayer's hematoksilen solüsyonundan 10 damla damlatılarak 3 dakika bekletildi. Böylece nukleusların boyanması sağlandı. Sonrasında 5 dakika akarsuda yıkandı. Dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacı ile 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Periyodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	10'ar dakika
Dehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol serileri	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 dakika
Boyama	Reagent D	2 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.3. MassonTrikrom Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakika üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalanarak boyanacak olan alan PapPen ile sınırlandırıldı. Sınırlanan alan MassonTrikrom boyama seti (04-010802 Bio-Optica, Milano, İtalya) içerisinde 6 damla Weigert's demirli hematoksilin ile 6 damla Weigert's demirli hematoksilende 10 dakika bekletildi. Kesitler yıkanmadan 10 damla pikrik asit solüsyonunda 4 dakika bekletildi. Distile su ile yıkanan kesitlere 10 damla ponceau asit fuksin solüsyonundan damlatılarak 4 dakika bekletildi. Ardından distile su ile yıkanan kesitlere 10 damla fosfomolibdik asit solüsyonundan damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama olmadan kesitlere 10 damla masson anilin mavisi damlatılıp 5 dakika bekletildi. Kesitler distile su ile iyice yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirilen kesitler, şeffaflaştırma işlemi için 20'şer dakika 3 değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 6).

Tablo 6: MassonTrikrom boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısında)	10'ar dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol serileri	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Weigert's demirli hematoksilin+ Wigert's demirli hematoksilin	10 dakika
Boyama	Pikrik asit solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Ponceau asit fuksin solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Fosfomolibdik asit solüsyonu	10 dakika
Boyama	Masson anilin mavisi	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler

3.6.2.4.1. Folikül Sayısının Tespiti

Çalışmamızda her bir gruptaki deneklerin ovaryum doku örnekleri 5 µm kalınlığında seri kesitler halinde alındı. Ovaryum doku örneklerinin her 40. kesitte (her over için 10-12 kesit) foliküller sayıldı. Folikül sayıları önceden oluşturulmuş tabloya sayısal veriler olarak not edildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırılmasında da Mann-Whitney-U testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Foliküller; primordiyal, primer, sekonder, tersiyer, atretik ve kistik folikül olarak değerlendirildi. Atretik folikül morfolojik açıdan granüloza hücre tabakasının bazal membrandan ayrılması ve dejenerasyon göstermesi, piknotik çekirdek ve oosit dejenerasyonu şeklinde tanımlanmıştır. Kist folikülü ise 4 veya 5 tabakalı katlanmış granüloza hücre tabakası

veya etrafı geniş folikül sıvısı ile kaplı olan incelmış granüloza hücre tabakası ve kalınlaşmış teka interna tabakası ile karakterizedir (92).

3.6.2.4.2. Folikül Çaplarının Ölçümü

Çalışmamızda her bir gruptaki deneklerin seri kesit alınan ovaryum doku örneklerinin folikül çapları ve granüloza hücre tabakasının kalınlığı UTHSCSA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırılmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırılmasında da Mann-Whitney-U testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler

İmmünohistokimyasal analizler, hücre ve dokularda var olan makromoleküllerin işaretlenmesi esasına dayanmaktadır. Aşağıda belirtilen üç temel adım ile işaretleme gerçekleşir.

1. Primer antikor özel antijene bağlanır.
2. Antikor-antijen kompleksi bir konjugasyon enzimi yardımıyla ikinci bir antikora bağlanır.
3. Substrat ve kromojen varlığında bu enzim antikor-antijen bağlanma bölgesinde renkli bir deposite dönüşür. Görünüm ışık mikroskobunda histolojik olarak değerlendirilir.

3.6.2.5.1. mTOR Boyama Protokolü

Alınan kesitler öncelikle 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Daha sonra deparafinizasyon amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5'er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Ardından mikrodalgada 600 watt, 6 dakika Sodyum Sitrat solüsyonunda (Bio-Optica, İtalya) bekletildi. Soğuması için 20 dakika oda ısısında tutuldu. Sodyum sitrat solüsyonundan çıkarılan kesitlerin boyanacak alanının etrafı PapPen (Sigma, USA) ile çizilerek alan kısıtlandı. Ardından üç kez fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile yıkandı. Her yıkamadan sonra etrafındaki fazla su kurutma kağıdı ile alındı. Daha sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için taze hazırlanan %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit) ile 10 dakika

oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapılan kesitlere 10 dakika oda ısısında serum protein bloklama solüsyonunda (Reagent A) (LabVision, CA) bekletildi. Yıkama olmadan kesitlere mTOR primer antikoru (1:100, Bioss, USA) ile +4°C’de 1 gece bekletildi. Ertesi sabah PBS ile üç kez yıkanan kesitlere biyotinlenmiş sekonder antikoru (Reagent B) ile 20 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlere streptavidin-peroksidaz (HRP) (Reagent C) ile 10 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer’s Hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsuda yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirildikten sonra şeffaflaştırma işlemi için ksilol serilerinden geçirilip entellan (UN 1866, Merck) ile kapatıldı.

3.6.2.5.2. *p-mTOR Boyama Protokolü*

Alınan kesitler öncelikle 60°C’lik etüvde 1 gece bekletildi. Daha sonra deparafinizasyon amacıyla 20’şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5’er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Ardından mikrodalgada 600 watt, 6 dakika Sodyum Sitrat solüsyonunda (Bio-Optica, İtalya) bekletildi. Soğuması için 20 dakika oda ısısında tutuldu. Sodyum sitrat solüsyonundan çıkarılan kesitlerin boyanacak alanının etrafı PapPen (Sigma, USA) ile çizilerek alan kısıtlandı. Ardından üç kez fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile yıkandı. Her yıkamadan sonra etrafındaki fazla su kurutma kağıdı ile alındı. Daha sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için taze hazırlanan %3’lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile 10 dakika oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapılan kesitlere 10 dakika oda ısısında serum protein bloklama solüsyonunda (Reagent A) (LabVision, CA) bekletildi. Yıkama olmadan kesitlere p-mTOR primer antikoru (1:100, Bioss, USA) ile +4°C’de 1 gece bekletildi. Ertesi sabah PBS ile üç kez yıkanan kesitlere biyotinlenmiş sekonder antikoru (Reagent B) ile 20 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlere streptavidin-peroksidaz (HRP) (Reagent C) ile 10 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer’s Hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsuda yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirildikten sonra şeffaflaştırma işlemi için ksilol serilerinden geçirilip entellan (Merck, Germany) ile kapatıldı.

3.6.2.6. Biyokimyasal Analizler

Deney grupları oluşturulmadan ve oluşturulduktan sonra alınan kan plazma örneklerinden östradiol ve progesteron düzeylerine bakılarak PKOS modeli oluşturduğumuz ve PKOS modeli oluşturup Kisspeptin-10 verdiğimiz grupların hormon seviyelerini doğrulamak amacıyla ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi gerçekleştirildi.

3.6.2.6.1. Deneklerden Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Deney grupları oluşturulmadan önce deneklerin tümünden eter anestezisi altında kuyruk veninden yaklaşık 0.4 cc kan heparin enjektörü ile alınarak EDTA'lı kan tüplerine konuldu. Kan örnekleri 15 dakika 1000xg'de 4°C'ye ayarlanan santrifüje konuldu. Süpernatantlarına ayrılan kan örneklerinden plazma kısmı ependorflara konularak -20°C'de saklandı. Gruplar oluşturulduktan sonra 20 gün boyunca DHEA verilen grubun PKOS olduğunu belirlemek amacıyla 20. günde her bir gruptaki denekten eter anestezisi altında kuyruk veninden kan alınıp -20°C'de saklanmıştır. Deney sonunda (40.günde) her bir deney grubundan kan örnekleri alınarak sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.6.2.6.2. ELISA Yöntemi

3.6.2.6.2.1. Östradiol Ölçümü

ELISA yöntemi Cusabio Rat Estradiol (E₂) ELISA ticari kiti kullanılarak, plazmadan östradiol ölçümü yapıldı. Bu test yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immunoassay prensibine dayanmaktadır. ELISA kiti üreticisinin tavsiyesi doğrultusunda tüm örnekler ve solüsyonlar oda ısısına getirildi. Her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standardın konulacağı önceden belirlendi ve kayıt edildi.

Standardlar, örnekler, diluent ve yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra ELISA testi için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. 50 µl Standard ve örnek alınarak uygun kuyucuklara koyuldu (kör kuyucuk hariç).
2. 50 µl HRP- konjuge solüsyonundan daha sonra da 50 µl antikor eklenerek karışımları sağlandıktan sonra 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3. İnkübasyonu sağlanan örnekler 3 kez yıkama solüsyonu (200 µl) ile yıkanarak tüm kuyucukların içerisi boşaltıldı.
4. Daha sonra kuyucukların içerisine 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B eklenerek 15 dakika 37°C'de ışıktan korunarak inkübe edildi.
5. Ardından karanlıkta 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.
6. 10 dakika sonra kuyucuklar 450nm dalga boyunda plate okuyucusunda okundu.

Çizilen standart eğrisinden, plazmadaki östradiol konsantrasyonları tespit edildi. Sonuçlar pg/ml cinsinden ifade edildi. Kullanılan ticari kitin sensitivitesi 25 pg/ml'dir. 40 pg/ml-1400 pg/ml aralığındaki değerler ölçüldü.

3.6.2.6.2.2. Progesteron Ölçümü

ELISA yöntemi Cusabio Rat Progesterone (PROG) ELISA ticari kiti kullanılarak, plazmadan progesteron ölçümü yapıldı. Bu test yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immunoassay prensibine dayanmaktadır. ELISA kiti üreticisinin tavsiyesi doğrultusunda tüm örnekler ve solüsyonlar oda ısısına getirildi. Her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standardın konulacağı önceden belirlendi ve kayıt edildi.

Standardlar, örnekler, diluent ve yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra ELISA testi için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. 50 µl Standard ve örnek alınarak uygun kuyucuklara koyuldu (kör kuyucuk hariç).
2. 50 µl HRP- konjuge solüsyonundan daha sonra da 50 µl antikor eklenerek karışımları sağlandıktan sonra 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyonu sağlanan örnekler 3 kez yıkama solüsyonu (200 µl) ile yıkanarak tüm kuyucukların içerisi boşaltıldı.
4. Daha sonra kuyucukların içerisine 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B eklenerek 15 dakika 37°C'de ışıktan korunarak inkübe edildi.
5. Ardından karanlıkta 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.

6. 10 dakika sonra kuyucuklar 450nm dalga boyunda plate okuyucusunda okundu.

Çizilen standart eğrisinden, plazmadaki progesteron konsantrasyonları tespit edildi. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edildi. Kullanılan ticari kitin sensitivitesi 0.2ng/ml'dir. 0.2 ng/ml-80 ng/ml aralığındaki değerler ölçüldü.

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Histolojik ve immünohistokimyasal olarak boyanan kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Deney sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 22.0 paket programı kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırılmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

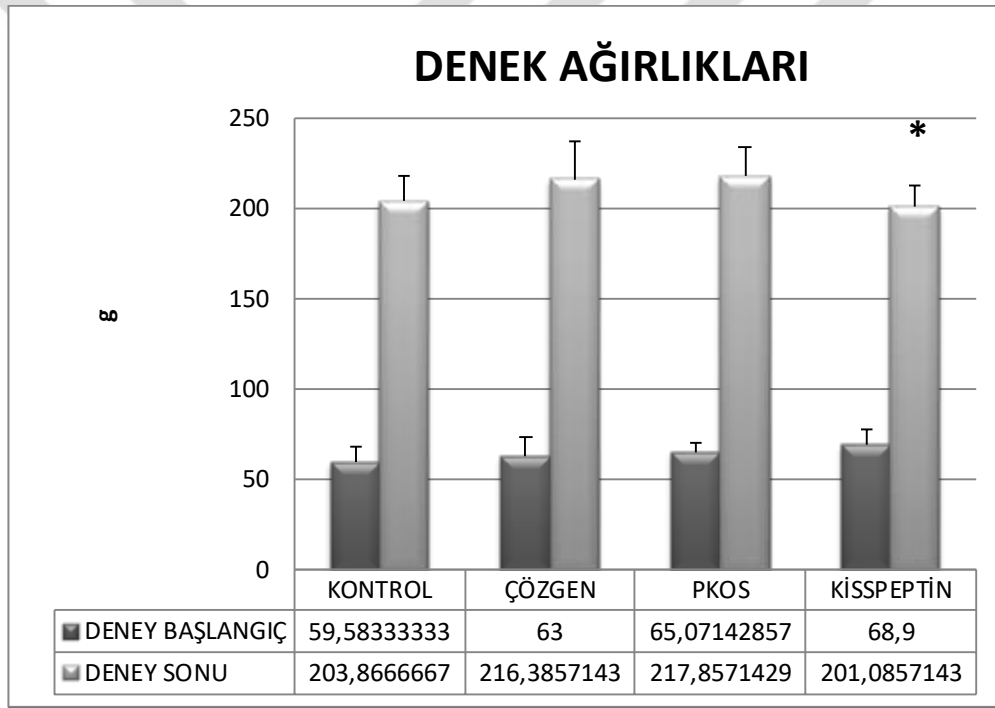
Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 17 Haziran 2014 tarihinde gerçekleştirilen 02/12/2014 no'lu toplantıda 38/2014 protokol numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı EK-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; Kontrol grubunda $59,58 \pm 3,60$ g, Çözgen grubunda $63,00 \pm 4,02$ g, PKOS grubunda $65,07 \pm 2,01$ g, PKOS+Kisspeptin grubunda $68,90 \pm 3,17$ g olarak bulundu. Deney sonunda ağırlık ortalamaları ise; Kontrol grubunda $203,86 \pm 5,83$ g, Çözgen grubunda $216,38 \pm 7,79$ g, PKOS grubunda $217,85 \pm 5,97$ g, PKOS+Kisspeptin grubunda $201,08 \pm 4,31$ g olarak saptandı. Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, PKOS+Kisspeptin grubunun deney sonu ağırlıkları PKOS grubuna göre anlamlı azalmıştı ($p=0,035$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 14).



Şekil 14: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlıkları.

*: PKOS+Kisspeptin grubu deneklerin vücut ağırlığında görülen anlamlı azalış ($p=0,035$).

4.2. Histokimyasal Bulgular

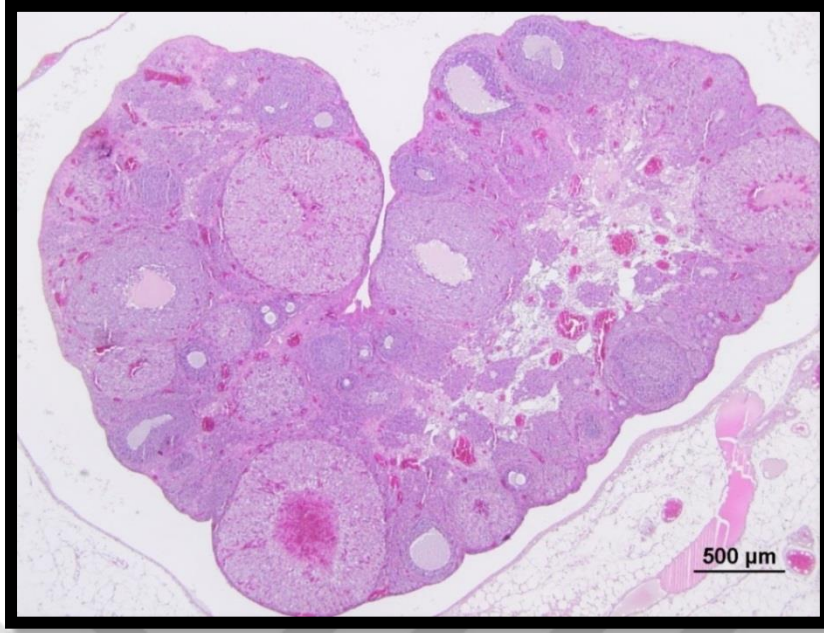
4.2.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, ovaryum yüzeyinin, tek katlı kübik epitel özelliğindeki germinal epitel ile kaplı olduğu ve epitelin altında ise fibröz bağ dokusu lifleri ve hücrelerinden oluşan tunika albuginea tabakası görüldü. Kortekste çeşitli sayı ve tipte yer alan primordiyal, primer, sekonder ve graaf folikülleri ile birlikte korpus luteum gözlendi. Foliküllerde bulunan oosit ve ona ait olan zona pellusida normal görünümdeydi. Foliküllerin etrafında yer alan granüloza tabakası normal kalınlıkta ve hücreleri poligonal, eozinofilik sitoplazmalı olup çekirdekleri kromatin bakımından zengindi. Foliküllerin çevresinde hücreden zengin bağ dokusu yapısında yer alan stromada hücreler oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları asidofilik olup gruplar halinde görüldü. Ovaryumun korteksinde yer alan foliküllerin teka tabakası ve medulla bölgesindeki damarların normal yapıda ve yoğunlukta olduğu gözlendi.

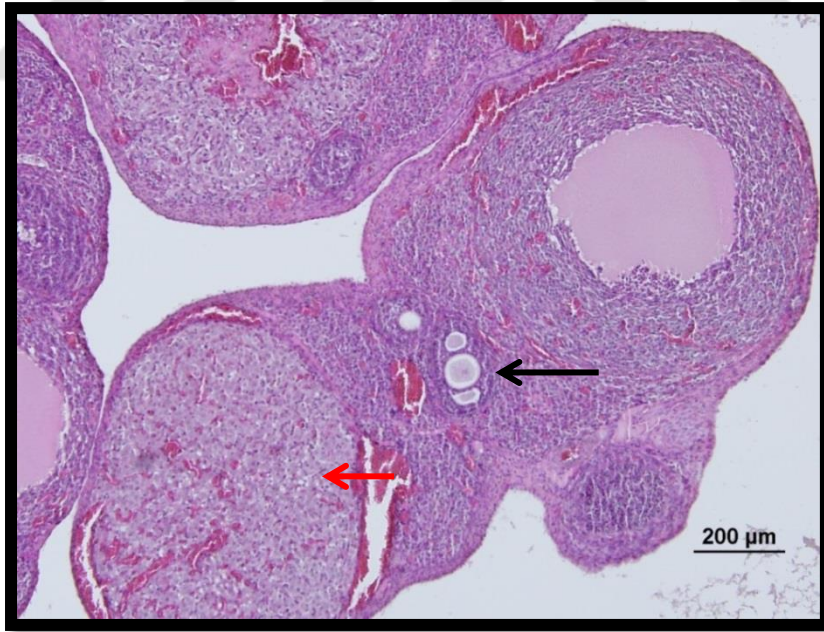
Çözgen grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, morfolojik açıdan kontrol grubuna benzer olduğu gözlendi. Sağlıklı yapıda ve gelişimin farklı aşamalarında foliküllerin olduğu gözlendi.

PKOS grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, kortekste farklı gelişim aşamasında bulunan foliküller izlendi. Ancak foliküller içerisindeki primer oositin sağlıklı yapıda olmadığı gözlendi. Diğer gruplara göre sekonder, atretik ve kist foliküllerinin sayısının arttığı görüldü. Foliküllerin bir bölümünün atrofiye uğrayarak geriledikleri ve oositlerini kaybederek içi boş kistler haline geldikleri gözlendi. Kistik foliküllerinin granüloza hücre tabakasının kalınlığının azaldığı belirlendi. Ayrıca kortekste yer alan korpus luteum sayısının azaldığı ve bazı korpus luteumlarda luteal kistik yapısının olduğu gözlendi. Medullar bölgede yer yer damar genişlemeleri izlendi.

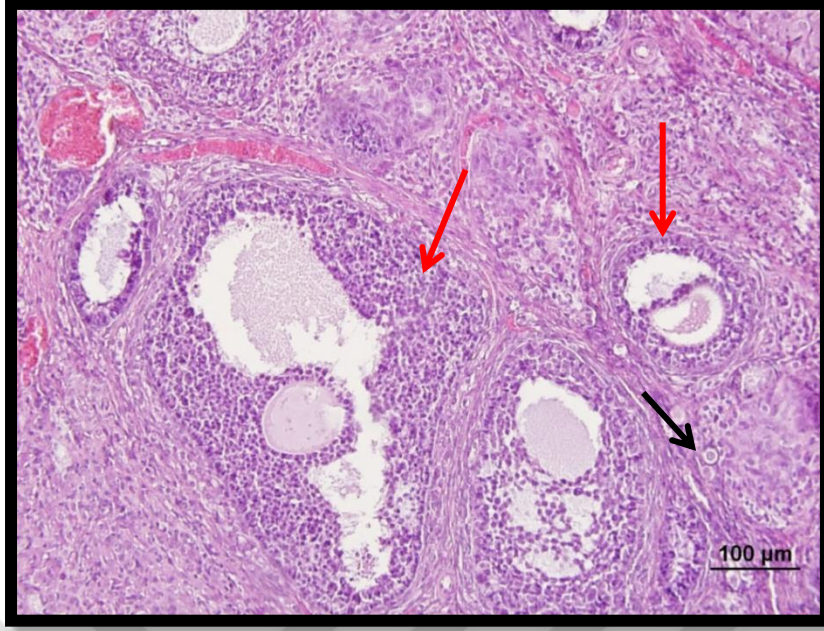
PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, kortekste farklı gelişim aşamasında bulunan normal ve sağlıklı foliküller gözlendi. Primer ve sekonder foliküllerin granüloza ve teka tabakasının düzenli olduğu gözlendi. Atretik ve kistik foliküllerin sayısının PKOS grubuna göre azaldığı gözlendi. Medullar bölgede ise damar genişlemelerinin PKOS grubu ile benzer olduğu gözlendi.



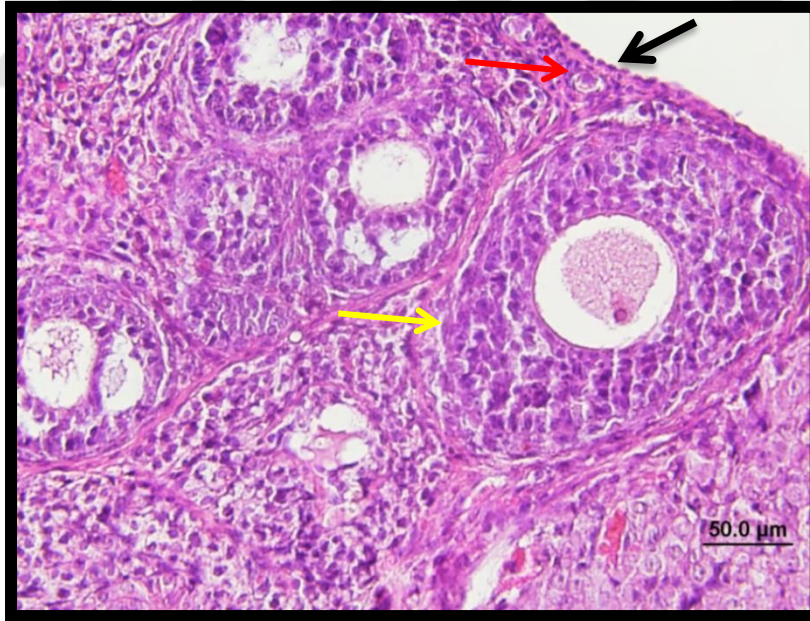
Şekil 15: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. (H&E, X4 büyütme)



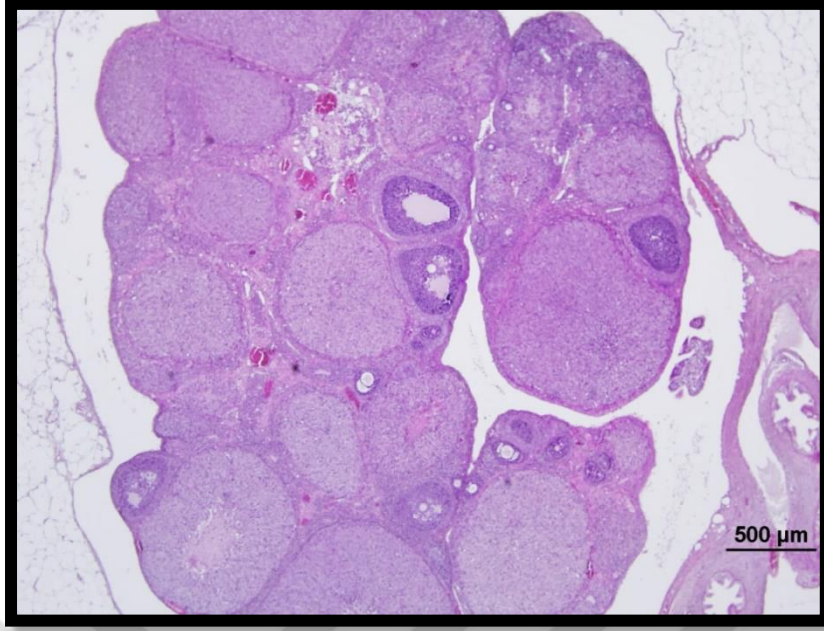
Şekil 16: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde normal morfolojide gözlenen sekonder folikül (←) ve korpus luteum yapısı (←) gösterilmiştir. (H&E, X10 büyütme)



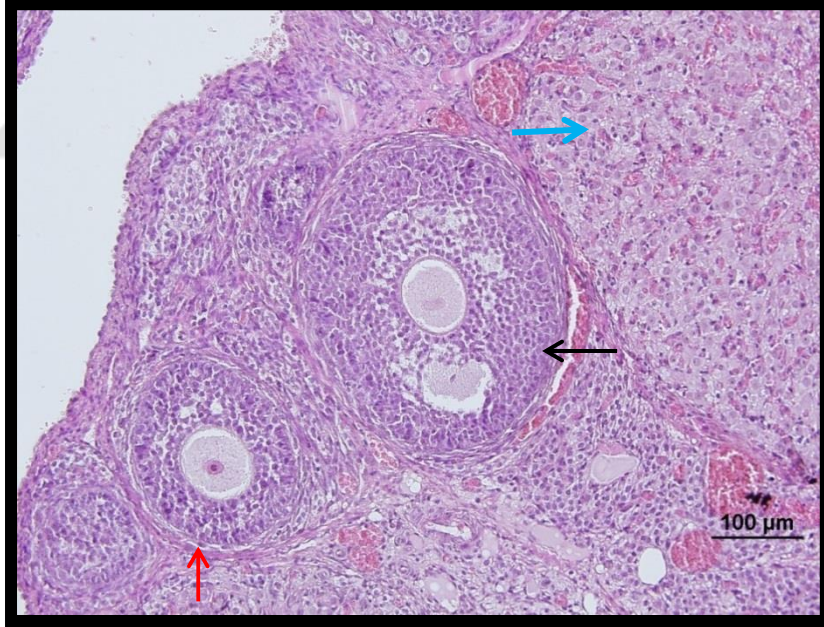
Şekil 17: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde farklı gelişim aşamalarındaki foliküller (←) ve primordiyal folikül (←) gösterilmiştir. (H&E, X20 büyütme)



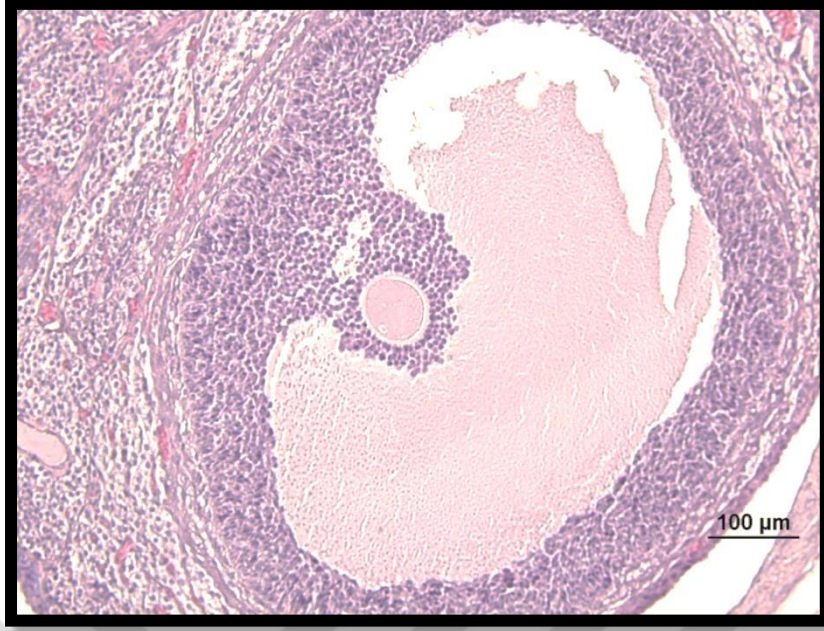
Şekil 18: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde tunika albugineanın hemen altında yer alan primordiyal folikül (←) ve sağlıklı morfolojide gözlenen çok tabakalı primer folikül (←) yapısı gösterilmektedir. Ayrıca germinal epitel (←) gösterilmektedir. (H&E, X40 büyütme)



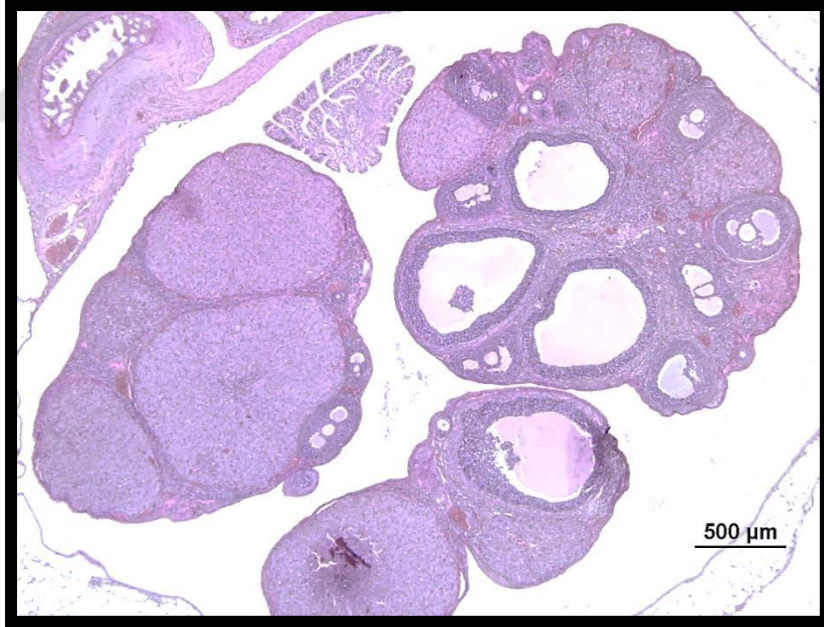
Şekil 19: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. (H&E, X4 büyütme)



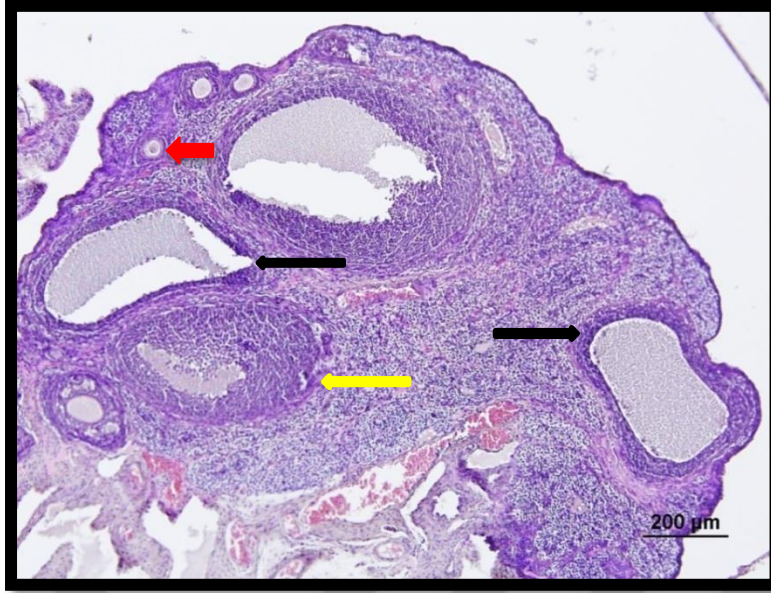
Şekil 20: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Kortekste gelişimin farklı aşamalarında normal morfolojiye sahip primer folikül (↖) ve sekonder folikül (↗) gösterilmiştir. Ayrıca korpus luteum (↘) yapısı gösterilmiştir. (H&E, X20 büyütme)



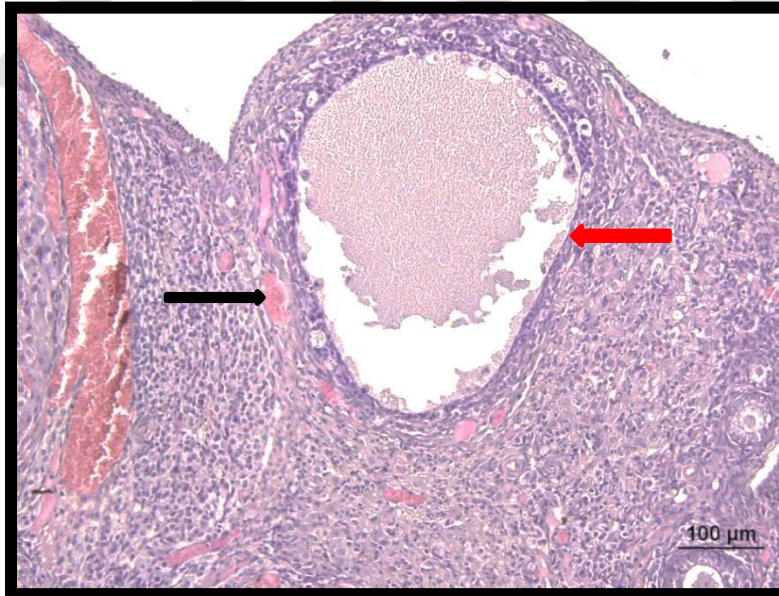
Şekil 21: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde normal morfolojiye sahip graaf folikülü gösterilmiştir. (H&E, X20 büyütme)



Şekil 22: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. (H&E, X4 büyütme)



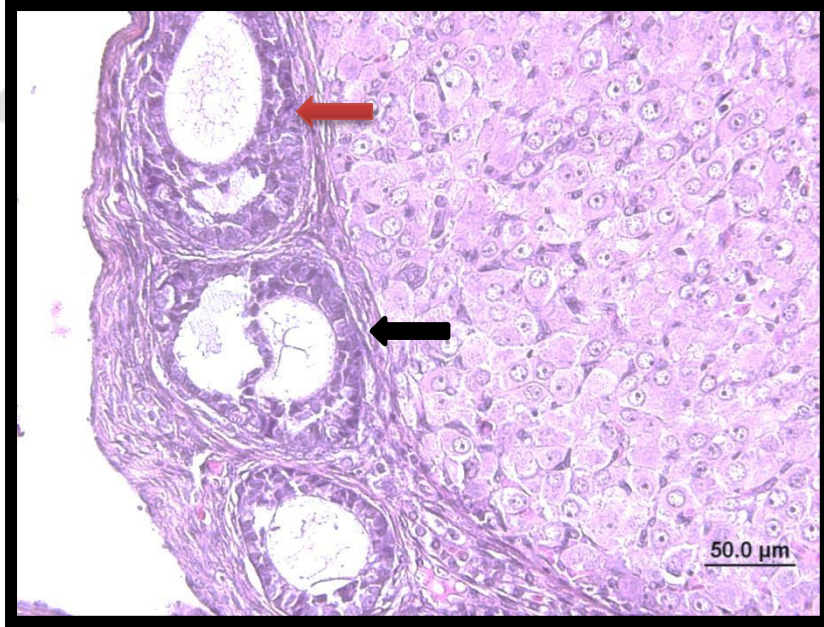
Şekil 23: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde granüloza tabakası incelmış, teka tabakasının kalınlığı artmış olan içi boş kist folikülleri (←), atretik folikül (←) ve normal morfolojiye sahip primer foliküller (←) gösterilmiştir. (H&E, X10 büyütme)



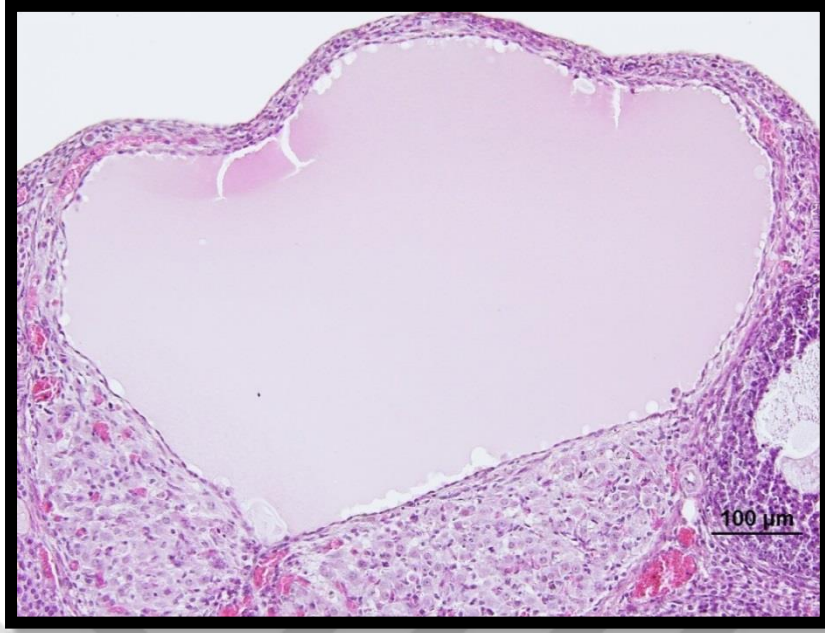
Şekil 24: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. İçi boş, incelmış granüloza hücre tabakası ve kalınlaşan teka hücre tabakası ile kist folikülü (←) gösterilmiştir. Ayrıca teka interna tabakasındaki damarlarda genişleme (←) gösterilmiştir. (H&E, X20 büyütme)



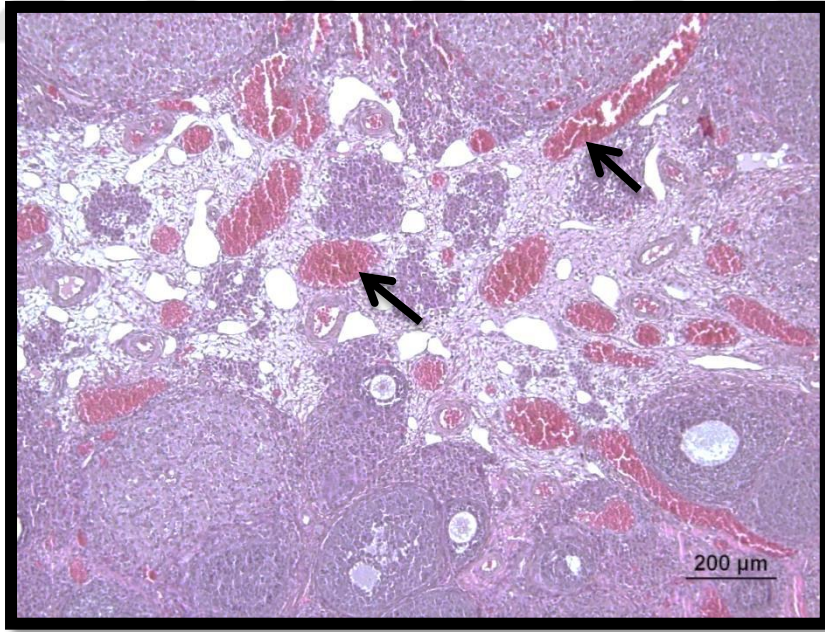
Şekil 25: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Granüloza tabakası ile teka tabakası birbirinden ayrılmış atretik folikül yapısı (←) gösterilmiştir. (H&E, X20 büyütme)



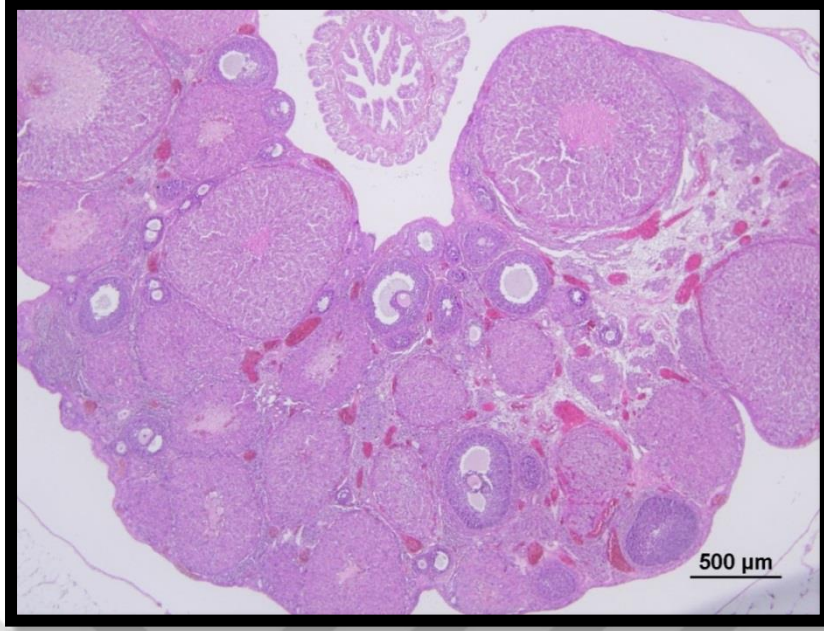
Şekil 26: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Normal morfolojiye sahip sekonder folikül yapısı (←) ve dejenerasyona uğramış atretik sekonder folikül yapısı (←) gösterilmiştir. (H&E, X40 büyütme)



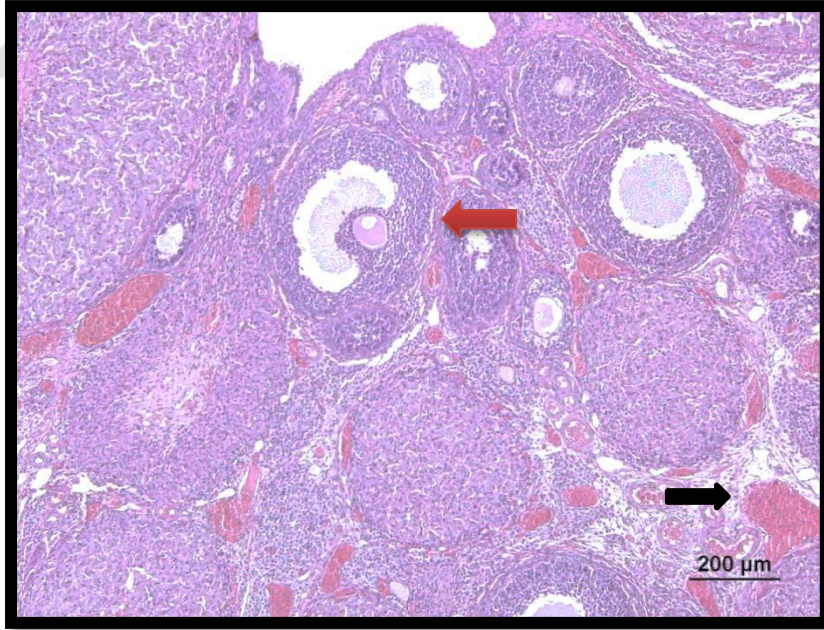
Şekil 27: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Korpus luteum içerisinde luteal kist yapısı gösterilmektedir. (H&E, X20 büyütme)



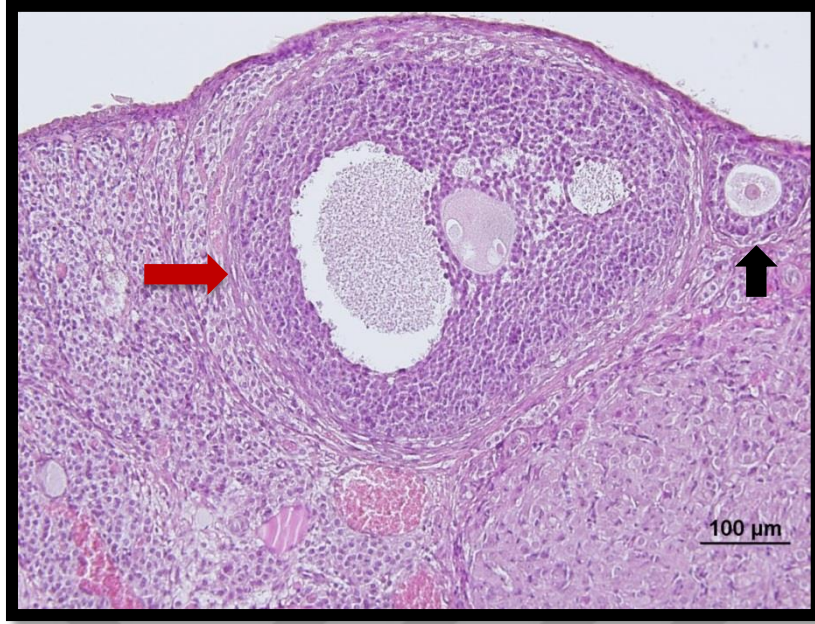
Şekil 28: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Medulla bölgesindeki damar yapısındaki genişleme (←) gösterilmiştir. (H&E, X10 büyütme)



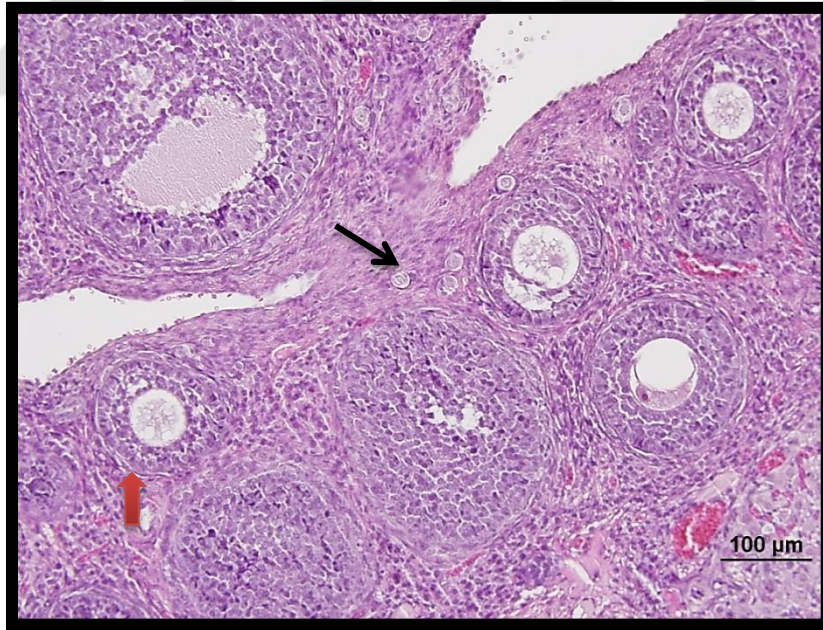
Şekil 29: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. (H&E, X4 büyütme)



Şekil 30: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde gelişimin farklı aşamalarında yer alan foliküller gösterilmektedir. Sekonder folikül yapısı () gösterilmektedir. Medulla bölgesindeki damar yapılarında genişleme () gösterilmektedir. (H&E, X10 büyütme)



Şekil 31: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Antrum boşluğu oluşmuş normal morfolojiye sahip sekonder folikül yapısı (←) ve çok tabakalı primer folikül yapısı (←) gösterilmiştir. (H&E, X20 büyütme)



Şekil 32: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Primer oositi çevreleyen tek katlı yassı folikül hücrelerinden oluşan primordiyal folikül (←) ve çok tabakalı primer folikül (←) gösterilmiştir. (H&E, X20 büyütme)

4.2.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi

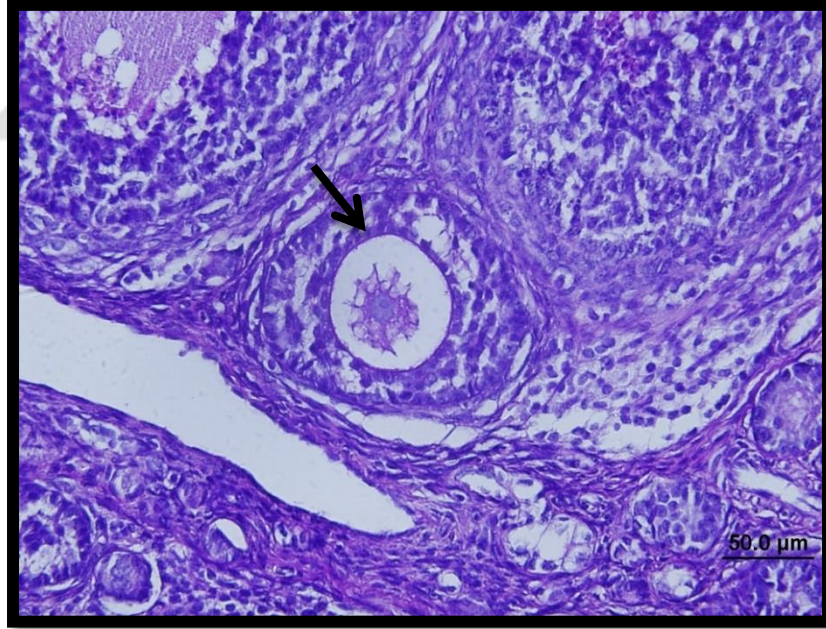
Çalışmamızda zona pellusida yapısını morfolojik olarak değerlendirmek amacıyla PAS boyama yapıldı.

Kontrol grubunun korteks bölgesinde yer alan primer, sekonder ve graaf foliküllerde yer alan zona pellusida yapısının normal yapıda olduğu ve PAS + reaksiyon verdiği tespit edildi.

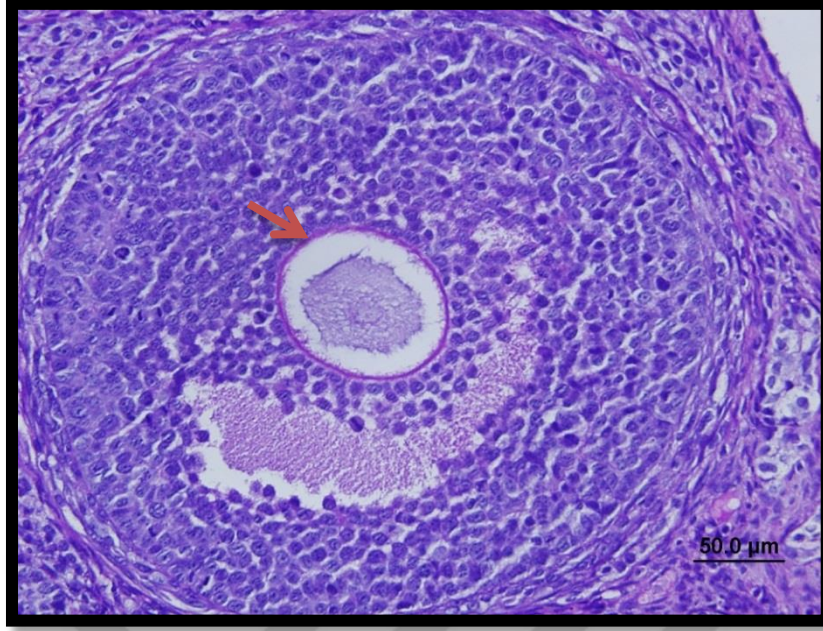
Çözgen grubun da kontrol grubuna benzer sonuçlarda olduğu gözlemlendi.

PKOS grubunda korteks bölgesindeki artan sayıdaki atretik foliküllerin zona pellusida yapısının dejenerasyona uğradığı gözlemlenmiştir.

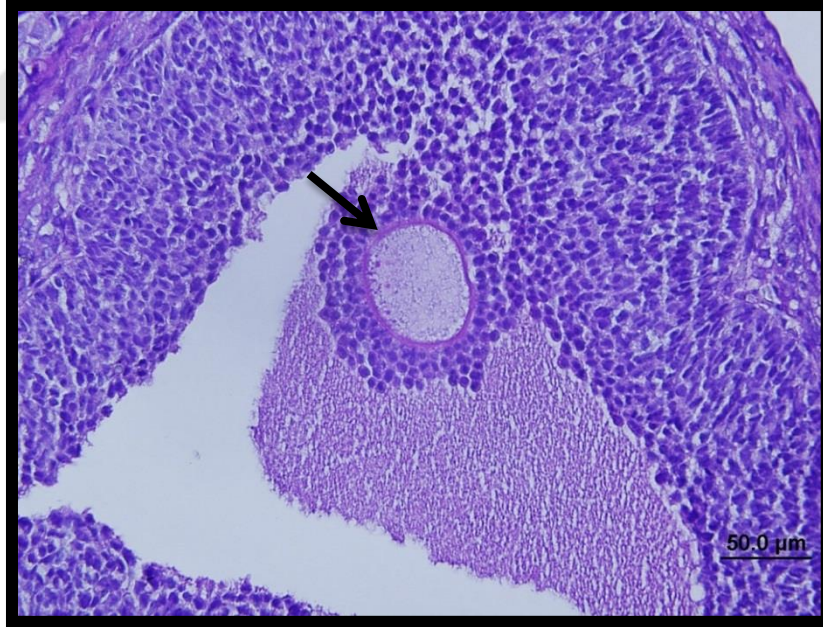
PKOS+Kisspeptin grubunda ise foliküllerde yer alan zona pellusida yapısının normal morfolojiye sahip olduğu ve PAS + reaksiyon gösterdiği gözlemlendi.



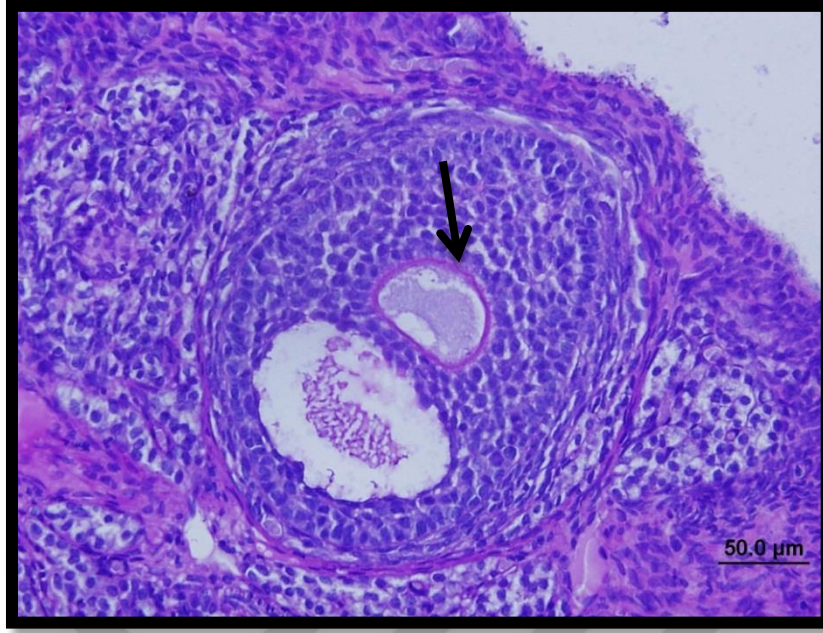
Şekil 33: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Çok tabakalı primer folikülde normal morfolojiye sahip zona pellusida yapısı (←) gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



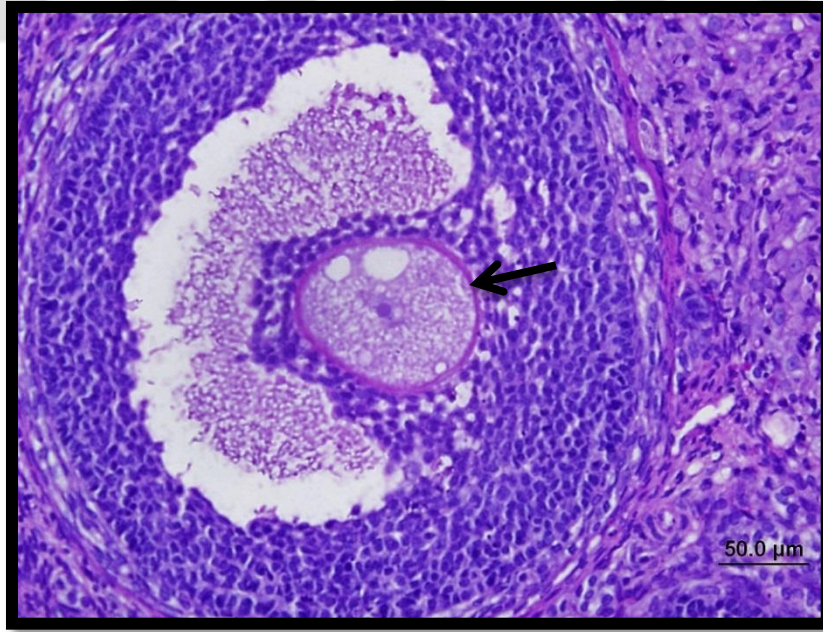
Şekil 34: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikül yapısındaki PAS + reaksiyon gösteren zona pellusida (↖) gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



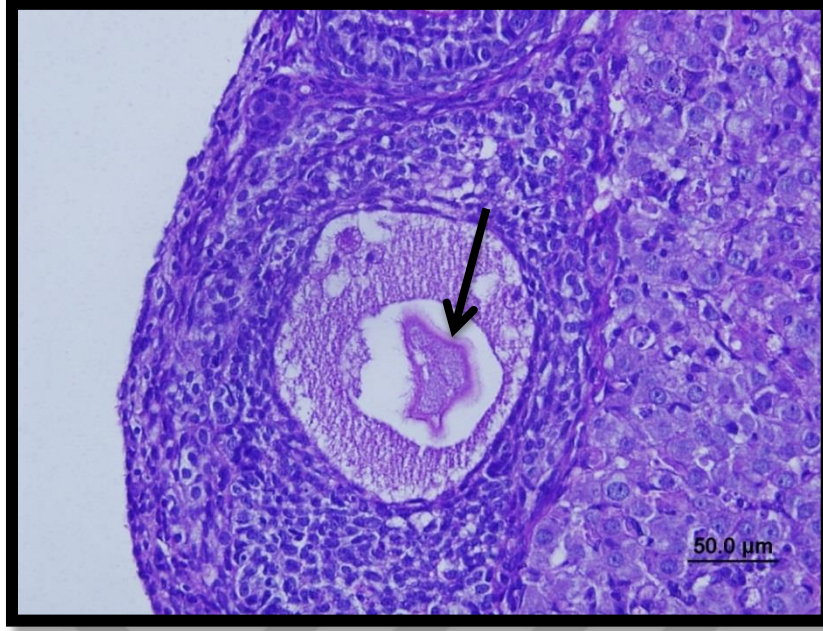
Şekil 35: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikülünün yapısındaki PAS + reaksiyon gösteren zona pellusida (↗) gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



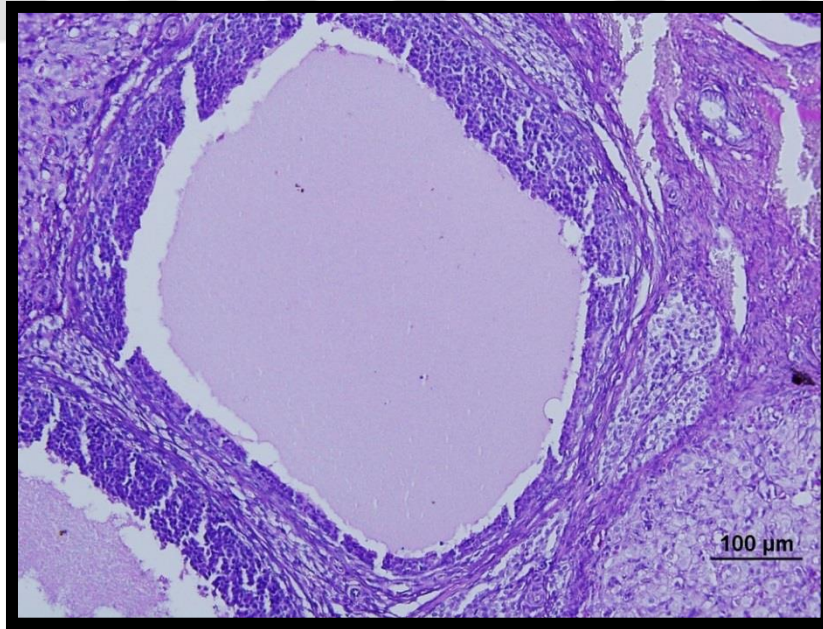
Şekil 36: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikül yapısındaki PAS + reaksiyon gösteren zona pellusida (←) gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



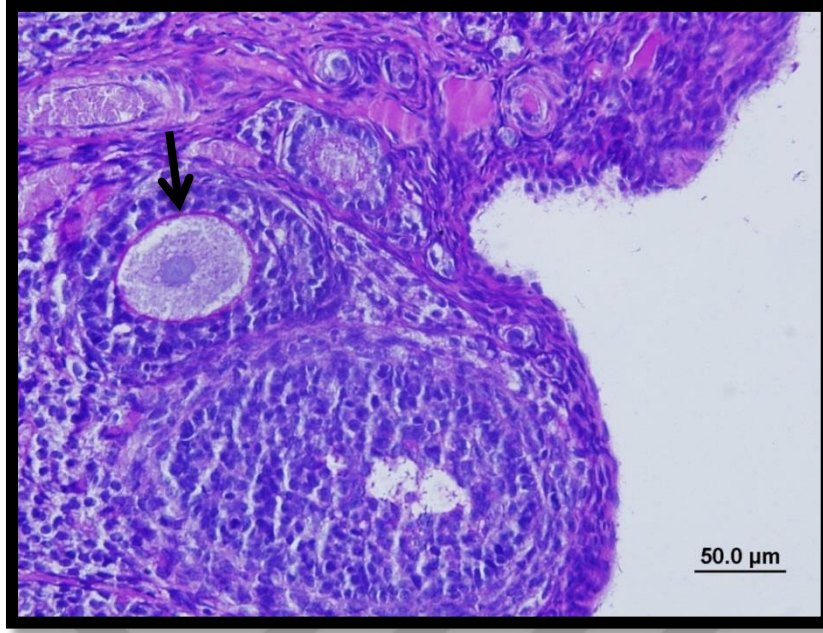
Şekil 37: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikülünün yapısındaki PAS + reaksiyon gösteren zona pellusida (←) gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



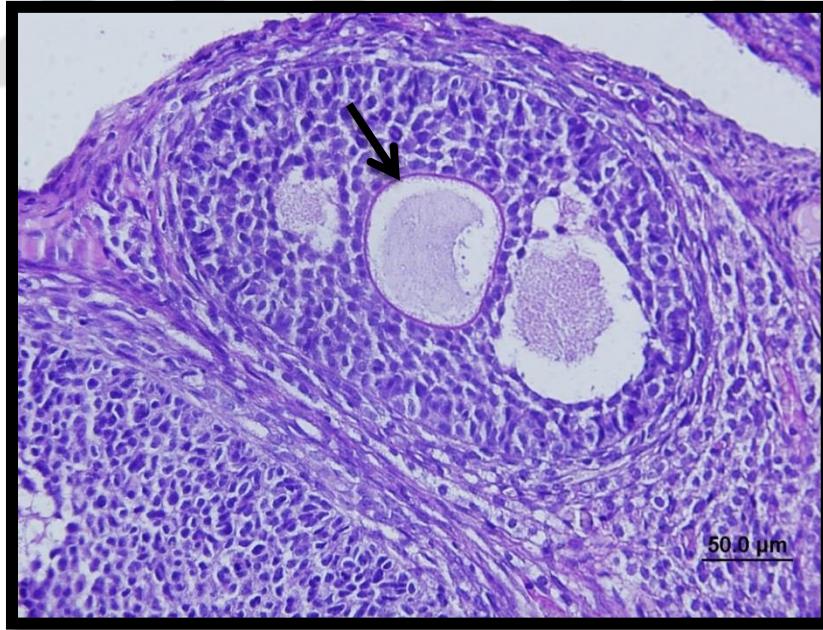
Şekil 38: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Atretik foliküldeki dejenere olmuş zona pellusida yapısı (←) gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



Şekil 39: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Kist folikülü gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



Şekil 40: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Çok tabakalı primer folikülde primer oositi çevreleyen zona pellusida yapısı ($\longleftrightarrow$ gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)



Şekil 41: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait PAS+ reaksiyon gösteren zona pellusida ($\longleftrightarrow$) gösterilmiştir. (PAS, X40 büyütme)

4.2.3. MassonTrikrom Boya Değerlendirmesi

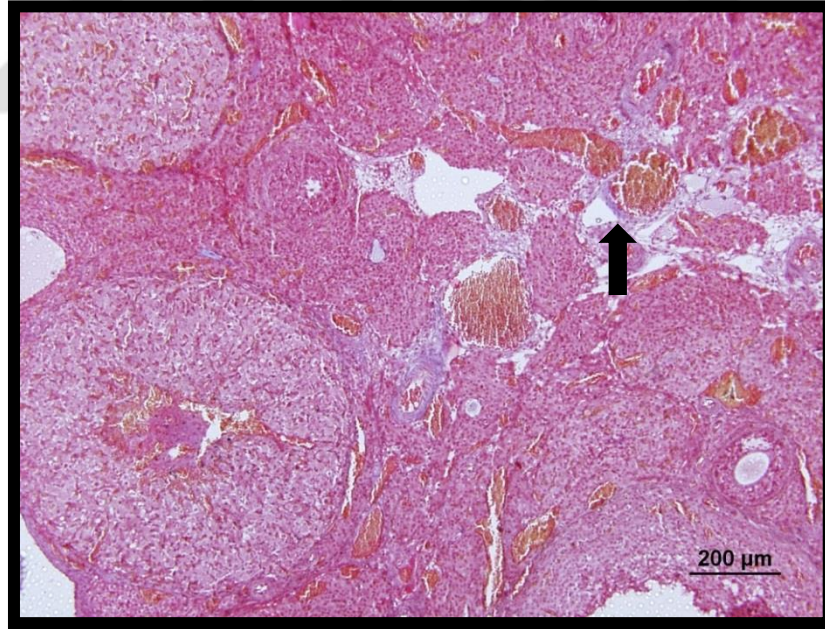
Çalışmamızda ovaryumda bağ dokusu artışını belirlemek amacıyla Masson Trikrom boyaması yapıldı. Bu boyama sonucunda nukleuslar siyah, sitoplazma kırmızı, kollajen ve mukus mavi renkte görülmektedir.

Kontrol grubu Masson Trikrom boyama kesitleri incelendiğinde, kortekste foliküllerin etrafında ve medullar bölgede kollajen miktarının normal seyirde olduğu tespit edildi.

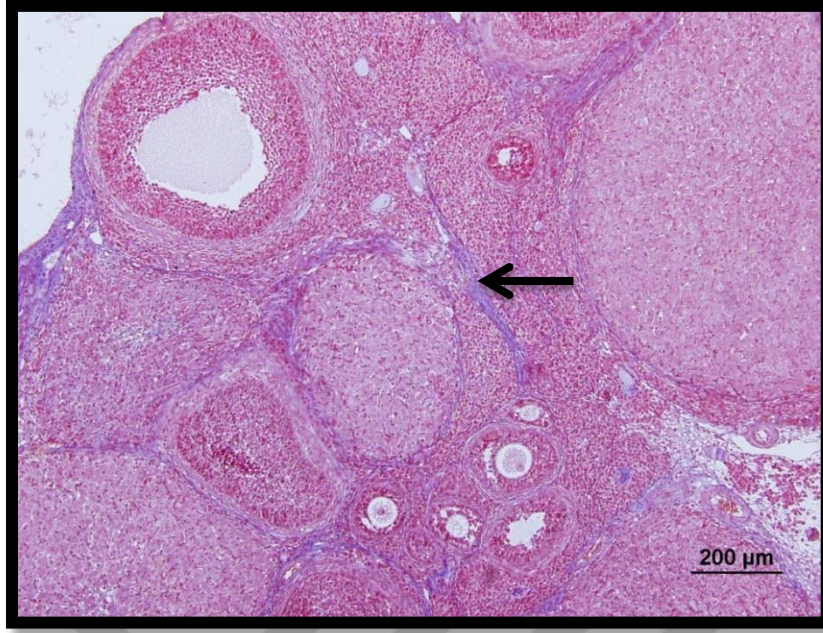
Çözgen grubu Masson Trikrom boyama kesitleri incelendiğinde, kontrol grubuna benzer sonuçların olduğu gözlemlendi.

PKOS grubu Masson Trikrom boyama kesitleri incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer sonuçların olduğu gözlemlendi.

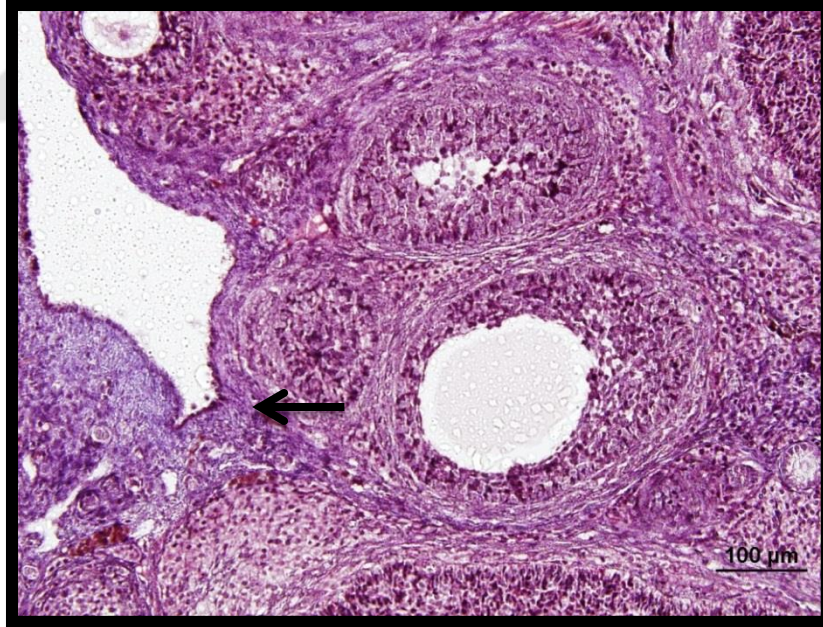
PKOS+Kisspeptin grubu Masson Trikrom boyama kesitleri incelendiğinde, kontrol ve PKOS grubu ile benzer sonuçların olduğu gözlemlendi.



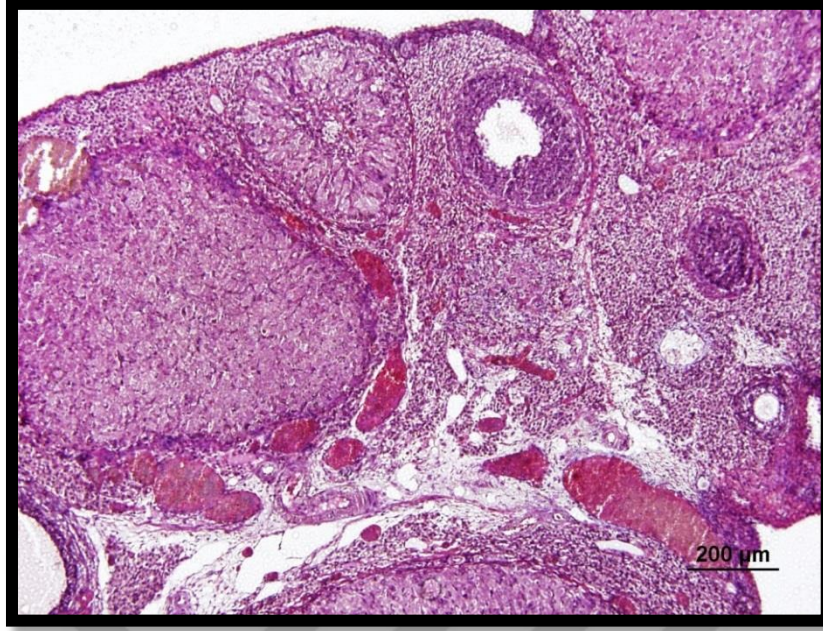
Şekil 42: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Medullar bölgede (←) normal yoğunluktaki kollajen miktarı gösterilmiştir. (MassonTrikrom, X10 büyütme)



Şekil 43: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks ve medullar bölgede normal yoğunluktaki kollajen miktarı (←) gösterilmiştir. (MassonTrikrom, X10 büyütme)



Şekil 44: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks bölgesinde normal seyirde gözlenen kollajen miktarı (←) gösterilmiştir. (MassonTrikrom, X20 büyütme)



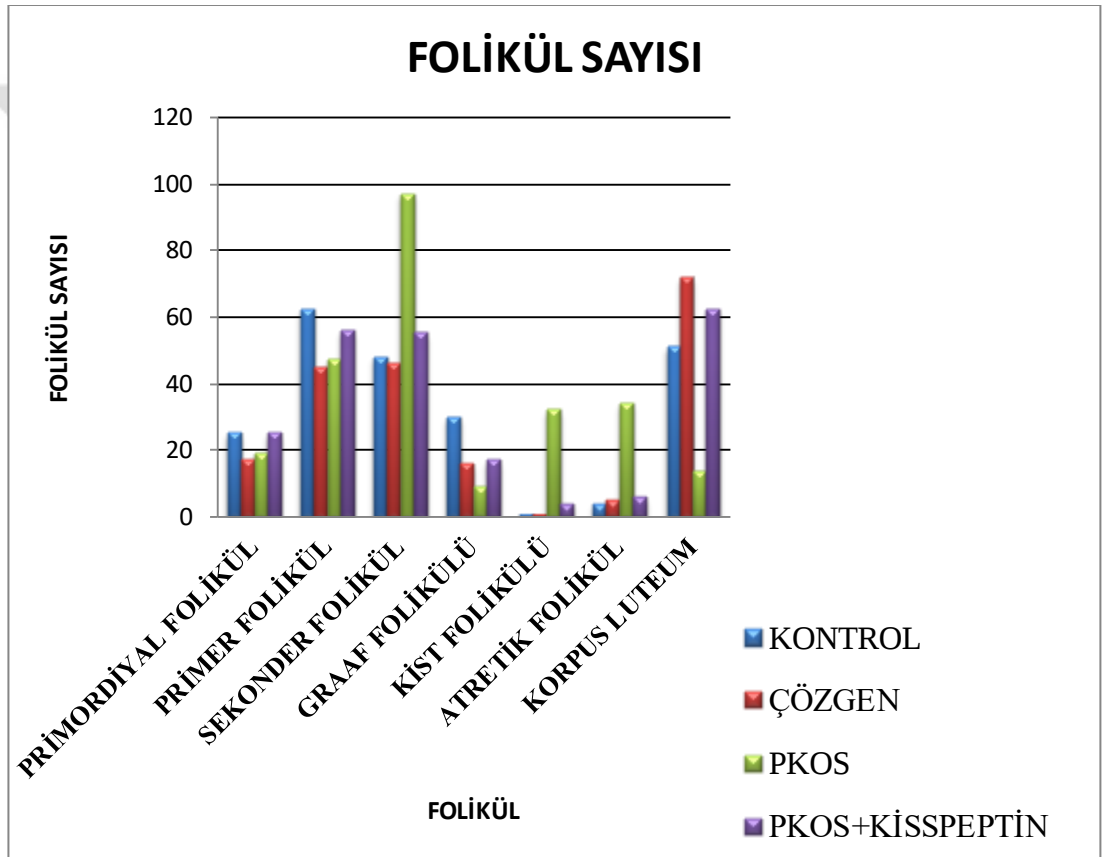
Şekil 45: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Korteks ve medulla bölgesinde normal yoğunlukta gözlenen kollajen miktarı gözlenmektedir. (Masson Trikom, X10 büyütme)

4.3. Morfometrik Bulgular

4.3.1. Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm foliküller için literatür ile uyumlu olarak her deneğe ait seri kesitlerden 40. kesitte (her over için 10-12 kesit) foliküller sayıldı. Folikül sayıları önceden oluşturulmuş tabloya sayısal veriler olarak not edildi. Daha sonra bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

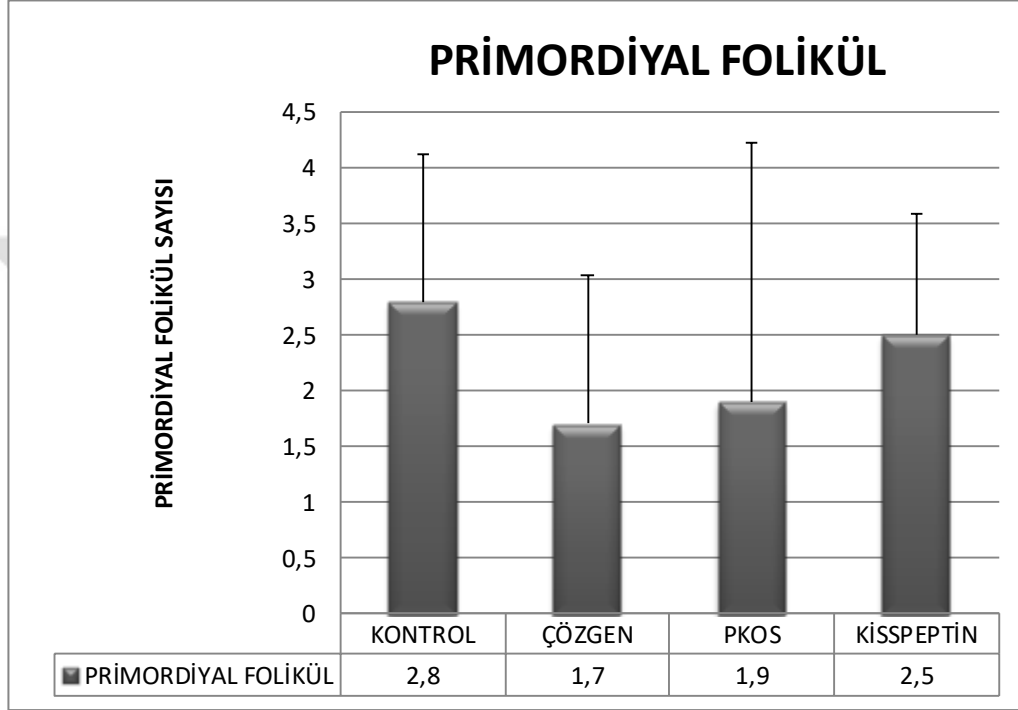
Foliküller primordiyal, primer, sekonder, graaf, atretik, kist folikülü ve korpus luteum olarak değerlendirildi.



Şekil 46: Gruplar arası folikül sayılarının ortalaması.

4.3.1.1. Primordiyal Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde primordiyal folikül sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre primordiyal folikül sayısı, kontrol grubunda $2,80 \pm 0,41$, çözgen grubunda $1,70 \pm 0,42$, PKOS grubunda $1,90 \pm 0,73$, PKOS+Kisspeptin grubunda $2,50 \pm 0,34$ olarak hesaplandı.

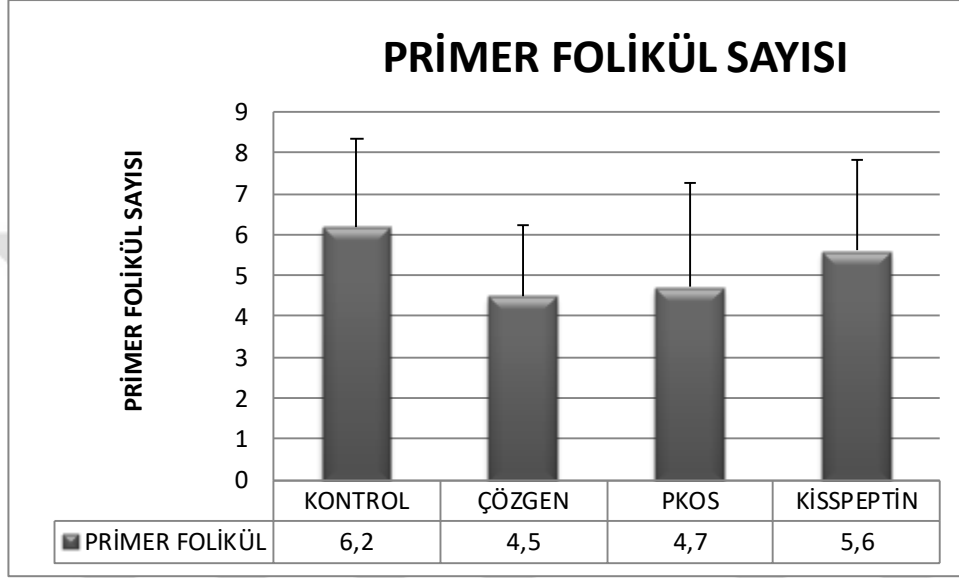


Şekil 47: Gruplar arası primordiyal folikül sayısı.

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol ve çözgen grubun primordiyal folikül sayısı karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,089$). Kontrol grubu ve PKOS grubun primordiyal folikül sayısı karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,144$). Kontrol grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,613$). Çözgen grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,786$). Çözgen ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,163$). PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,218$).

4.3.1.2. Primer Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde primer folikül sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre primer folikül sayısı, kontrol grubunda $6,20 \pm 0,67$, çözgen grubunda $4,50 \pm 0,54$, PKOS grubunda $4,70 \pm 0,80$, PKOS+Kisspeptin grubunda $5,60 \pm 0,70$ olarak hesaplandı.

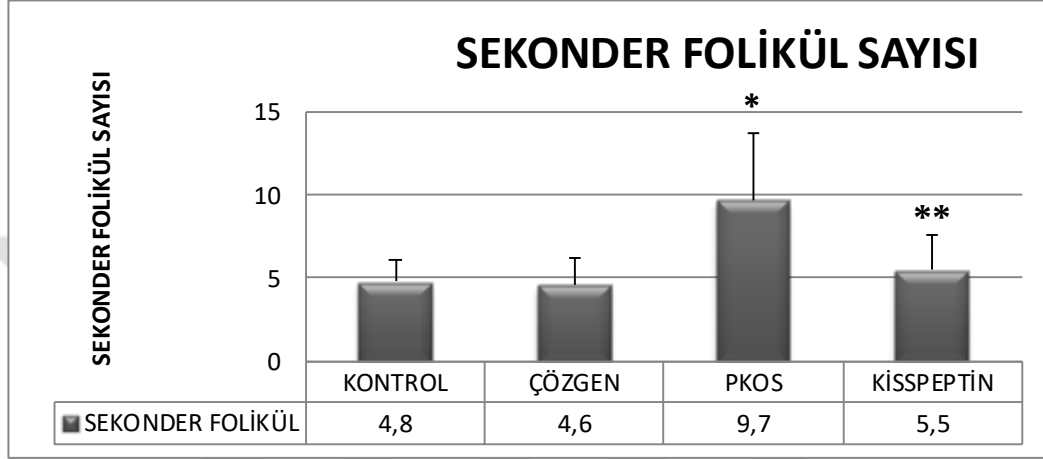


Şekil 48: Gruplar arası primer folikül sayısı.

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubu ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,066$). Kontrol grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,207$). Kontrol grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,438$). Çözgen ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,789$). Çözgen ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,201$). PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,555$).

4.3.1.3. Sekonder Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde sekonder folikül sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre sekonder folikül sayısı, kontrol grubunda $4,80 \pm 0,41$, çözgen grubunda $4,60 \pm 0,52$, PKOS grubunda $9,70 \pm 1,26$, PKOS+Kisspeptin grubunda $5,50 \pm 0,65$ olarak hesaplandı.



Şekil 49: Gruplar arası sekonder folikül sayısı.

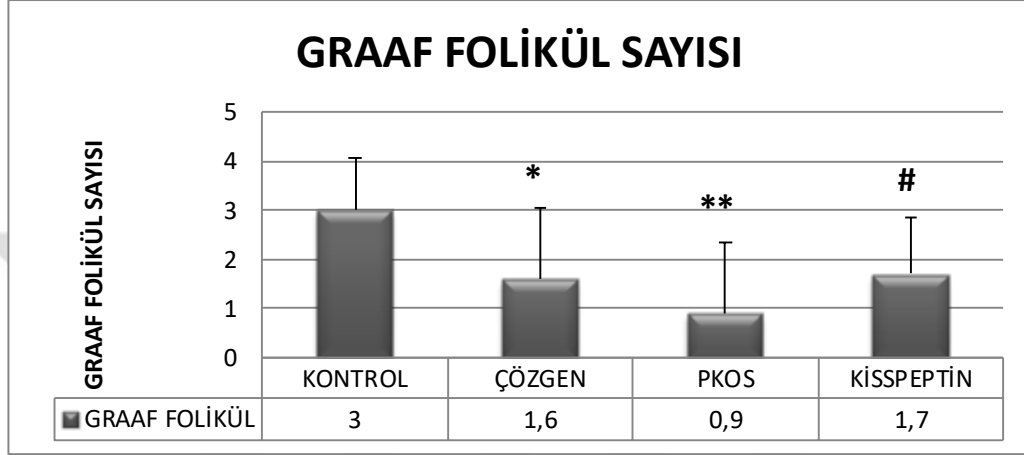
*: Sekonder folikül sayısında kontrol grubu ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,002$).

** : Sekonder folikül sayısında PKOS grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,006$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubu ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,670$). Kontrol ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubun sekonder folikül sayısı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Kontrol ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,490$). Çözgen ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubun sekonder folikül sayısı, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,357$). PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubun sekonder folikül sayısında, PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,006$).

4.3.1.3. Graaf Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde graaf folikül sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre graaf folikül sayısı, kontrol grubunda $3,00 \pm 0,33$, çözgen grubunda $1,60 \pm 0,45$, PKOS grubunda $0,90 \pm 0,45$, PKOS+Kisspeptin grubunda $1,70 \pm 0,36$ olarak hesaplandı.



Şekil 50: Gruplar arası graaf folikül sayısı.

* : Graaf folikül sayısında kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,030$).

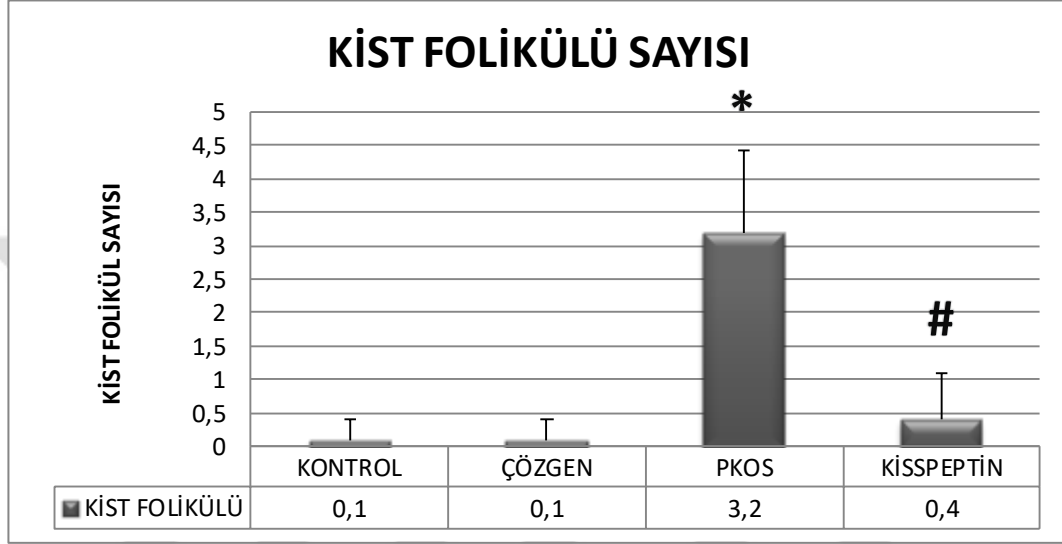
** : Graaf folikül sayısında kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,050$).

: Graaf folikül sayısında kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,022$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, çözgen grubun graaf folikül sayısında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,030$). Kontrol grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubun graaf folikül sayısında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,005$). Kontrol grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubun graaf folikül sayısında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,022$). Çözgen grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,216$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,816$). PKOS grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,124$).

4.3.1.5. Kist Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde kist folikül sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre kist folikül sayısı, kontrol grubunda $0,10 \pm 0,10$, çözgen grubunda $0,10 \pm 0,10$, PKOS grubunda $3,20 \pm 0,38$, PKOS+Kisspeptin $0,40 \pm 0,22$ olarak hesaplandı.



Şekil 51: Gruplar arası kist folikül sayısı.

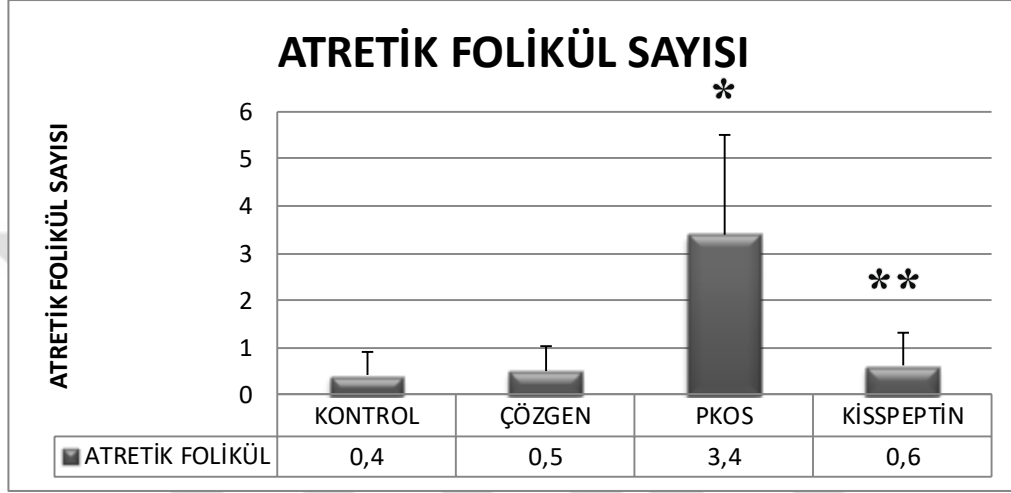
*: Kist folikül sayısında kontrol grubuna göre anlamlı artma ($p=0,001$).

#: Kist folikül sayısında PKOS grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubu ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=1,000$). Kontrol ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubun kist folikül sayısında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Kontrol ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,255$). Çözgen ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,255$). PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun kist folikül sayısında, PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0,001$).

4.3.1.6. Atretik Folikül Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde atretik folikül sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre atretik folikül sayısı, kontrol grubunda $0,40 \pm 0,16$, çözgen grubunda $0,50 \pm 0,16$, PKOS grubunda $3,40 \pm 0,66$, PKOS+Kisspeptin grubunda $0,60 \pm 0,22$ olarak hesaplandı.



Şekil 52: Gruplar arası atretik folikül sayısı.

*: Atretik folikül sayısında kontrol grubu ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,001$).

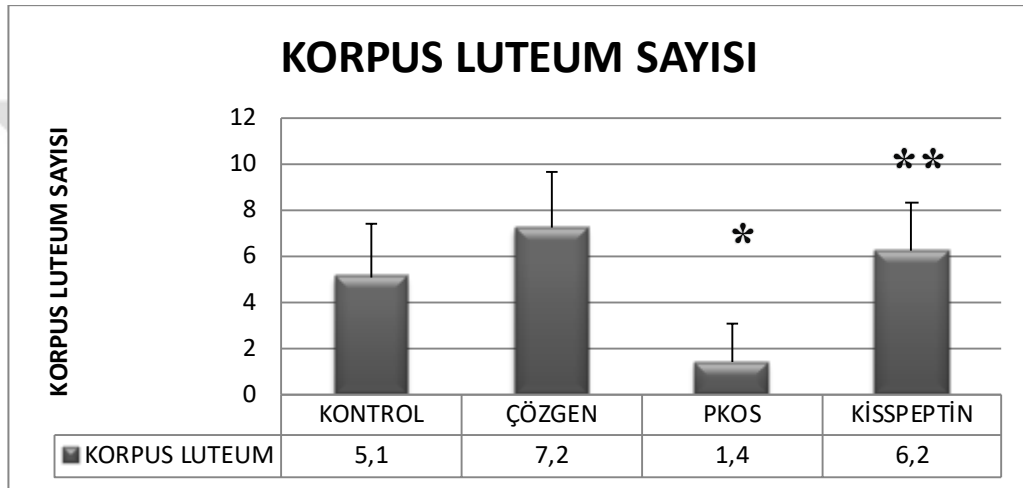
** : Atretik folikül sayısında PKOS grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,547$). Kontrol ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubun atretik folikül sayısında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Kontrol ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,547$). Çözgen ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubun atretik folikül sayısında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,831$). PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubun atretik folikül

sayısında, PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$).

4.3.1.7. Korpus Luteum Sayısının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde korpus luteum sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre korpus luteum sayısı, kontrol grubunda $5,10 \pm 0,73$, çözgen grubunda $7,20 \pm 0,77$, PKOS grubunda $1,40 \pm 0,52$, PKOS+Kisspeptin grubunda $6,20 \pm 0,66$ olarak hesaplandı.



Şekil 53: Gruplar arası korpus luteum sayısı.

*: Korpus luteum sayısında kontrol grubu ve çözgen grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

** : Korpus luteum sayısında PKOS grubuna göre anlamlı artış ($p=0,001$).

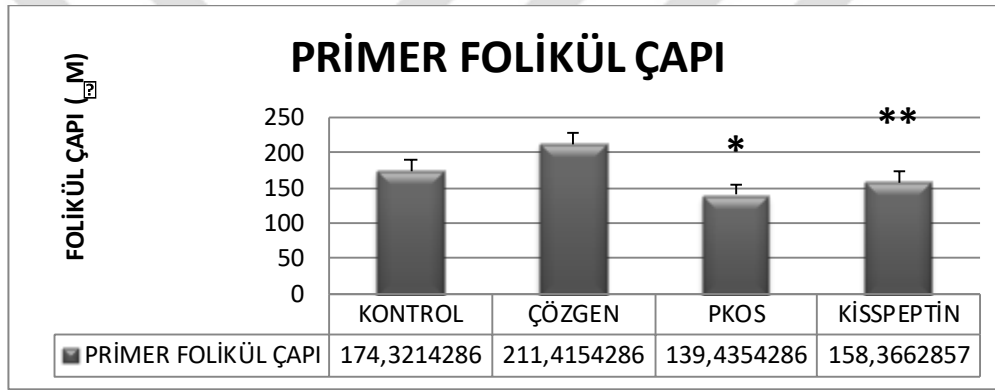
Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,092$). Kontrol ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun korpus luteum sayısında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Kontrol ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,222$). Çözgen ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun korpus luteum sayısında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak

anlamli değildi ($p=0,358$). PKOS ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun korpus luteum sayısında, PKOS+Kisspeptin grubuna göre istatistiksel olarak anlamli bir azalma olduğu gözlendi ($p=0,001$).

4.3.2. Folikül  aplarının Değerlendirilmesi

4.3.2.1. Primer Folikül  apının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde primer folikül çapı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre primer folikül çapları, kontrol grubunda $174,32\pm8,29$ μm , çözgen grubunda $211,41\pm8,94$ μm , PKOS grubunda $139,43\pm10,89$ μm , PKOS+Kisspeptin grubunda $158,36\pm11,51$ μm olarak hesaplandı.



şekil 54: Gruplar arası primer folikül çaplarının ortalaması

*: Primer folikül çapında kontrol grubu ve çözgen grubuna göre anlamli azalma ($p=0,003$ ve $p=0,001$).

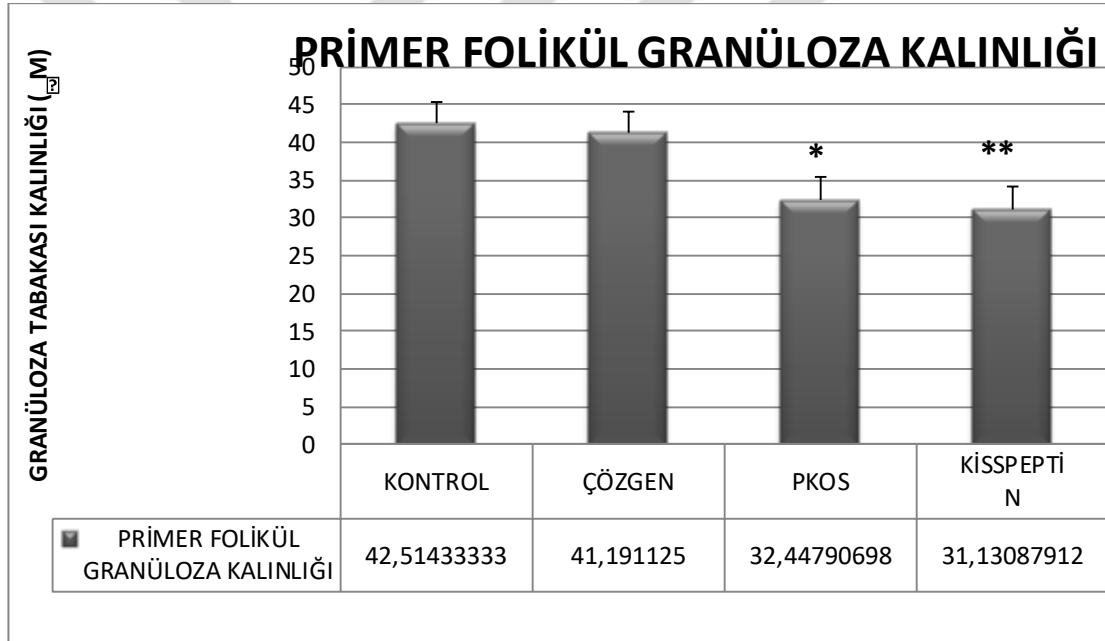
** : Primer folikül çapında çözgen grubuna göre anlamli azalma ($p=0,001$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubu ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, çözgen grubun primer folikül çapında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamli artma olduğu gözlendi ($p=0,003$). Kontrol grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun primer folikül çapında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamli azalma olduğu gözlendi ($p=0,001$). Kontrol grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamli değildi ($p=0,273$). Çözgen grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun primer folikül çapında, çözgen grubuna

göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun primer folikül çapında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). PKOS grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,165$).

4.3.2.2. Primer Folikül Granüloza Tabakası Kalınlığının Değerlendirilmesi

Tüm gruplardan her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde primer folikülün granüloza tabakasının kalınlığı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre granüloza tabakası kalınlığı, kontrol grubunda $42,51 \pm 2,20 \mu\text{m}$, çözgen grubunda $41,19 \pm 3,492 \mu\text{m}$, PKOS grubunda $32,42 \pm 2,49 \mu\text{m}$, PKOS+Kisspeptin grubunda $31,14 \pm 2,04 \mu\text{m}$ olarak hesaplandı.



Şekil 55: Gruplar arası primer folikül granüloza tabakasının kalınlık ortalaması

*: Primer folikül granüloza kalınlığında kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

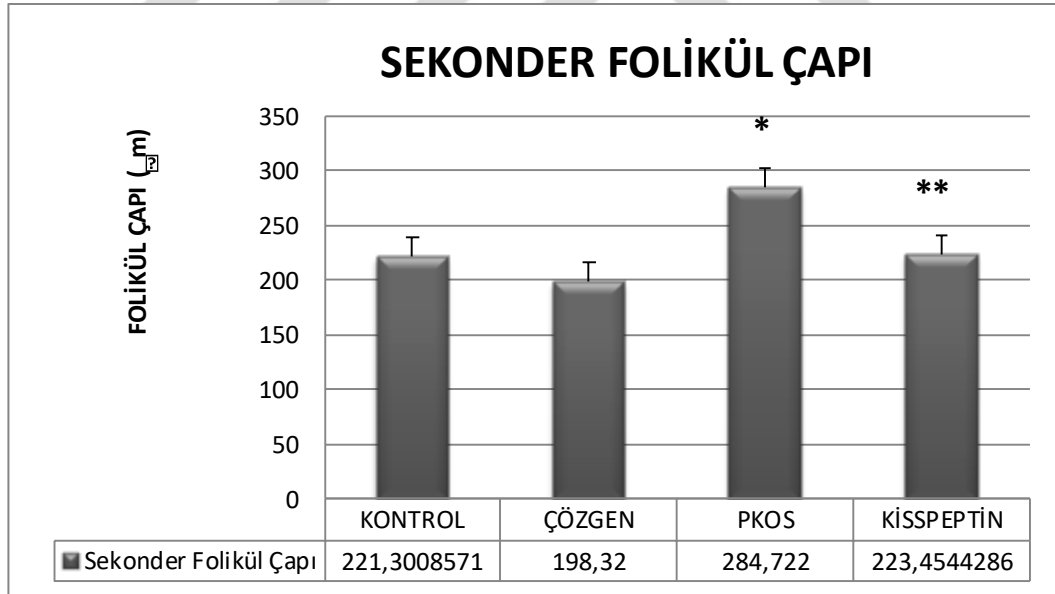
**: Primer folikül granüloza kalınlığında kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubu ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,079$). Kontrol grubu ve

PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun granüloza tabakası kalınlığında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Kontrol grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun granüloza tabakası kalınlığında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun granüloza tabakası kalınlığında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,014$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,297$). PKOS grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,073$).

4.3.2.3. Sekonder Folikül Çapının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde sekonder folikül çapı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre sekonder folikül çapları, kontrol grubunda $221,30 \pm 11,81 \mu\text{m}$, çözgen grubunda $198,32 \pm 8,22 \mu\text{m}$, PKOS grubunda $284,72 \pm 11,97 \mu\text{m}$, PKOS+Kisspeptin grubunda $223,45 \pm 8,38 \mu\text{m}$ olarak hesaplandı.



Şekil 56: Gruplar arası sekonder folikül çaplarının ortalaması

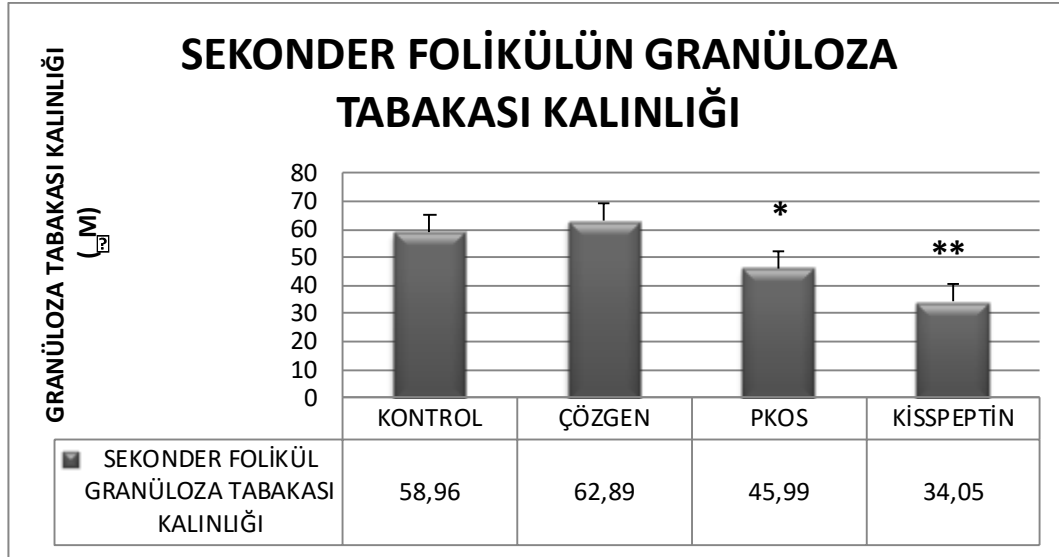
*: Sekonder folikül çapında kontrol ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,001$, $p=0,001$).

**: Sekonder folikül çapında PKOS grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubu ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,588$). Kontrol grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun sekonder folikül çapında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$). Kontrol grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,164$). Çözgen grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun sekonder folikül çapında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun sekonder folikül çapında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma olduğu gözlenmiştir ($p=0,028$). PKOS grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun sekonder folikül çapında, PKOS+Kisspeptin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$).

4.3.2.4. Sekonder Folikül Granüloza Tabakası Kalınlılığının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda her denekten elde edilen ovaryum seri kesitlerinde sekonder folikülün granüloza tabakası kalınlılığı hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre granüloza tabakası kalınlılığı, kontrol grubunda $58,96\pm4,37\text{ }\mu\text{m}$, çözgen grubunda $62,89\pm3,60\text{ }\mu\text{m}$, PKOS grubunda $45,99\pm2,06\text{ }\mu\text{m}$, PKOS+Kisspeptin grubunda $34,05\pm2,06\text{ }\mu\text{m}$ olarak hesaplandı.



Şekil 57: Gruplar arası sekonder folikül granüloza tabakası nın kalınlık ortalaması

*: Sekonder folikül granüloza tabakası kalınlığında kontrol grubu ve çözgen grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,012$).

**: Sekonder folikül granüloza tabakası kalınlığında PKOS grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,034$).

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda; kontrol grubu ve çözgen grubu karşılaştırıldığında, granüloza tabakası kalınlığı bakımından, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,095$). Kontrol ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun granüloza tabakası kalınlığında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,012$). Kontrol grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun granüloza tabakası kalınlığında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun granüloza tabakası kalınlığında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun granüloza tabakası kalınlığında, çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). PKOS grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun granüloza tabakası kalınlığında, PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,034$).

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1. mTOR İmmünohistokimya Boyama Bulguları

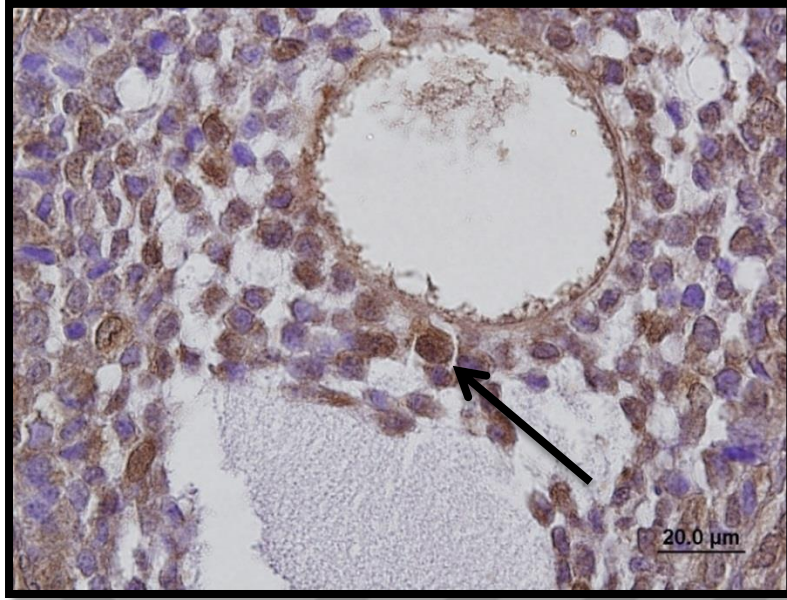
Farklı gruplardan alınan ovaryum doku örneklerinin kesitlerinde mTOR proteinini gösterebilmek amacı ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Değerlendirilen kontrol, çözgen, PKOS ve PKOS+Kisspeptin gruplarının hepsinde mTOR antikorunun, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin granüloza ve teka interna hücre tabakasında, primer oositte ve korpus luteum yapısında yer aldığı gözlemlendi.

Kontrol grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerde granüloza ve teka interna tabakasındaki hücrelerin sitoplazmalarında mTOR immünopozitivitesi gözlemlendi. Farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin içerisinde yer alan primer oositlerde mTOR için sitoplazmik immün boyanma gözlemlendi. Korpus luteumda yer alan hücreler ise foliküllerde yer alan granüloza ve teka interna hücrelerine göre zayıf bir immün boyanma izlendi.

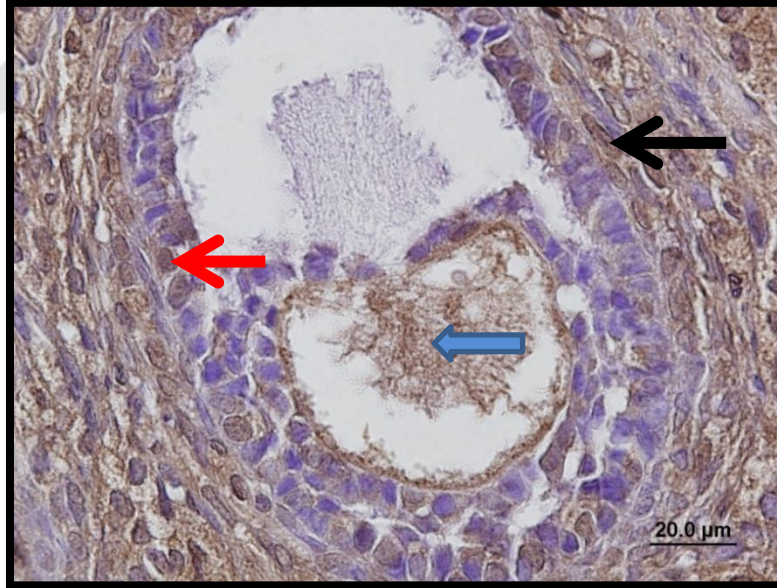
Çözgen grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde kontrol grubuna benzer olarak gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin granüloza ve teka interna tabakalarında mTOR immünopozitivitesi gözlemlendi. Ayrıca foliküllerde yer alan oositlerde mTOR için sitoplazmik immün boyanma gözlemlendi.

PKOS grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde gelişimin farklı aşamalarındaki primer ve sekonder foliküllerin granüloza ve teka interna tabakasındaki hücrelerde mTOR immünopozitivitesi izlendi. PKOS grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında granüloza hücrelerinde pozitif hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi. Ayrıca foliküllerde yer alan primer oositlerin mTOR için sitoplazmik immünopozitif olduğu görüldü.

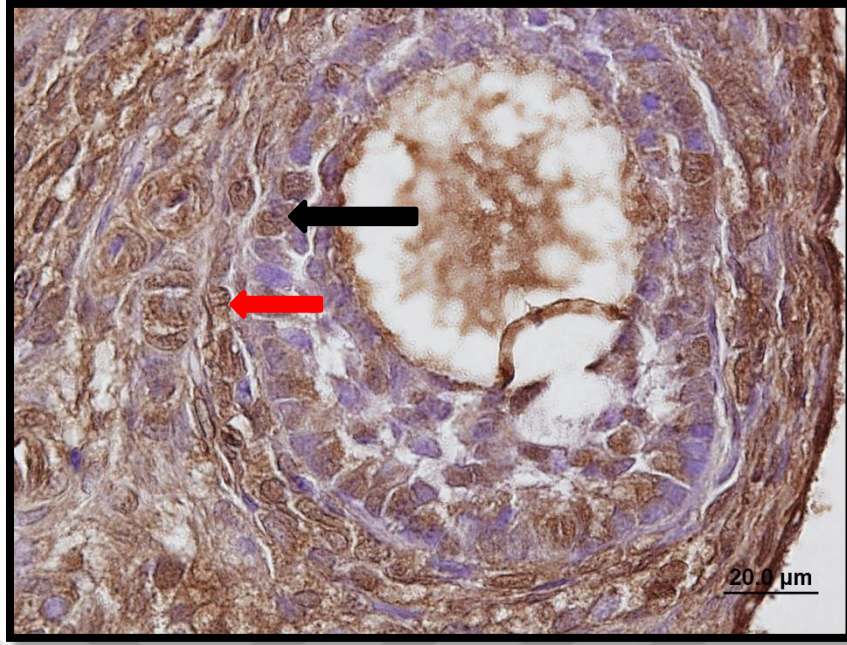
PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum doku örnekleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre gelişiminin farklı aşamalarındaki foliküllerin granüloza ve teka interna tabakasındaki hücrelere kıyasla mTOR antikoru için zayıf sitoplazmik immünopozitif olduğu gözlemlendi. Foliküllerde yer alan primer oositlerde ise kontrol ve PKOS grubuna benzer sitoplazmik bir immünopozitivite gözlemlendi.



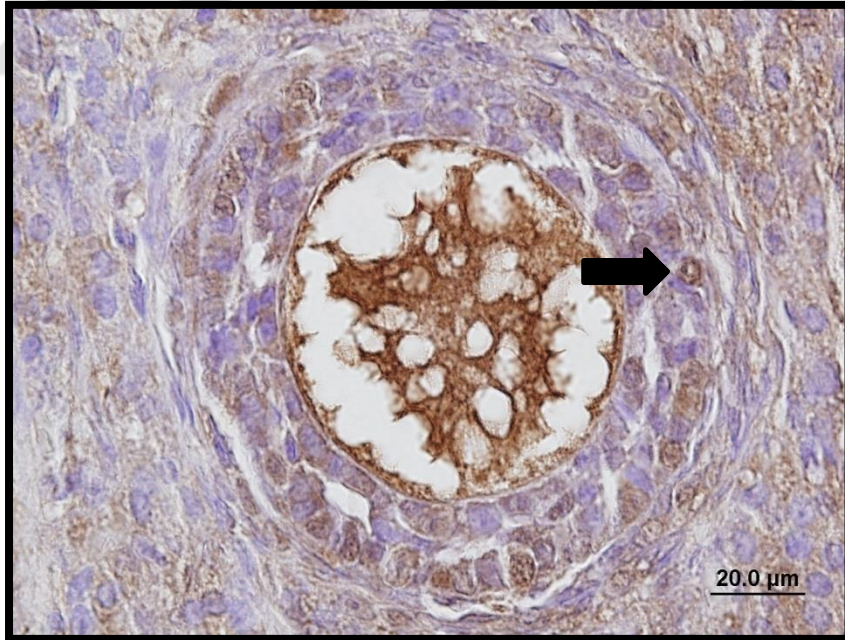
Şekil 58: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza hücre tabakasında yer alan hücrelerin sitoplazmalarında mTOR immünopozitivitesi (**←**) gösterilmiştir. (mTOR, X100 büyütme)



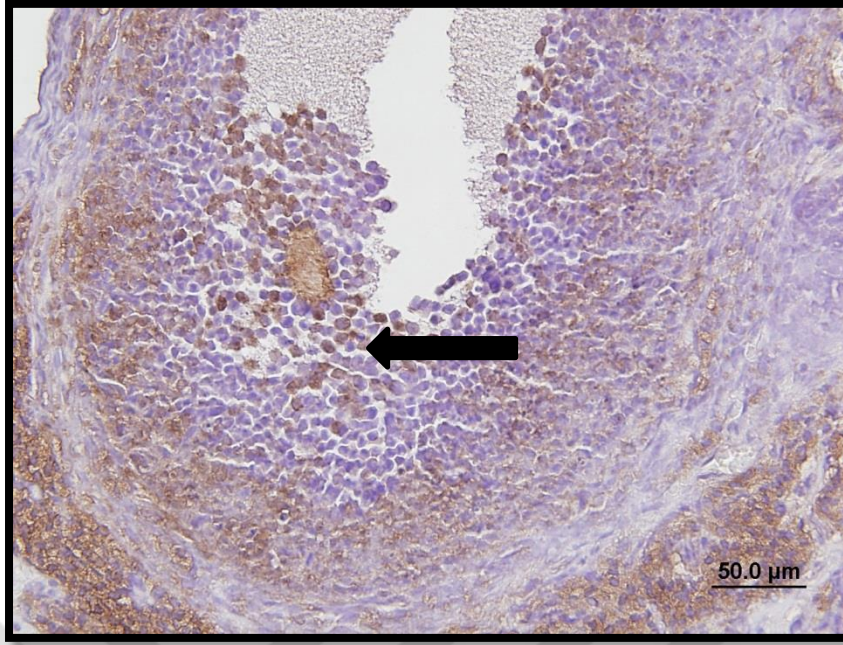
Şekil 59: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikülde granüloza hücrelerinin sitoplazmasında mTOR immünopozitivitesi (**←**) ve teka interna tabakasındaki hücrelerin sitoplazmasında mTOR immünopozitivitesi (**←**) gösterilmiştir. Ayrıca sekonder folikülün içerisinde yer alan primer oosit mTOR immünopozitivitesi (**←**) göstermektedir. (mTOR, X100 büyütme)



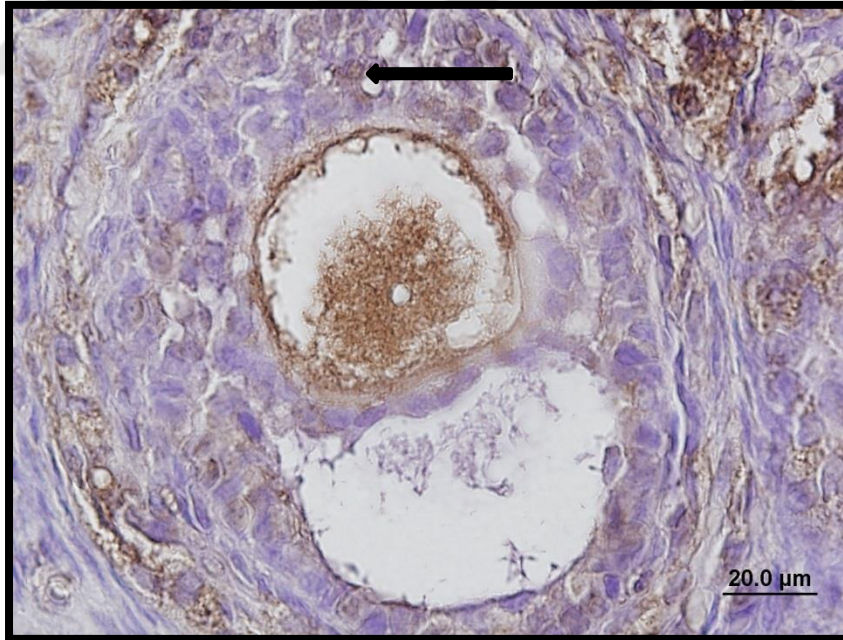
Şekil 60: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikülde yer alan granüloza (←) ve teka interna tabakasındaki hücrelerde sitoplazmik mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (mTOR, X100 büyütme)



Şekil 61: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Primer folikülde yer alan granüloza hücre tabakasındaki hücrelerde sitoplazmik mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (mTOR, X100 büyütme)



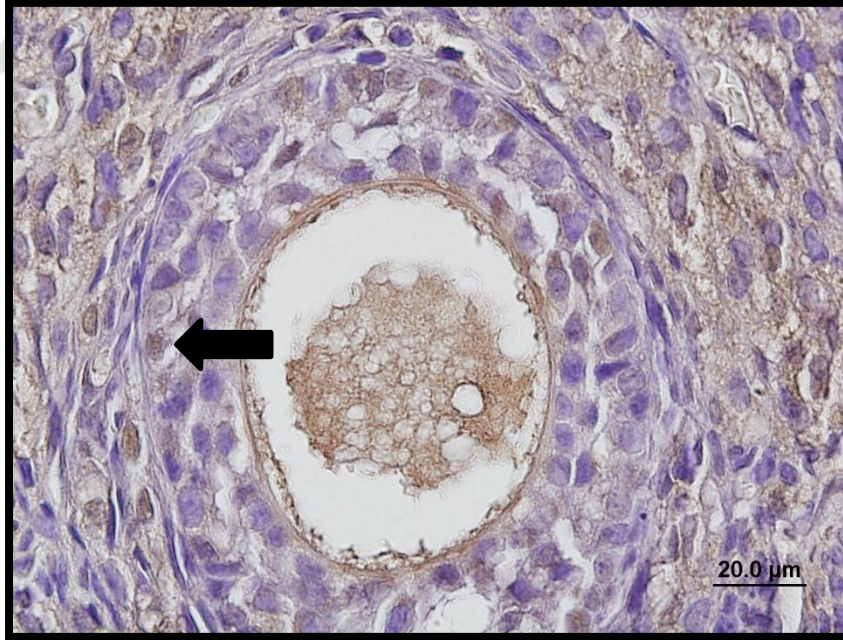
Şekil 62: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikülde yer alan granüloza hücrelerindeki mTOR immünopozitivitesi () gösterilmiştir. (mTOR, X40 büyütme)



Şekil 63: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza hücre tabakasındaki mTOR immünopozitivitesi () gösterilmiştir. (mTOR, X100 büyütme)



Şekil 64: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza hücre tabakasındaki sitoplazmik mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (mTOR, X40 büyütme)



Şekil 65: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Primer folikülde yer alan granüloza hücre tabakasındaki sitoplazmik mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (mTOR, X100 büyütme)

4.4.2. p-mTOR İmmünohistokimya Boyama Bulguları

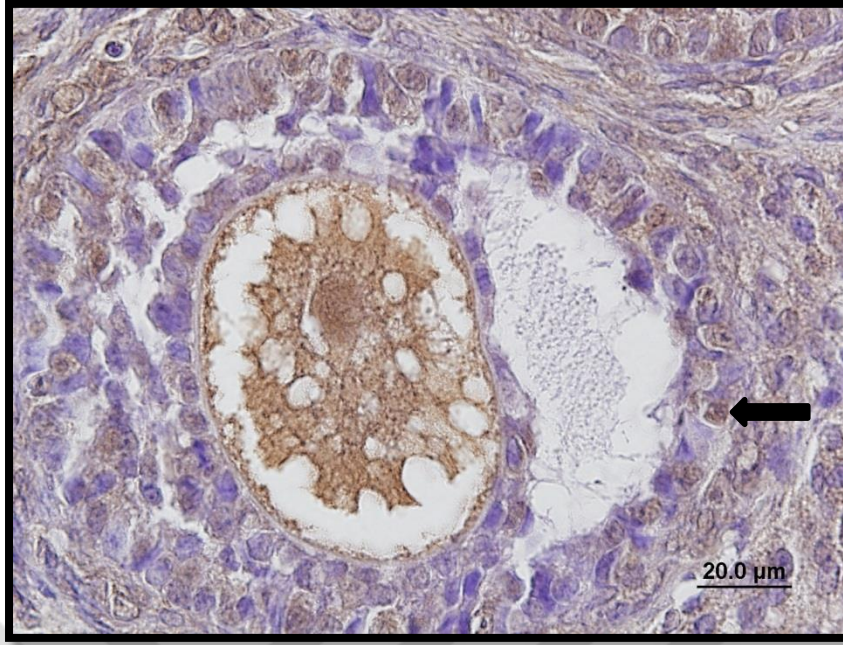
Farklı gruplardan alınan ovaryum doku örneklerinin kesitlerinde p-mTOR proteinini gösterebilmek amacı ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Değerlendirilen kontrol, çözgen, PKOS ve PKOS+Kisspeptin gruplarının hepsinde p-mTOR antikorunun, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin granüloza ve teka interna hücre tabakasında, primer oositte ve korpus luteum yapısında yer aldığı gözlemlendi. Bu gruplardan PKOS grubunda p-mTOR antikorunun immünopozitivitesinin daha fazla olduğu izlendi.

Kontrol grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerde granüloza ve teka interna tabakasındaki hücrelerin sitoplazmalarında p-mTOR immünopozitivitesi gözlemlendi. Farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin içerisinde yer alan primer oositlerde p-mTOR için sitoplazmik immün boyanma gözlemlendi. Korpus luteumda yer alan hücreler ise foliküllerde yer alan granüloza ve teka interna hücrelerine göre zayıf bir immün boyanma izlendi.

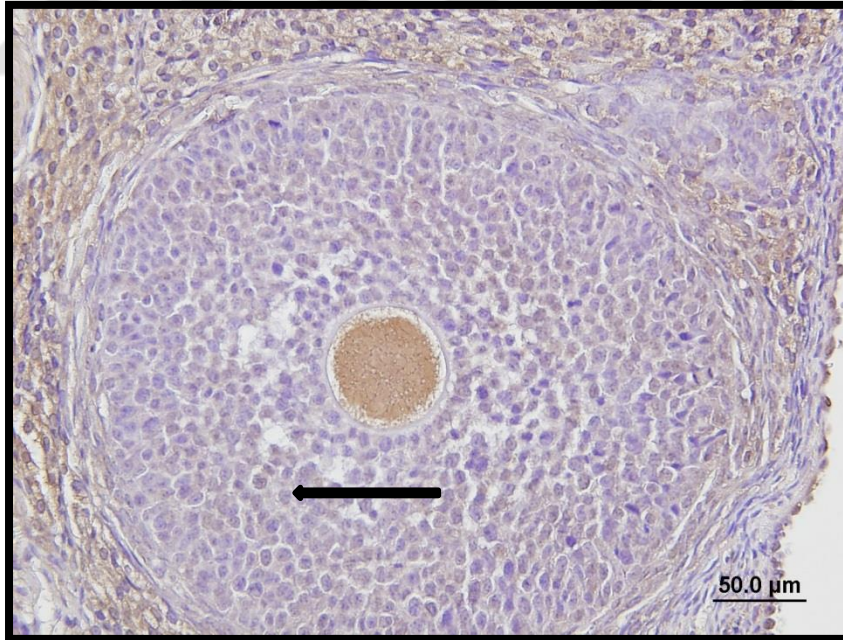
Çözgen grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde kontrol grubuna benzer olarak gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin granüloza ve teka interna tabakalarında p-mTOR immünopozitivitesi gözlemlendi. Ayrıca foliküllerde yer alan oositlerde p-mTOR için sitoplazmik immün boyanma gözlemlendi.

PKOS grubuna ait ovaryum kesitleri incelendiğinde gelişimin farklı aşamalarındaki primer ve sekonder foliküllerin granüloza ve teka interna tabakasındaki hücrelerde p-mTOR immünopozitivitesi izlendi. PKOS grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında granüloza hücrelerinde pozitif hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi. Ayrıca foliküllerde yer alan primer oositlerin p-mTOR için sitoplazmik immünopozitif olduğu görüldü.

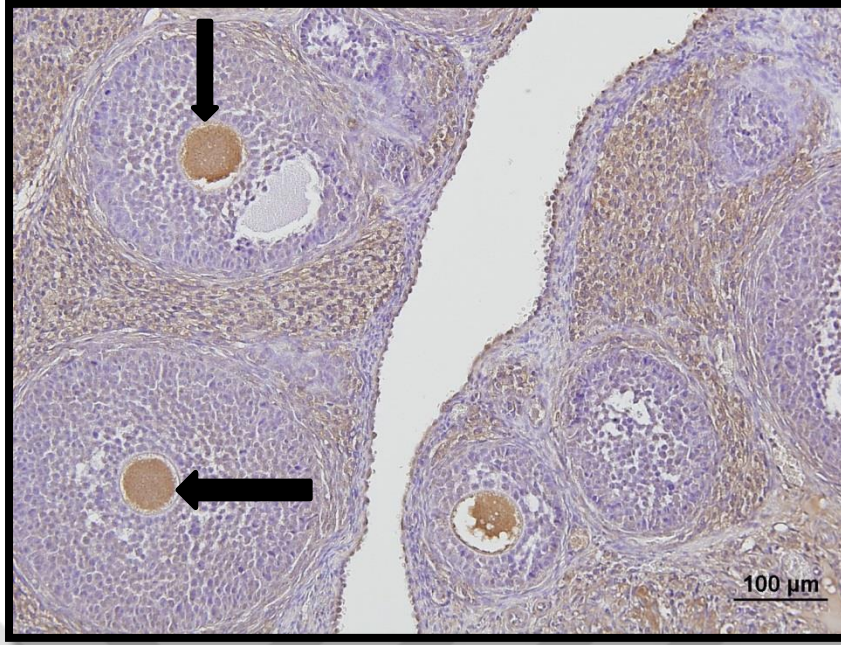
PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum doku örnekleri incelendiğinde, PKOS grubuna göre gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin granüloza ve teka interna tabakasındaki hücrelere kıyasla p-mTOR antikoru için zayıf sitoplazmik immünopozitif olduğu gözlemlendi. Foliküllerde yer alan primer oositlerde ise güçlü sitoplazmik bir immünopozitivite gözlemlendi.



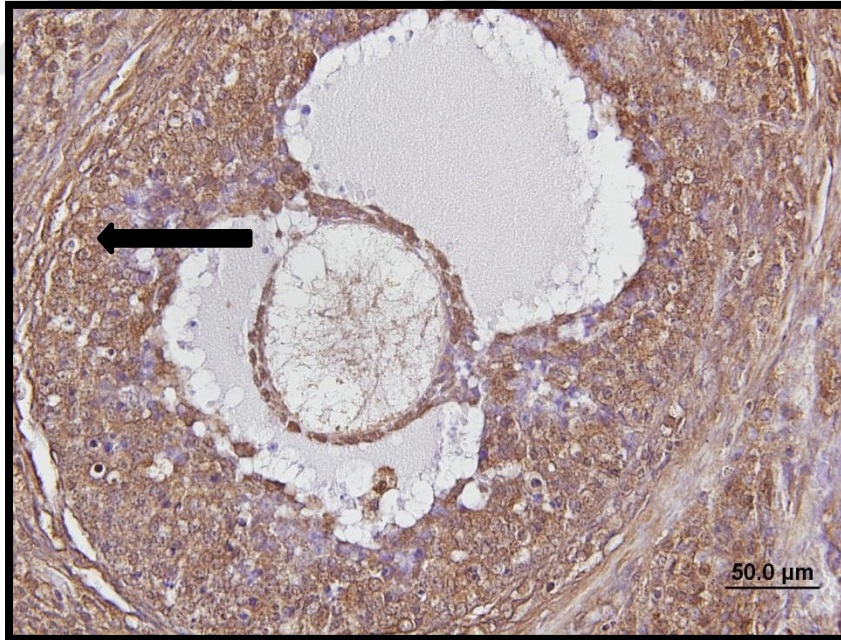
Şekil 66: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza hücre tabakasındaki p-mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X100 büyütme)



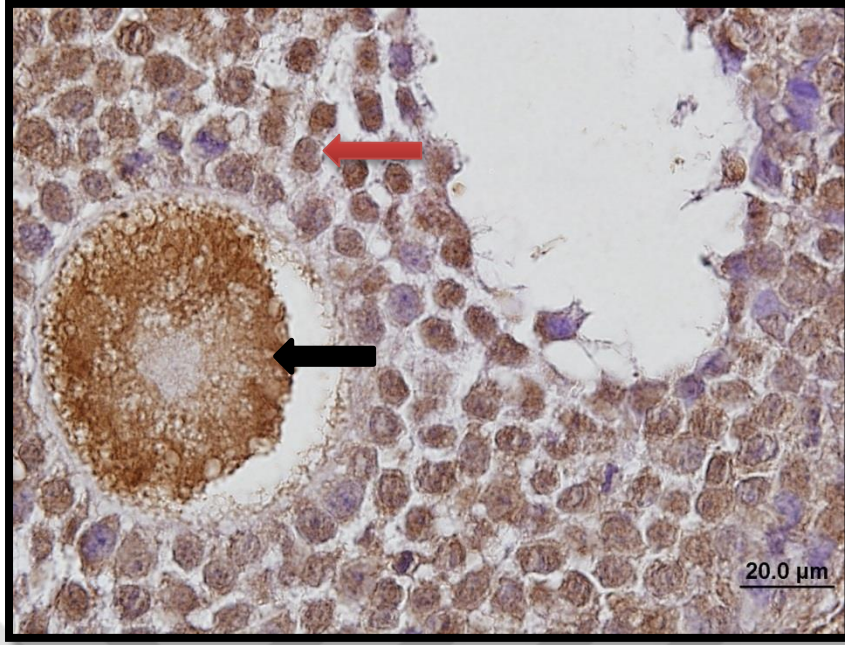
Şekil 67: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Primer foliküle ait granüloza hücre tabakasındaki p-mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X40 büyütme)



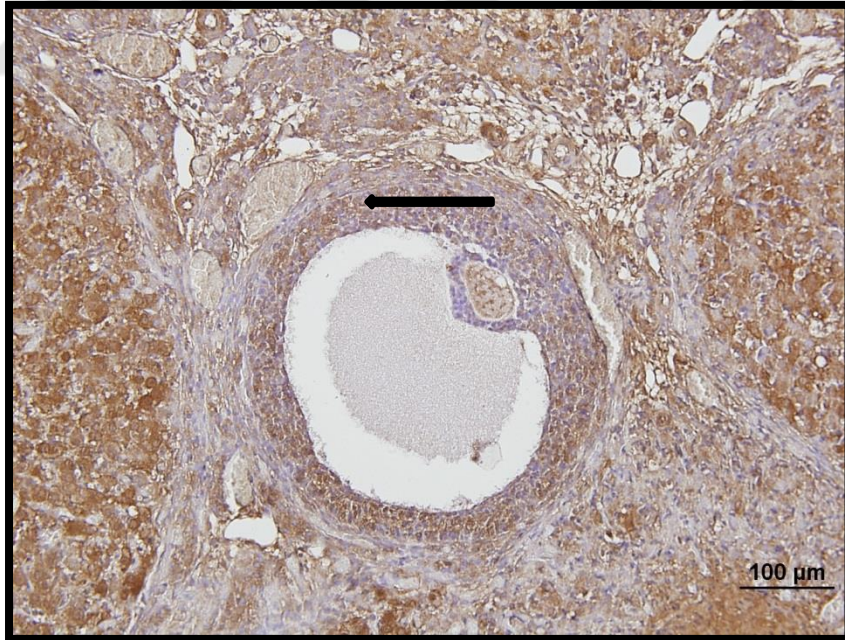
Şekil 68: Çözgen grubuna ait ovaryum kesiti. Primer ve sekonder folikülde yer alan primer oositteki p-mTOR immunopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X20 büyütme)



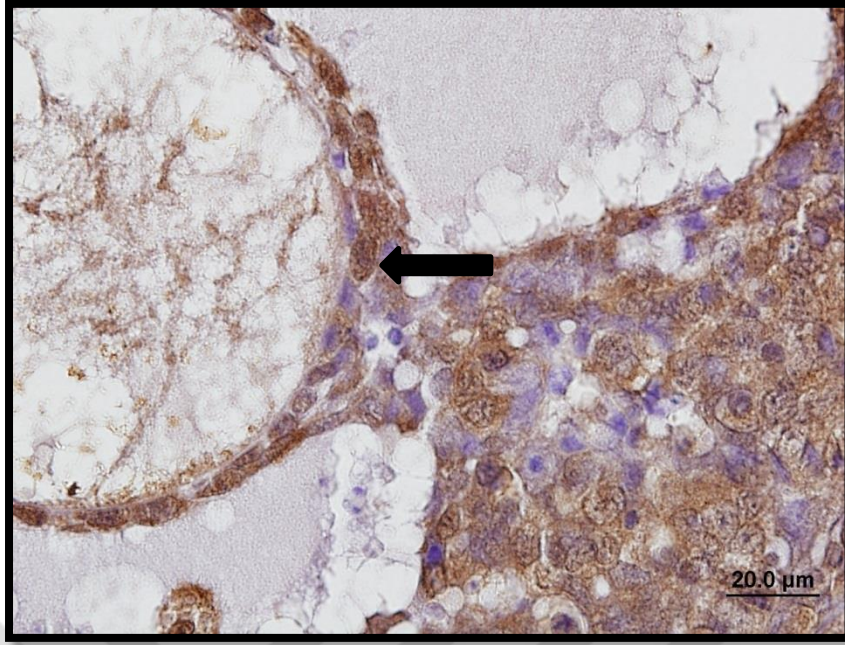
Şekil 69: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granuloza hücrelerinde p-mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X40 büyütme)



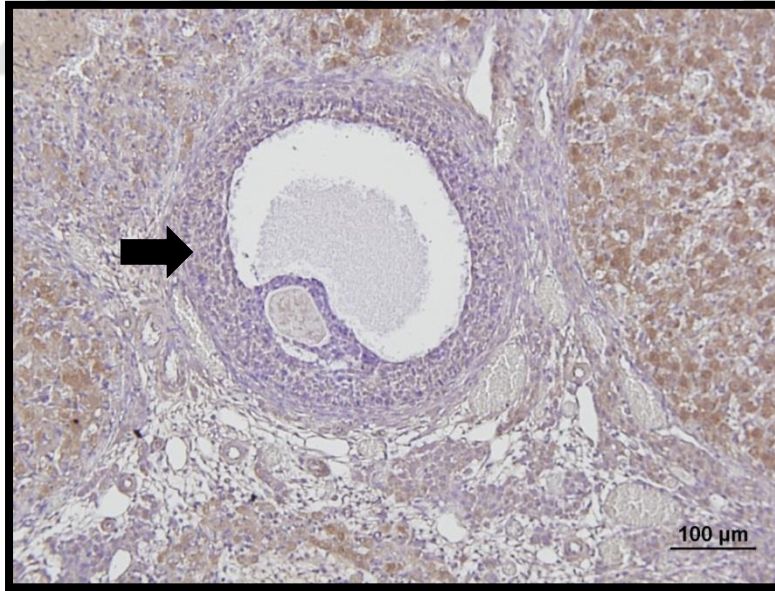
Şekil 70: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder folikülün içerisindeki oositte (←) ve etrafındaki granüloza hücrelerindeki p-mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X100 büyütme)



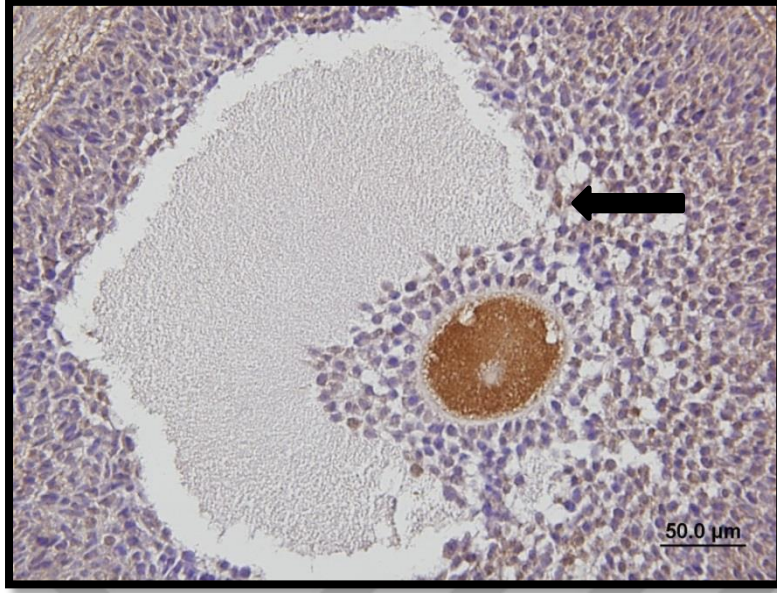
Şekil 71: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza tabakasındaki hücrelerde p-mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X20 büyütme)



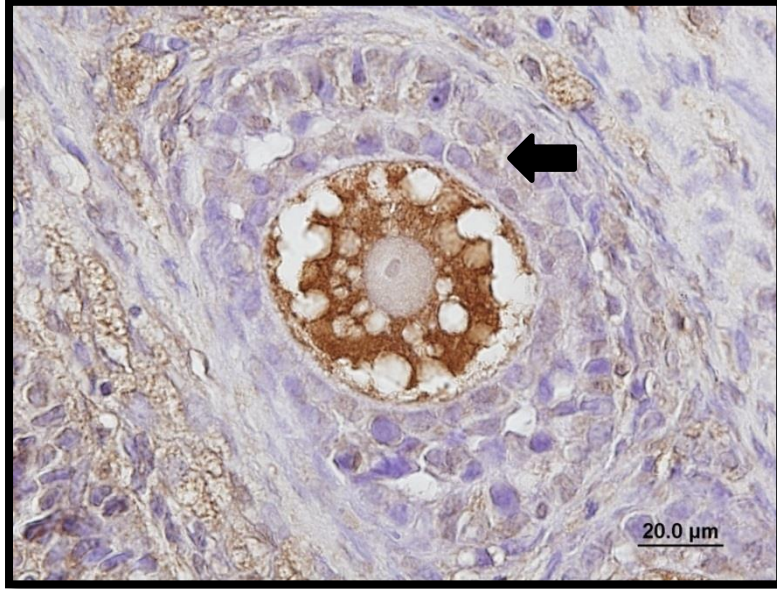
Şekil 72: PKOS grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza tabakasındaki hücrelerde p-mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X100 büyütme)



Şekil 73: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza tabakasındaki hücrelerde p-mTOR immünopozitivitesi (←) gösterilmiştir. (p-mTOR, X20 büyütme)



Şekil 74: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Sekonder foliküle ait granüloza tabakasındaki hücrelerde p-mTOR immünopozitivitesi ( gösterilmiştir. (p-mTOR, X40 büyütme)



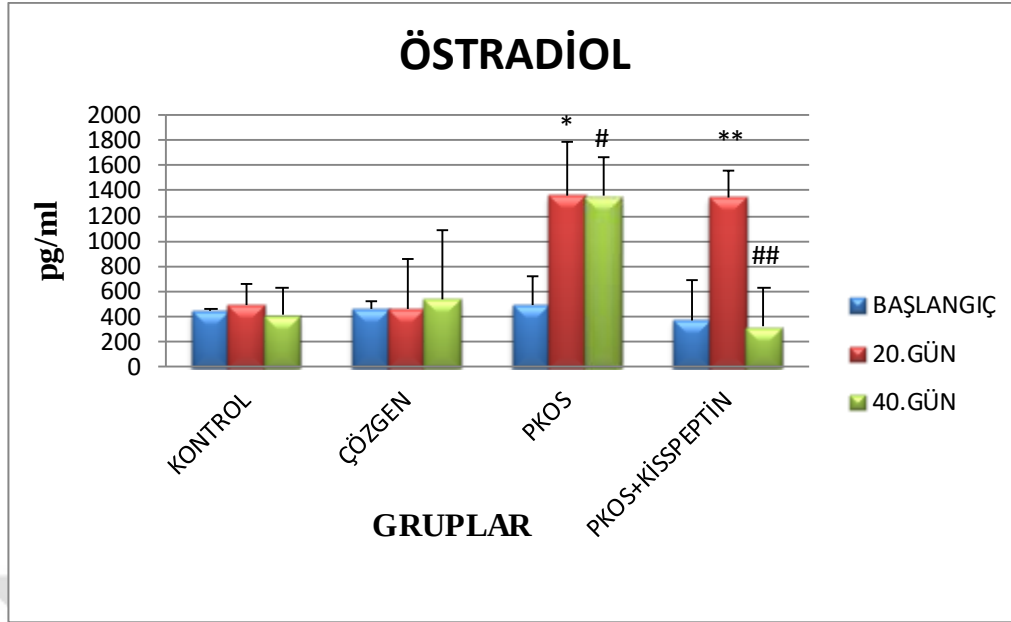
Şekil 75: PKOS+Kisspeptin grubuna ait ovaryum kesiti. Primer foliküle ait granüloza tabakasındaki hücrelerde p-mTOR immünopozitivitesi ( gösterilmiştir. (p-mTOR, X100 büyütme)

4.5. Biyokimyasal Değerlendirme

4.5.1. Östradiol Bulguları Değerlendirilmesi

Çalışmamızda sıçanda DHEA vererek oluşturduğumuz PKOS modelini test etmek ve Kisspeptin-10'un kan plazma östradiol ve progesterona etkisini incelemek amacıyla ELISA yöntemi kullanıldı.

Çalışmamızda deneye başlamadan önce bazal değer aralıklarını oluşturmak amacıyla aldığımız örneklerde gruplar arasındaki östradiol seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,235$). PKOS model grubu oluşturmak amacı ile 20 gün boyunca DHEA verdikten sonra kan östradiol seviyelerini incelediğimizde, PKOS grubunun östradiol seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,004$). Kontrol grubu ile PKOS+Kisspeptin grubunu karşılaştırdığımızda, PKOS+Kisspeptin grubunun östradiol seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen grubu ile PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun östradiol seviyesinde çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,005$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun östradiol seviyesinde çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). PKOS grubu ile PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p=0,945$). Çalışmamızda 20 gün boyunca DHEA verilerek oluşturulan PKOS model grubuna 20 gün boyunca Kisspeptin-10 verilerek, 40. günde de östradiol seviyesine bakılmıştır. Değerler göz önüne alındığında, PKOS grubunda östradiol seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir ($p=0,002$). Kontrol grubu ile PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,234$). Çözgen grubu ile PKOS grubunu karşılaştırdığımızda, PKOS grubunun östradiol seviyesinde çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,022$). Çözgen grubu ile PKOS+Kisspeptin grubunu karşılaştırdığımızda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,456$). PKOS grubu ile PKOS+Kisspeptin grubunu karşılaştırdığımızda, PKOS+Kisspeptin grubunun östradiol seviyesinde PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$).



Şekil 80: Gruplar arası östradiol seviyesi ortalaması

*: Östradiol seviyesinde 20. günde kontrol ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,004$, $p=0,005$).

** : Östradiol seviyesinde 20. günde kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p=0,001$).

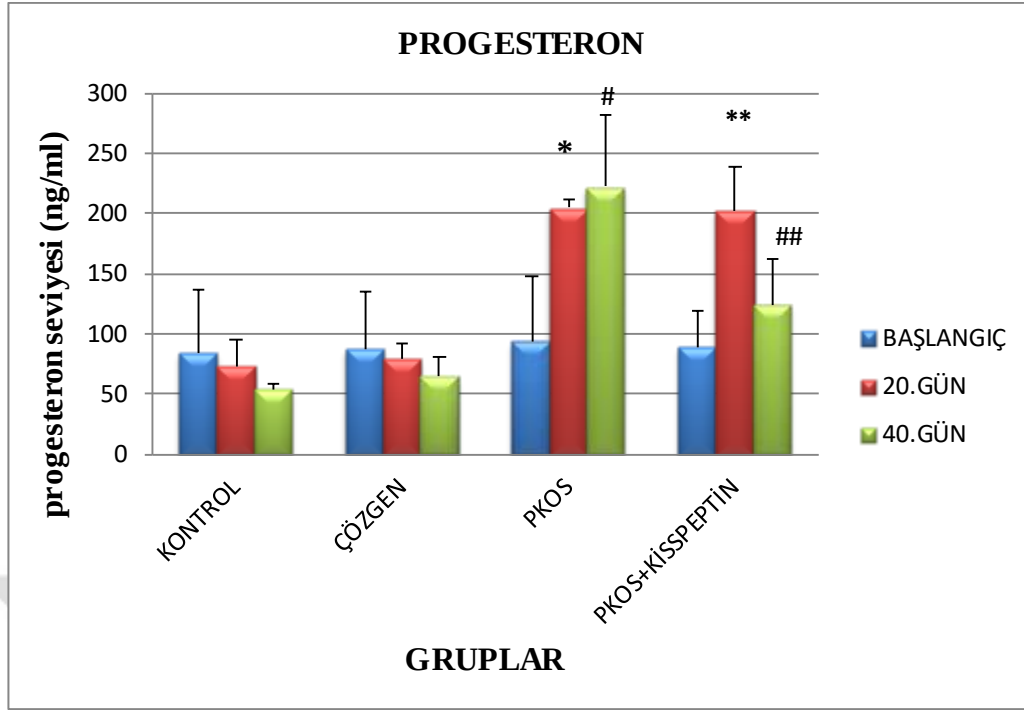
: Östradiol seviyesinde 40. günde kontrol ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,002$, $p=0,022$).

##: Östradiol seviyesinde 40. günde PKOS grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

4.5.2. Progesteron Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda deneye başlamadan önce bazal değer aralıklarını oluşturmak amacıyla aldığımız örneklerde gruplar arasındaki progesteron seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,506$). PKOS model grubu oluşturmak amacı ile 20 gün boyunca DHEA verdikten sonra kan progesteron seviyelerini incelediğimizde, PKOS grubunun progesteron seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Kontrol grubu ile PKOS+Kisspeptin grubunu karşılaştırdığımızda, PKOS+Kisspeptin grubunun progesteron seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artma olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Çözgen grubu ile PKOS grubu karşılaştırıldığında, PKOS grubunun progesteron seviyesinde çözgen grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen grubu ve PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun progesteron seviyesinde çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). PKOS grubu ile PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p=0,589$). Çalışmamızda 20 gün boyunca DHEA verilerek oluşturulan PKOS model grubuna 20 gün boyunca Kisspeptin-10 verilerek, 40. Günde sw progesteron seviyesine bakılmıştır. Değerler göz önüne alındığında, PKOS grubunda progesteron seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p=0,004$). Kontrol grubu ile PKOS+Kisspeptin grubu karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun progesteron seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Çözgen grubu ile PKOS grubunu karşılaştırdığımızda, PKOS grubunun östradiol seviyesinde çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,003$). Çözgen grubu ile PKOS+Kisspeptin grubunu karşılaştırdığımızda, PKOS+Kisspeptin grubunun progesteron seviyesinde çözgen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). PKOS grubu ile PKOS+Kisspeptin grubunu karşılaştırdığımızda, PKOS+Kisspeptin grubunun progesteron seviyesinde PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p=0,018$).



Şekil 81: Gruplar arası progesteron seviyesi ortalaması.

*: Progesteron seviyesinde 20. günde kontrol ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,002$, $p=0,001$).

** : Progesteron seviyesinde 20. günde kontrol ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,002$, $p=0,001$).

: Progesteron seviyesinde 40. günde kontrol ve çözgen grubuna göre anlamlı artış ($p=0,004$, $p=0,001$).

##: Progesteron seviyesinde 40. günde PKOS grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,018$).

5. TARTIŞMA

PKOS üreme çağındaki kadınlarda kronik anovulasyon ve ovaryum dokusu içerisinde bir çok foliküler kist ile karakterize olan ve beraberinde uzun dönem sağlık riskleri getirdiği bilinen kompleks bir hastalıktır (165). Günümüzde PKOS tanı kriterleri; oligomenore, hiperandrojenizm, ovulasyon düzensizliği ya da ovulasyonun gerçekleşmemesi şeklinde belirlenmiştir. Ultrasonografi bulgularında ise polikistik ovaryumlarda ovariyal stromada artış ve kapsül altındaki alanda foliküller kistlerin varlığı izlenir (166). Son yıllarda yapılan hayvan deney modelleri, bu sendromun tedavisine yardımcı ipuçları sağlayarak patolojisinin farklı yönleri üzerinde çalışılabilme imkanı sağlamaktadır.

PKOS'lu kadınlarda DHEA hormon düzeyinin kanda artışının bulunması ile PKOS'lu hayvan modelinin, insandakine benzer sendrom oluşturulmasına öncülük etmiştir (167). İlk kez Roy ve ark.ları DHEA kullanarak PKOS hayvan modeli oluşturmuştur (168). Abramovich ve ark.larının yaptığı çalışmada 21 günlük Sprague Dawley cinsi ratlara, 0.2 ml susam yağında çözülen ve subkutan olarak enjekte edilen 6 mg DHEA uygulandığında PKOS kemirgen modeli olduğu bildirilmiştir (169). Bu nedenle çalışmamızda peripubertal dönemdeki 23 günlük Wistar albino dişi sıçanlara 20 gün boyunca subkutan olarak DHEA verilerek PKOS deney hayvan modeli oluşturuldu.

Kiss-1 geni tarafından kodlanan ve üreme ile ilgili olan Kisspeptin, pubertenin başlamasını sağlayan bir nöropeptiddir. Kisspeptin hipotalamusta arkuat nükleus ve anteroventral periventriküler çekirdekte yer alan nöronlardan gonadotropinlerin etkisi altında sentezlenmektedir. Sentezlenmesinde veya üretimindeki değişiklikler gonadal fonksiyonlarda anormalliklere neden olabilmektedir (170). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Kisspeptinin hipotalamus-hipofiz-gonadal aksı düzenlediği bulunmuştur. Kisspeptinlerin intraserebral (i.c.), intraserebroventriküler (i.c.v.), intrahipotalamik (i.h.), sistemik intravenöz (i.v.), intraperitoneal (i.p.) ve subkutan (s.c.) gibi farklı yollarla verildiğinde LH salgılanmasında değişikliklere yol açmaktadır. Santral veya periferik yol ile verildiğinde akut etkileri daha çok araştırılmış ancak uzun süreli verildiğindeki etkileri hakkında bilgiler oldukça azdır (171). Bu amaçla çalışmamızda seçmiş olduğumuz Kisspeptin-10' un intraperitoneal yol ile verilerek 20 gün boyunca etkisine bakılmıştır.

Medina ve ark. erişkin sıçanlarda yedi gün boyunca 10 mg/kg vücut ağırlığında/gün intraperitoneal DHEA uygulaması ile vücut ağırlığında bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (172). Kang J ve ark. yaptıkları çalışmalarında erişkin sıçanlara sekiz hafta boyunca 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında oral yolla DHEA verilerek vücut ağırlıklarına baktıklarında 50 mg/kg dozunda verilen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında vücut ağırlığında azalma olduğunu bildirmişlerdir (173). Sander ve ark. BALB/c farelere yirmi gün süresince 6mg/100 g vücut ağırlığında DHEA intraperitoneal uyguladıklarında deney sonu ağırlıklarına bakıldığında kontrol grubu ile DHEA uygulanan grup arasında fark olmadığını bildirmişlerdir (174). Wang Z ve ark. 21 günlük Wistar cinsi sıçanlara 20 gün boyunca 6 mg/100g DHEA verilerek PKOS oluşturdukları model grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir (175). İnsanda ve kemirgenlerde Kisspeptin geninin (Kiss-1) adipoz dokuda vücut ağırlığını düzenlediği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (176). Çalışmamızda 20 gün boyunca 6mg/100g dozunda DHEA verilerek PKOS kemirgen modeli oluşturuldu. Deneklerin deney başlangıç ağırlıkları tartılarak gruplar arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Deney sonunda ise deneklerin ağırlıklarında kontrol grubu ile DHEA verilerek PKOS modeli oluşturduğumuz grup arasında anlamlı bir fark olmadığı ancak PKOS modeli oluşturup Kisspeptin-10 verdiğimiz grupta PKOS grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu saptandı. PKOS modeli oluşturup Kisspeptin-10 verdiğimiz grubun PKOS grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmasının, Kisspeptin-10'un enerji ve vücut metabolizmasını düzenlemesinden kaynaklandığı görüşündeyiz.

Kisspeptinler cinsiyetin farklılaşmasında, pubertenin başlamasında, ovulasyonda ve fertilitenin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan nöropeptitler olup ovaryumda gelişmekte olan foliküllerin teka hücrelerinde, korpus luteumda eksprese edildiği bilinmektedir. Castellano JM ve ark. yaptıkları çalışmalarında rat ovaryumunda tüm östrus siklusu boyunca KISS-1 ve KISS1r mRNA varlığını tespit etmişlerdir (177). Literatürde Kisspeptin-10'un PKOS'lu ovaryumu nasıl etkilediğine dair bilgi bulunmamaktadır.

Dowling ve ark. 21 günlük Balb/C farelere 20 gün boyunca 6 mg/100g DHEA uyguladıklarında ovaryum kesitlerinde korteks bölgesinde kistik foliküllerin oluştuğunu, medulla da ise büyük çapta damar kesitlerinin olduğunu bildirmişlerdir (178). Cadwell ASL. ve ark 90 gün boyunca 7.5mg DHEA içeren pellet yem kullandıklarında ovaryum korteksinde

atretik folikül ve kistik foliküllerin sayılarında artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Kistik folikülleri azalan granüloza hücre tabakası kalınlığı ve artan teka hücre tabakası kalınlığı şeklinde içi boş kistik yapılar olarak bildirmişlerdir. Folikül sayısı bakımından kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında korpus luteum sayısında azalma olduğunu, antral folikül sayısında ise artış olduğunu bildirmişlerdir (179). Bulut ve ark. erişkin Wistar cinsi sıçanlara intraperitoneal olarak 4mg/kg estradiol valerate (EV) vererek oluşturdukları PKOS modelinde kistik ve atretik foliküllerin sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir. Kistik folikülleri büyük, içi boş ve azalan granüloza hücre tabakası şeklinde tanımlamışlardır (180). Honnma ve ark. 21 günlük Wistar cinsi sıçanlara 7 gün ve 15 gün boyunca 6mg/kg DHEA uyguladıklarında ovaryum korteksinde kistik foliküllerin oluştuğunu, 15 günlük DHEA grubunda ise atretik folikül sayısında artış olduğunu ancak primordiyal ve primer folikül sayısında değişim olmadığını bildirmişlerdir (181). Lee MT. ve ark 27 günlük immatür sıçanlara 6mg/100g DHEA uyguladıklarında atretik foliküller ve foliküller kistlerin sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir. Kistik foliküllerin 0.45-2.2 mm çapında olduğunu, teka interna tabakasında damarlanma olmadığını, granüloza tabakasının incelendiğini ve korpus luteumda luteal kistlerin olduğunu gözlemlemişlerdir (182). Abramovich D. ve ark 21 günlük Sprague Dawley sıçanlara 15 gün boyunca DHEA uyguladıkları PKOS model grubunda kontrol grubuna göre primer folikül ve kistik folikül sayısında artış olduğunu, korpus luteum sayısında ise azalma olduğunu bildirmişlerdir (169). Paixao L. ve ark çalışmalarında gonadotropik hormon ve DHEA uyguladıkları gruplarında primer, sekonder ve graaf folikül sayısında artış olduğunu, primordiyal folikül çapında artma ancak primer ve sekonder folikül çaplarının kontrol grubuna benzer olduğunu göstermişlerdir (183). Gözükara I ve ark erişkin Wistar ratlara letrozol uygulayarak PKOS oluşturdukları modelde kontrol grubuna göre atretik, kistik ve antral foliküllerin sayısında artış olduğunu ve korpus luteum sayısında ise azalma olduğunu bildirmişlerdir (184). Ghafurniyan H. ve ark yaptıkları çalışmalarında 2mg/kg estradiol valerate vererek oluşturdukları PKOS modelinde ovaryumda yer alan foliküllerden primordiyal folikül ve kistik foliküllerin sayısının arttığı ancak primer, sekonder ve antral foliküllerin sayısında azalma olduğu belirtilmiştir. Granüloza tabakası bakımından kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında PKOS grubunda tabakanın kalınlığının azaldığını ancak teka hücre tabakasının kalınlığının arttığını bildirmişlerdir (185). Takagi K ve ark yaptıkları çalışmada immatür Wistar cinsi sıçanlarda apoptozun artışı ile folikül çapının azaldığını gösterilmişlerdir (186). Anderson ve ark in vitro ortama DHEA eklendiğinde granüloza

hücrelerinde proliferasyonun ve differansiasyonun arttığını bildirmişlerdir (187). Araştırmamızda oluşturduğumuz PKOS modelinin ovaryum seri kesitlerini incelediğimizde kontrol grubuna göre atretik ve kistik foliküllerin sayısının arttığını gözlemledik. PKOS grubunda primer ve primordiyal folikül sayısında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığını, sekonder folikül sayısının arttığını, graaf ve korpus luteum sayısının azaldığını analiz ettik. Kistik foliküllerin yapısının azalan granüloza hücre tabakası ve artan teka hücre tabakası şeklinde olan içi boş kistik yapılar olduğunu tespit ettik. PKOS+Kisspeptin verdiğimiz grupta PKOS grubuna göre atretik ve kist foliküllerinin sayısında azalma olduğunu ve korpus luteum sayısında artma olduğunu gözlemledik. Bu durumun kisspeptinin hormonal etkileşimi ile gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz. PKOS grubunda primer folikül çapında azalma, sekonder folikül çapında ise genişleme olduğunu tespit ettik. Kisspeptin-10 verdiğimiz grubun ovaryum dokusunu histolojik olarak incelediğimizde kontrol grubuna göre primer folikülün granüloza tabakası kalınlığında ve sekonder folikül çapında azalma olduğunu analiz ettik. Yapılan çalışmalar ile paralel olarak PKOS'lu grubun medullasında kontrol grubuna göre damar yapılarında genişleme olduğunu tespit ettik.

Zhang Z ve ark. 21 günlük Sprague Dawley cinsi ratlara 6mg/kg DHEA uyguladıkları PKOS model grubunun ovaryum örneklerini Sirius Red boyama yöntemi ile incelediklerinde kontrol grubuna göre teka tabakasının çevresinde kollajen miktarının arttığını bildirmişlerdir (188). Araştırmamızda Masson Trikrom boyama yöntemi ile gruplar arası kollajen miktarını değerlendirdiğimizde herhangi bir artış olmadığını analiz ettik.

mTOR, hücre büyümesi ve proliferasyonunda rol oynayan, hücrenin enerji durumunu kontrol eden bir serin/trionin kinazdır. Hücrede enerji metabolizmasında görev alarak hücre içi enerji dengesinin korunmasını sağlar. Stres ya da beslenmeye bağlı gelişen bozukluklarda, ovaryumda folikül gelişimine direkt etki edebilmektedir. Stres veya yetersiz beslenme gibi durumlarda azalan mTOR aktivitesi hücrenin proliferasyonunda azalmayı ve otofajinin indüklenmesini sağlamasından dolayı, mTOR anti-kanser tedavisinde ve birçok hastalıkta hedef niteliği taşımaktadır. mTOR'un fosforilasyonu sonucunda rapamisine duyarlı fosforlanmış serin 2448 yani p-mTOR aktif molekülü oluşur (189). Kisspeptinler hipofizden FSH ve LH salgılanmasını, GRP54 reseptörü üzerinden gerçekleştiren çok güçlü nöropeptittir. Büyüme ve yaşama sinyallerinden sorumlu olan PI3K ailesi ile etkileşimde olan kisspeptinler mTOR sinyal yolağını etkilerek LH salınımı düzenlediği bilinmektedir. mTOR sinyal

yolağının dişi farelerde pubertenin başlangıcının kontrol edilmesinde ve LH salınımında rol oynadığı bilinmektedir. mTOR bu kontrol mekanizmasını hipotalamusta lokalize olan Kiss-1 ekspresyonu yolu ile yapmaktadır. mTOR sinyali rapamisin kullanılarak engellendiğinde; pubertedeki gonadotropik kontrolün inhibe edildiği, vajinal açılmanın geciktiği, LH ve östradiol hormon seviyesinin azaldığı ve ovaryum ile uterus dokularında atrofiye neden olduğu belirtilmiştir (163). Yaba A ve ark çalışmalarında fare ovaryumunda mTOR ve p-mTOR lokalizasyonunu immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir. mTOR'un sağlıklı foliküllerde granüloza hücre tabakasında, ovaryumun stroması ve epitelinde yer aldığını, p-mTOR'un ise bölünmekte olan granüloza hücrelerinin M fazında lokalize olduğunu bildirmişlerdir (190). James Yu ve ark çalışmalarında rapamisin ile mTOR mekanizmasını inhibe ettiklerinde ovaryum foliküllerinin gelişiminin durduğunu ve granüloza hücrelerinde proliferasyonun azaldığını bildirmişlerdir (191). PKOS'lu olgularda gerek stres ve beslenme bozukluğu gerekse hormonal dengenin bozulmasından kaynaklı olarak mTOR mekanizması gelişmekte olan foliküllere etki etmektedir. Yaba ve ark. DHEA ile PKOS oluşturdukları fare modelinde mTOR'un tüm gruplarda granüloza hücresinde ve oositte immünopozitif olduğunu ancak p-mTOR'un ise PKOS'lu grupta bölünmekte olan granüloza hücrelerinde immünopozitif olduğunu bildirmişlerdir. PKOS'lu fare modelindeki artan p-mTOR aktivitesinin LH bağımlı hareket ederek etkilediğini belirtmişlerdir (192). Biz de çalışmamızda tüm grupların ovaryum doku kesitlerinde gelişmekte olan foliküllerin granüloza ve teka hücre tabakasında, primer oositinde mTOR immünopozitivitesini gözledik. Kisspeptin-10 verdiğimiz grupta kontrol grubu ve PKOS grubuna göre mTOR immünopozitif hücre sayısında azalma olduğunu tespit ettik. Ancak DHEA verilerek PKOS modeli oluşturduğumuz grupta p-mTOR antikorunun immünopozitivitesinin kontrol grubuna göre arttığını, Kisspeptin-10 verdiğimiz grupta ise kontrol grubuna yakın pozitif hücre sayısının olduğunu gözlemledik. PKOS model grubumuzda p-mTOR immünopozitivitesinin artması bize granüloza hücrelerinde proliferasyonu arttırdığını düşündürdü. Kisspeptin-10'nun PKOS'lu olgularda p-mTOR'un etkinliğini azaltarak hücre proliferasyonunda etkili olabileceği düşüncesini oluşturdu.

PKOS dolaşımında yüksek LH, düşük FSH, foliküler atrezi, insüline karşı direnç oluşturması ve kısırlık nedeniyle oldukça heterojen bir hastalıktır (193). Ovulasyonun gerçekleşmediği PCOS'lu kadınlarda granüloza hücrelerinin artan aromataz aktivitesi

sonucunda, FSH ve LH' a cevap olarak östrojen ve progesteron hormon seviyelerinde artış izlenmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, ovaryumda kistlerin oluşarak ovulasyon fonksiyonunun bozulduğunu göstermek için, serum östradiol (E2) ve progesteron (P) seviyeleri değerlendirildi. Lee MT ve ark 20 gün boyunca DHEA verilerek oluşturdukları PKOS rat modelinde serum östradiol ve progesteron seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir (182). Yu J ve ark 21 günlük sıçanlara DHEA verilerek oluşturdukları PKOS model grubunda kontrol grubuna göre serum östradiol ve progesteron düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (194). Biz de çalışmamızda 20 gün boyunca 6mg/kg dozunda DHEA verilerek PKOS rat modeli oluşturduk. Oluşturduğumuz grupların kan örneklerini ELISA yöntemi ile değerlendirdiğimizde PKOS grubunun plazma östradiol ve progesteron seviyesinin kontrol grubuna göre yaklaşık 2,5 kat artmış olduğunu gözlemledik. PKOS model grubuna 20 gün boyunca kronik Kisspeptin-10 uyguladığımızda ise östradiol ve progesteron seviyelerinin PKOS grubuna göre azaldığını analiz ettik. Bu durum bize Kisspeptin-10'nun PKOS'da iyileştirici etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan literatür araştırmamız sonucunda PKOS model grubu oluşturulmuş sıçanlarda Kisspeptin-10 uygulamasının mTOR sinyal yolağına etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda Kisspeptin-10'un mTOR sinyal yolağına etkisini immünohistokimyasal olarak değerlendirdik.

Çalışmamızda DHEA verilerek oluşturulan PKOS model grubu ile PKOS oluşturup Kisspeptin-10 verdiğimiz grup karşılaştırıldığında, PKOS+Kisspeptin grubunun ovaryumunda kistik ve atretik foliküllerin azaldığı, östradiol ve progesteron kan plazma değerlerinin kontrol grubuna benzer sonuç verdiği gözlenmiştir. Literatürde dehidroepiandrosteron (DHEA) verilerek oluşturulan PKOS model grubunda Kisspeptin-10 uygulamasının histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak gösteren ilk çalışmadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, Kisspeptin-10'un PKOS'lu kadınların ovaryumlarındaki önemli bir semptom olan kist foliküllerin sayısını azalttığını histokimyasal yöntem ile inceledik. Hücrede enerji metabolizması ve proliferasyondan sorumlu olan mTOR sinyal yolağına etki ederek, granüloza hücrelerinde etkinliğinin azaldığını immünohistokimyasal bulgular ile gözlemledik. Deneysel PKOS modelimizde gözlemlediğimiz östradiyol ve progesteron hormon seviyelerindeki artışın, Kisspeptin-10 uygulamasından sonra kontrol grubuna yakın sonuç verdiğini ELISA yöntemi kullanarak gösterdik.

Literatürde deneysel PKOS modelinde Kisspeptin-10 uygulamasının mTOR sinyal yolağına etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. PKOS modelinde Kisspeptin-10 uygulamasının mTOR sinyal yolağına etkisi ilk defa bizim çalışmamızda histokimyasal olarak Hematoksilen-Eozin, MassonTrikrom ve Periyodik Asit Shiff boyamaları ile, immünohistokimyasal olarak mTOR ve p-mTOR boyamaları yapılarak gösterildi. Ayrıca biyokimyasal olarak kan plazma östradiol ve progesteron hormon seviyeleri değerlendirildi. Bu bulgular bize Kisspeptin-10'un ovaryum folikülleri ve kan plazma hormon seviyelerine etki ederek, infertilite ve anovulasyon ile karakterize olan PKOS'lu olgulardaki sorunlara çözüm olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgular ışığında çalışmamızın PKOS'da, Kisspeptin-10 uygulamasının mTOR sinyal yolağına etkisinin incelendiği yeni çalışmalar için ışık tutacağı görüşündeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Rotterdam ESHRE/ASRM- Sponsored PCOS Concensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81(1): 19-25.
2. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach: polycystic ovary syndrome. Blackwell Scientific, Boston, 1992;19: 377-84.
3. Stankiewicz M, Norman R. Diagnosis and management of polycystic ovary syndrome: a practical guide. *Drugs* 2006;66(7): 903-12.
4. Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 2006;25(48): 6436-46.
5. Diaz-Padilla I, Duran I, Clarke BA, Oza AM. Biologic rationale and clinical activity of mTOR inhibitors in gynecological cancer. *Cancer Treat Rev* 2012;38(6): 767-75.
6. Alam H, Maizels ET, Park Y, Ghaey S ve ark. Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3- kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol Chem* 2004;279(19): 19431-40.
7. Yaba A, Demir N. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Ovarian Res* 2012;5(1): 38.
8. Stuart GC, Dawson LM. Update on granulosa cell tumours of ovary. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;15: 33-37.
9. Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2006; 147(3): 1154-8.
10. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D ve ark. The metastasis suppressor gene KISS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001;276(37): 34631-6.
11. Mikkelsen JD, Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V ve ark. Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regul Pept* 2009;152(1-3): 95-100.
12. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 2006;131(4): 623-30.

13. Mescher AL. Junqueira's basic histology: Text & Atlas. Thirteenth Edition. McGraw Hill, 2013; 449-459.
14. Şeftalioğlu A. Genel insan embriyolojisi. İkinci Baskı. Ankara, Hacettepe-Taş Yayıncılık, 1996; 41-53.
15. Ross MH, Pawlina W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. Sixth Edition. China, Lippincott Williams & Wilkins, 2011; 830-845.
16. Moore KL, Persaud TVN. Klinik yönleriyle insan embriyolojisi (Türkçe Çeviri). 8. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009; 325-345.
17. Carlson BM. Human embryology and development biology. Fifth Edition. Philadelphia, Elsevier, 2014.
18. Kierszenbaum AL. Histology and cell biology: an introduction to pathology. USA, Mosby, 2006; 565-576.
19. Tekelioğlu M. Özel histoloji-ince yapı ve gelişme. Ankara, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ANTIP A. Ş. Yayınları, 2002.
20. Sadler TW. Langman's medical embryology. Twelfth Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2012; 10-27.
21. Nef S, Vassalli JD. Complementary pathways in mammalian female sex determination. J Biol 2009;8: 74.
22. Arıncı E, Elhan A. Anatomi I. cilt. Ankara, Güneş Kitabevi, 2001;337-345.
23. Strandring S. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. 40th Edition. Spain, Churchill Livingstone Elsevier, 2008; 2367-2368.
24. Gartner LP, Hiatt JL. Color atlas and text of histology. Sixth Edition. China, Lippincott Williams & Wilkins, 2014; 405-407.
25. Paker Ş. Histoloji. Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986; 223-233.

26. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's human embryology. Fourth Edition. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2009; 17-39.
27. Vazquez-Nin GH, Escobar ML, Felici MD, Echeverria OM, Klinger FG, Cell death in mammalian ovary. Springer, 2011; 185-198.
28. Guyton AC, Hall JE. Text book of medical hysiology. İnternational Edition, W. B. Saunders, 2006; 906-1026.
29. Gonong WF. Tıbbi fizyoloji. 20. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; 419-433.
30. Kerr JB, Duckett R, Myers M, Britt KL, ladenovska T, Findlay JK. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence ornaintenance of primordial follicle supply. Reproduction 2006;132: 95–109.
31. Braw RH, Tsafiriri A. Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. J Reprod Fertil 1980;59(2): 259-65.
32. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. European J Endocrinol 1998;138: 482-91.
33. Tomatır A.G. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. T Klin J Med Sci 2003;23: 499-508.
34. Nakano K, Naito I, Momota R, Sado Y, Hasegawa H, Ninomiya Y. ve ark. The distribution of type IV collagen alfa chains in the Mouse ovary and its correlation with follicular development. Arch Histol Cytol 2007;70(4): 243-53.
35. Vital-Reyes V, Chhieng D, Rodriguez-Burford C, Tellez-Velasco S, Grizzle W, Chavarria-Olarte M.E. ve ark. Ovarian Biopsy in infertile patients with ovarian dysfunction. Int J Gynecol Pathol 2005;25: 90-4.
36. Osman P. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. J Reprod Fertil 1985;73(1): 261-70.
37. Takagi K, Yamada T, Miki Y, Umegaki T, Nishimura M, Sasaki J. Histological observation of the development of follicles and follicular atresia in immature rat ovaries. Acta Med Okayama 2007;61(5): 283-98.

38. Clarke J, Brook F. Effect of gonadotrophins on the ovarian interstitial tissue of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Reproduction* 2001;12: 23-9.
39. Bukovsky A, Ayala M.E, Dominguez R, Keenan J.E, Wimalasena J, Elder R.F. ve ark. Changes of ovarian interstitial cell hormone receptors and behavior of resident mesenchymal cells in developing and adult rats with steroid-induced sterility. *Steroids* 2002;67: 277-89.
40. Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, and et al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002;143(12): 4775-87.
41. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, and et al. Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? *Biol Reprod* 1998;58: 52-9.
42. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000;21(2): 200-14.
43. Yen SSC. The polycystic ovary sendrome. *Clin Endocrinol*, 1980;12: 177-181.
44. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral poycystic ovaries. *AJOG* 1935;29: 181.
45. Carmina E, Lobo RA. PCOS: arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999;84(6): 18897-9.
46. Legro RS, Myers E. Surragate end-points or primary outcomes in clinical trials in women with polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod* 2004;19(8): 1967-1704.
47. Palomba S, Falbo A, Giallauria F, Russo T, and et al. Effects of metformin with or without endothelium of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 2010;33(2): 246-51.
48. Goodarzi MO, Quinones MJ, Azziz R, Rotter JI and et al. Polycystic ovary syndrome in Mexican-Americans; prevelance and association with the severity of insülin resistance. *Fertil Steril* 2005;84(3): 766-9.

49. Goodarzi MO, Azziz R. Diagnosis, epidemiology and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20(2): 193-205.
50. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamonti-Kandarakis E and et al. Task force on the phenotype of the polycystic ovary syndrome of the Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009;91(2): 456-88.
51. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, ed. *Polycystic Ovary Syndrome*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1992: 377-384.
52. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81: 19-25.
53. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health riskd related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19: 41-7.
54. Azziz R, Carmina E, Dewailly D and et al. Positions statement: criteria for defining poycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91: 4237-45.
55. Legro RS, Drisscoll D, Strauss JF 3rd, Fox J, Dunaif A. evidence for a genetic basis or hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Nail Acad Sci* 1998;95(25): 14956-60.
56. Erdoğan M, Karadeniz M, Berdeli A, Tamsel S, Yılmaz C. The relationship of the interleukin-6-174 G>C gene polymorphism with cardiovascular risk factors in Turkish polycystic ovary syndrome patients. *Int J Immunogenet* 2009;36(5): 283-8.
57. Khan KA, Stas S, Kurukulasuriya LR. Polycystic ovarian syndrome. *J Cardiometabolic Syndr* 2006;1(2): 125-130.

58. Imbar T, Klipper E, Greenfield C, Hurwitz A and et al. Altered endothelin expression in granulosa-lutein cells of women with polycystic ovary syndrome. *Life Sci* 2012;91(13-14): 703-9.
59. Reckelhoff JF. Polycystic ovary syndrome: androgens and hypertension. *Hypertension* 2007;49(6): 1220-1.
60. Franks S. Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989;31: 87-120.
61. Yen SS. The polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1980;12: 177-207.
62. Kaiser UB, Sabbagh E, Katzenellenbogen RA, Conn PM, Chin WW. A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92: 12280-4.
63. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79: 1158-65.
64. Nahum R, Thong KJ, Hiller SG. Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro. *Hum Reprod* 1995;10: 75-81.
65. Moran C, Knochelhauer E, Boots LR, Azziz R. Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: relation to age and body mass. *Fertil Steril* 1999;71: 671-4.
66. Yildiz BO, Woods KS, Stanczyk F, Bartolucci A, Azziz R. Stability of adrenocortical steroidogenesis over time in healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 5558-62.
67. Yildiz BO, Gedik O. Assessment of glucose intolerance and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2004;8: 649-56.
68. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18: 774-800.

69. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyper-androgenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50: 113-6.
70. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28: 412-9.
71. Legro RS, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Dunaif A. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res* 1998;53: 217-56.
72. Cooper HE, Spellacy WN, Prem KA, Cohen WD. Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100: 371-387.
73. Givens JR. Ovarian hyperthecosis. *N Engl J Med* 1971;285: 691.
74. Carey AH, Chan KL, Short F, White D, Williamson R, Franks S. Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;38: 653-658.
75. Hague WM, Adams J, Reeders ST, Peto TE, Jacobs HS. Familial polycystic ovaries: a genetic disease? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988;29: 593-605.
76. Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S and et al. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145: 123-128.
77. Dunaif A, Jeffrey R, Franks S, Legro RS. Polycystic ovary syndrome: current controversies, from the ovary to the pancreas.
78. Goldzieher JW, Green JA. The polycystic ovary I. clinical and histological features. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;22: 324-38.
79. Qiao J, Feng HL. Extra-and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Repro Update* 2011,17(1): 17-33.
80. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Repro Update* 2008,14(4): 367-378.

81. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;38: 1165-74.
82. Legro RS, Finegood D, Dunaif A. A fasting glucose to insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83: 2694-8.
83. Von der Spuy ZM, Dyer SJ. The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18(5): 755-776.
84. Rotterdam ESHRE/ASRM sponsored PCOS Consensus workshop group. Revised 2003 Consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81: 19-25.
85. Polson DW, Adams J, Wadsworth J, Franks S. Polycystic ovaries-a common finding in normol women. *Lancet* 1988.
86. Dumesic DA, Abbott DH. Implications of polycystic ovary syndrome (PCOS) on oocyte developmen. *Semin Reprod Med* 2008;26(1): 53-68.
87. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Endocrinology* 2011;7: 219-231.
88. Qiao J, Feng HL. Extra-and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo develeopmental competence. *Hum Reprod Update* 2011;17(1): 17-33.
89. Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intraovarian hyperandrogenismi may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update* 2004;10(2): 107-117.
90. Franks S, Hardly K. Folliculogenesis in polycystic ovaries. In: Dunaif A, Chang RJ, Franks S, Legro RS. *Polycystic ovary syndrome: current controversies, from the ovary to the pancreas*. USA:Humana Press; 2008. p. 1-18.

91. Maciel GAR, Baracat CE, Bendo JA, Markham SM and et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin endocrinol Metab* 2004;89(11): 5321-7.
92. Mahesh VB, Greeblatt RB. Isolation of dehydroepiandrosterone and 17 β -hydroxy Δ 5-pregnenolone from the polycystic ovaries of the Stein Leventhal syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1962;22: 441-448.
93. Mahesh VB, Dhindra DS, Anderson E, Kalra SP. Animal models for study of polycystic ovaries and ovarian atresia. *Plenum* 1987: 237-258.
94. Lee MT, Anderson EA, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anatomical Record* 1991;231: 185-197.
95. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott PM, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. *Moleküler hücre biyolojisi* (6. Baskıdan çeviri), Ankara, Palme Yayıncılık 2011; 353-356.
96. Polunovsky VA, Houghton PJ. *mTOR pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy*. New York, Springer Science 2010.
97. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 2004;8: 1926-1945.
98. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007;12(1): 9-22.
99. Withers DJ, Ouwens DM, Nave BT, Zon GCM and et all. Expression, enzyme activity, and subcellular localization of mammalian target of rapamycin in insulin-responsive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241: 704-709.
100. Sen Gupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR Complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 2010;40(12): 310-22.
101. Yang H, Rudge DG, Koss JD, Vaidialingam B and et all. mTOR Kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 2013;497(7448): 217-23.

102. Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. *Nature* 2007;17: 666-681.
103. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K and et all. Raptor, a binding partner of target of Rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110: 177-189.
104. Foster KG, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 2010;285(19): 14071-7.
105. Cargnello M, Tcherkezian J, Roux PP. The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. *Mutagenesis* 2015;30(2): 169-76.
106. Zoncu R, Sabatini DM, Efeyan A. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(1): 21-35.
107. Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005;11(8): 353-61.
108. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 2006;20(10): 2820-32.
109. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N and et all. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006;127: 125-137.
110. Kamada Y, Fujioaka Y, Suzuki NN, Inagaki F and et all. Tor2 directly phosphorylates the AGC Kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* 2005;25(16): 7239-7248.
111. Schmidt A, Bickle M, Beck T, Hall MN. The Yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 1997;88: 531-542.
112. Crespo JL, Hall MN. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66(4): 579-591.

113. Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signalling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(4): 371-7.
114. Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M and et all. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/CIE-BP signalling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 2003;11(6): 1457-66.
115. Aspuria PJ, Tamanoi F. The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal* 2004;16(10): 1105-12.
116. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Auruch J. Rheb binds and regulates the mTOR Kinase. *Curr Biol* 2005;15(8): 702-13.
117. Groenewoud M. Rheb in mTORC1 signalling and metabolism. Netherlands, Uitgeverij BoxPress, 2013.
118. Nelsen CJ, Rickheim DG, Tucker MM, Hansen LK, Albrecht JH. Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278(6): 3656-63.
119. Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible Factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signalling motif. *J Biol Chem* 2007;282(28): 20534-20543.
120. Kim KT, Hwang TIS, Hsieh HY, Shen CH and et all. Expression of survivin in bladder cancer cell lines using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Urol Sci* 2014;25: 19-21.
121. Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H and et all. Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. *J Biol Chem* 1999;274(46): 33085-33091.
122. Curatolo P, Moavero R. mTOR inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex. *Curr Neuroparmacol* 2012;10(4): 404-415.
123. Cheaib B, Auguste A, Leary A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer* 2015;34(1): 4-16.

124. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S and et al. Mammalian TOR Complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature* 2004;6(11): 1122-1128.
125. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR Complex I and its implications for Rapamycin inhibition. *Cell* 2010;38: 768-774.
126. Khokhlatchevi A, Xu S, English J, Wu P and et al. Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. *J Biol Chem* 1997;272(17): 11057-11062.
127. Sun J, Nan G. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway as a discovery target in stroke. *J Mol Neurosci* 2016;59: 90-98.
128. Low HB, Zhang Y. regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer. *Immune Net* 2016;16(2): 85-98.
129. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Nature* 2004;23: 2838-2849.
130. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L and et al. MAP Kinases. *Chem Rev* 2001;101: 2449-2476.
131. Carracedo A, Ma L, Teruya-Felstein J, Roja F and et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;118(9): 3065-3074.
132. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell* 2002;10: 151-162.
133. Tee AR, Blennis J. mTOR, translational control and humans diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(1): 29-37.
134. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci* 2014; 127: 923-926.

135. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411: 355-365.
136. Stall SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84: 5034-5037.
137. Pawson T. Introduction: protein kinases. *FASEB J* 1994;8: 1112-1113.
138. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cells* 2005;8(3): 179-183.
139. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Philips KK and et all. KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996;23: 1731-1737.
140. Lee JH, Welch DR. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* 1997;71: 1035-1044.
141. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KISS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1998;54: 145-148.
142. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D and et all. The Metastasis Suppressor Gene KISS-1 encodes Kisspeptins, the natural ligands of the Orphan G Protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001;276(37): 34631-34636.
143. Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The Kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update* 2014;20(4): 485-500.
144. Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *Nature* 2007;151: 1143-1153.
145. Lehman MN, Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL. Anatomy of the Kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res* 2010;1364: 90-102.

146. Tassigny XA, Colledge WH. The role of kisspeptin signalling in reproduction. *Physiology* 2010;25: 207-217.
147. Murphy KG. Kisspeptins: regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2005;17(8): 519-25.
148. Muir AL, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D and et al. AXOR12, a novel human G Protein-coupled receptor, activated by the peptide KISS-1. *J Biol Chem* 2001;276(31): 28969-28975.
149. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R and et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters* 1999;46: 103-107.
150. Castona JP, Martinez-Fuentes AJ, Gutierrez-Pascual E, Vaudry H and et al. Intracellular signaling pathways activated by Kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* 2009;30: 10-15.
151. Staffors LJ, Xia C, Ma W, Cai Y and et al. Identification and characterization of Mouse metastasis-suppressor KISS1 and its G-Protein-coupled receptor. *Cancer Res* 2002;62: 5399-5404.
152. Pasquier J, Kamech N, Lafont AG, Vaudry H and et al. Molecular evolution of GPCRS: Kisspeptin/kisspeptin receptors. *J Mol Endocrinol* 2014;52(3): 101-17.
153. Gottsch M, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM and et al. A role of kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004;145(9): 4073-7.
154. Roseweir AK, Milla RP. The role of kisspeptin in the control of gonadotropin secretion. *Hum Reprod Update* 2009;15(2): 203-12.
155. Seminara SB. Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: critical pathway modulating GnRH secretion. *Front Neuroendocrinol* 2005;26(3-4): 131-8.
156. Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F and et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1 derived peptide receptor GPR54. *Pnas* 2003;100(19): 10972-10976.

157. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG and et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G-protein-coupled receptor 54. *Pnas* 2005;102(5): 1761-1766.
158. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR and et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349: 1614-27.
159. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H and et al. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320(2): 383-8.
160. Navorro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S and et al. Effects of KISS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2006;146(4): 1689-1697.
161. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103: 253-262.
162. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC and et al. Hypothalamic mTOR signalling regulates food intake. *Science* 2006;312: 927-930.
163. Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, Sanchez-Garrido A and et al. The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* 2009;150: 5016-5026.
164. Dhillon WS, Chaudri OB, Thompson EL, Murphy KG and et al. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(10): 3958-66.
165. Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S and et al. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance. *Hum Upd* 2016;1: 22.
166. Leo DV, Musacchio MC, Cappelli V, Massaro MG, and et al. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update. *Reprod Biol Endocrinol* 2016;14: 38.
167. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod* 2012; 86(5): 149.

168. Roy S, Mahesh VB, Greenblatt nRB. Effect of dehydroepiandrosterone and delta4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature* 1962; 196: 42-3.
169. Abramovich D, Irusta G, Bas D, Cataldi NI ve ark. Angiopoietins/TIE2 system and VEGF are involved in ovarian function in a DHEA rat model of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 2012; 153: 3446-3456.
170. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30(6): 713-743.
171. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 254: 91-96.
172. Medina MC, Sauza LC, Caperuto LC, Fanhe G ve ark. Dehydroepiandrosterone increases β -cell mass and improves the glucose indexed insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *Febs Letters* 2006; 580: 285-290.
173. Kang J, Ge C, Yu L, Li L ve ark. long-term administration of dehydroepiandrosterone accelerates glucose catabolism via activation of PI3K/Akt-PFK-2 signaling pathway in rats red a high-fat diet. *Plos One* 2016; 11(7): 13.
174. Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Elia E ve ark. Role of the N, N0-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*. 2006;131(3):591-602.
175. Wang Z, Zhai D, Zhang D, Bail L ve ark. Quercetin decreases insulin resistance in a polycystic ovary syndrome rat model by improving inflammatory microenvironment. *Reprod Sci* 2016; 1-9.
176. Rafique N, Latif R. Serum kisspeptin levels in normal and overweight Saudi females and its relation with anthropometric indices. *Ann Saudi Med*. 2015;35(2): 157-60.
177. Castellano JM, Gayton M, Roa J, Vigo E ve ark. Expression of Kiss-1 in rat ovary: putative local regülatör of ovulation? *Endocrinology* 2006;14(10): 4852-62.

178. Dowlin AR, Nedorezov LB, Qiu X, Marino JS ve ark. Genetic factors modulate the impact of pubertal androgen excess on insulin sensitivity and fertility. PLoS One 2013; 8(11): e79849.
179. Cadwell ASL, Middleton LJ, Jimenez M, Desai R ve ark. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic Mouse models. Endocrinology 2015;155: 3146-3159.
180. Bulut G, Kurdoğlu Z, Dönmez BY, Kurdoğlu M ve ark. Effects of jnk inhibitör on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(8): 8774-8785.
181. Honnma H, Endo T, Henmi H, Nagasawa K ve ark. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. Apoptosis 2006;11: 1525-1533.
182. Lee MT, Anderson E, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. Anatomical Record 1991;231: 185-192.
183. Paixao L, Velez LM, Santos BR, Tusset C ve ark. Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. J Dev Orig Health Dis 2016;7: 384-90.
184. Gözükarı I, Dokuyucu R, Özgür T, Özcan O ve ark. Histopathologic and metabolic effect of ursodeoxycholic acid treatment on PCOS rat model. Gynecol Endocrinol 2016;32(6): 492-7.
185. Ghafurniyan H, Azarnia M, Nabiuni M, Karimzadeh L. The effect of green tea extract on reproductive improvement in estradiol valerate induced polycystic ovary polycystic ovarian syndrome in rat. IJPR 2015;14(4): 1215-1233.
186. Takagi K, Yamada T, Miki M, Umegaki T ve ark. Histological observations of the development of follicles and follicular atresia in immature rat ovaries. Med Okayama 2007;61(5): 283-298.

187. Anderson E, Lee GY. The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and its metabolites on polycystic ovarian condition (PCO): cystogenic changes of rat granulosa cells in vitro. *Tissue and cell* 1996;28(6): 673-685.
188. Zhang X, Zhang C, Shen S, Xia Y ve ark. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Hum Reprod* 2013;28(11): 3074-85.
189. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 2005; 280(27): 25485-90.
190. Yaba A, Bianchi V, Borini A, Johnson J. A putative mitotic checkpoint dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. *Reprod Sci* 2008; 15(2): 128-38.
191. Yu J, Yaba A, Kasiman C, Thomson T ve ark. mTOR controls ovarian follicle growth by regulating granulosa cell proliferation. *Plos One* 2011;6(7): e21415.
192. Yaba A, Demir R. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Ovarian Res* 2012;5(1): 38.
193. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome-a hypothesis. *J Endocrinol* 2002; 174(1): 1-5.
194. Yu J, Zhai D, Hao L, Zhang D ve ark. cryptotanshinone reverses reproductive and metabolic disturbances in PCOS model rats via regulating the expression of CYP17 and AR. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014: 670743.

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL BELGESİ



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 412234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/12/2014

Toplantı Tarihi : 17 Haziran 2014

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığına

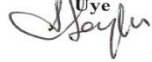
38/2014 Protokol No'lu; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.İşıl TEKMEK'in yürütücüsü olduğu "Deneyel olarak oluşturulan polikistik over sendromunda Kisspeptin uygulamasının mTOR mekanizmasına etkisi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Çalışmanın başlangıcında kan almak için sıçan kuyruk ven'inin kullanılması önerilir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEK
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Alper SOYLU

Üye


Prof.Dr.Ayşe GELAL

Üye

Prof.Dr.Tolga Fikri KÖROĞLU
Üye(Topl.Katılmadı)


Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

Prof.Dr.Gülşün OKTAY
Üye

Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS

Üye

(topl.katılmadı)

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ

Üye


Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN

Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından

EK-2 ÖZGEÇMİŞ

CANSU BEKDEMİR

TC Kimlik No / Pasaport No:	
Doğum Yılı:	
Yazışma Adresi :	
Telefon :	
Faks :	
e-posta :	

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TC	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2012

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
				.	

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler**

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

