



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL PCOS MODELİNDE OOSİT MATURASYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN: TUNA ÖNAL
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

MANİSA-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL PCOS MODELİNDE OOSİT MATURASYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN: TUNA ÖNAL
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER	(Tez Danışmanı)
PROF. DR. AYŞEGÜL UYSAL	(Üye)
PROF. DR. ALTUĞ YAVAŞOĞLU	(Üye)
DOÇ. DR. YILDIZ UYAR	(Üye)
DOÇ. DR. ELGİN TÜRKÖZ ULUER	(Üye)

MANİSA-2019

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10256691
Yazar Adı / Soyadı	TUNA ÖNAL
T.C.Kimlik No	12782599788
Telefon	5393295882
E-Posta	tunaonal_17@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Deneyisel PCOS Modelinde Oosit Maturasyonunun Değerlendirilmesi
Tezin Tercümesi	Evaluation of Oocyte Maturation in Experimental PCOS Model
Konu	Histoloji ve Embriyoloji = Histology and Embryology
Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Doktora
Yılı	2019
Sayfa	151
Tez Danışmanları	PROF. DR. HAFİZE SEDA VATANSEVER
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Deneyisel PKOS, Fare Modeli, Oosit Maturasyonu, Klomifen Sitrat, Metformin, Pioglitazon

20.06.2019

İmza:.....



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

(Tez kitabına konulacak)
DOKTORA TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı DOKTORA öğrencisi Tuna ÖNAL'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı **“Deneyisel PCOS Modelinde Oosit Maturasyonunun Değerlendirilmesi”** başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek “KABUL” kararı verilmiştir. 19/06/2019

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Ayşegül UYSAL (Ege Ü. Tıp Fak. Öğretim Üyesi)

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU (Ege Ü. Tıp Fak. Öğretim Üyesi)

Doç. Dr. Yıldız UYAR (MCBÜ Tıp Fak. Öğretim Üyesi)

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER (MCBÜ Tıp Fak. Öğretim Üyesi)

İmza

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28.06.2019 tarih ve 19/24... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bilal HABES GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü Vekili

Not: En az 2 öğretim üyesi bir başka üniversitenin öğretim üyeleri olacak. üç'ü tez izleme komitesi olacak

BEYAN

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



Tuna ÖNAL

TEŞEKKÜR

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2016-163 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tezimin ortaya çıkmasında ve gerçekleşmesinde yardımını esirgemeyen, bana eğitim hayatım boyunca her zaman yol gösteren, her daim sabır ve anlayışla destek olan, manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof Dr. H. Seda VATANSEVER’e,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana her daim, bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda yardımcı olan, Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Prof. Dr. Sevinç İNAN, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU ve Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER’e

Lisansüstü eğitimim boyunca birlikte çalıştığım TUS, doktora ve yüksek lisans öğrencisi Asistan Arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgeyeyen canım AİLEM’e,

Manisa’nın bana katmış olduğu en değerli varlığım Eşim, Hayat Arkadaşım, Herşeyim Melike ÖZGÜL ÖNAL’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuna ÖNAL

KISALTMA VE SİMGELER

17-OHP	: 17-hidroksi progesteron
ADAMTS-1	: Trombospondin benzeri motifler içeren bir disintegrin ve metalloproteinaz-1
AE-PKOS	: Androjen Fazlası ve Polikistik Over Sendromu
AMH	: Anti Müllerien Hormon
AR	: androjen reseptörü
ASRM	: Amerikan Üreme Sağlığı Kurumu
BMP-2	: Kemik morfojenetik protein 2
BMP-4	: Kemik morfojenetik protein 4
BMP-8b	: Kemik morfojenetik protein 8b
BMP-15	: Kemik Morfojenik Protein 15
Cx37	: Konneksin-37
Cx43	: Konneksin-43
DHEA	: Dihidroepiandrosteron
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ESHRE	: Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği
ESM	: Ekstraselüler Matriks
FGF-2	: fibroblast büyüme faktörü-2
FGF-7	: Fibroblast Büyüme Faktörü-7
FIGLA	: Factor In The Germline Alfa: Germline Alfadaki Faktör
FOXL2	: Forkhead box L2
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GDF-9	: Büyüme ve Farklılaşma Faktörü-9
GH	: Granüloza Hücresi
GJA1	: Gap Junction Alfa 1
GJA4	: Gap Junction Alfa 4
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPCR	: G Proteine Bağlı Reseptör
GV	: Germinal Vezikül
GVBD	: Germinal Vezikül Breakdown
H&E	: Hematoksilen Eozin
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
IVM	: İn Vitro Maturasyon
KITL	: Kit-ligand, kök hücre faktörü

KOK	: Kumulus-oosit kompleksi
LH	: luteinizan hormon
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktörü
NC-CAH hiperplazi	: 21-hidroksilaz eksikliği olmayan klasik olmayan konjenital adrenal
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitülerinde
NOBOX	: Yenidoğan ovaryumunda kodlanan homeobox geni
NOBOX	: Newborn Ovary Homeobox Encoding Gene
NT	: Nörotrofinler
NTRK	: Nörotrofin Tirozin Kinaz Reseptörleri
OMI	: Oosit Maturasyon İnhibitörü
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PCOS	: Polycystic Ovarian Syndrome
PGH	: Primordiyal Germ Hücreleri
PKO	: Polikistik Over
PKOS	: Polikistik Over Sendromu
PRL	: Prolaktin
TIMP	: Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
VKİ	: Vücut kitle indeksi
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMA VE SİMGELER.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
RESİM DİZİNİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. DİŞİ ÜREME SİSTEMİNE GENEL BAKIŞ.....	8
4.2. OVARYUMLAR.....	9
4.2.1. Ovaryumun Histolojik Yapısı	11
4.2.2. Oogenez.....	17
4.2.3. Primordiyal Germ Hücreleri	18
4.2.4. Folikülogenez	19
4.3. İNFERTİLİTE.....	23
4.3.1. Kadına Ait İnfertilite Problemleri	24
4.4. POLİKİSTİK OVER SENDROMU.....	27
4.4.1. Tanımı ve Tarihçesi.....	27
4.4.2. PKOS'un Tanı Kriterleri	28
4.4.3. Epidemiyolojisi	31
4.5. DENEYSEL PKOS MODELİ.....	32
4.6. OOSİT MATURASYONU	35
4.7. PKOS'DA FOLİKÜLOGENEZ VE OOSİT MATURASYON PROBLEMLERİ.....	38
4.7.1. PKOS'ta İnfertilite	40

4.8. PROJE KAPSAMINDA İNCELENEN PROTEİNLER.....	42
4.8.1. Cep55	42
4.8.2. Cdk4	43
4.8.3. Hsp27	44
4.8.4. Nobox.....	44
4.8.5. Foxl2	45
4.8.6. Konneksin 37	46
4.8.7. Konneksin 43	48
4.8.8. Adamts-1	50
4.8.9. Adamts-9	51
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	53
5.1. DENEYSSEL PKOS MODELİ OLUŞTURULMASI	53
5.2. ÇALIŞMA GRUPLARI.....	54
5.3. GLUKOZ TOLERANS TESTİ	54
5.4. OVARYUM DOKULARININ HİSTOLOJİK ANALİZİ.....	55
5.4.1. Dokuların Alınması ve Parafin Doku Takibi	55
5.4.2. Ovaryum Dokularının Histokimyasal Yöntem ile Analizi.....	55
5.4.3. Ovaryum Dokularının İmmunohistokimyasal Yöntem ile Analizi	56
5.4.4. Oositlerin İmmunofloresan Yöntem ile Analizi.....	58
5.5. İMMUNOFLORESAN GÖRÜNTÜLERİN IMAGE J İLE ANALİZİ... 62	
5.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	62
6. BULGULAR	63
6.1. OVARYUMLARIN MORFOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ.....	63
6.2. GLUKOZ TOLERANS TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	64
6.3. OVARYUM DOKULARININ HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ	64
6.4. OVARYUM DOKULARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRİLMESİ.....	66
6.4.1. Cep55 immunoreaktivitesi	66
6.4.2. Cdk4 immunoreaktivitesi	67
6.4.3. Hsp27 immunoreaktivitesi	68
6.4.4. Nobox immunoreaktivitesi.....	69
6.4.5. Foxl2 immunoreaktivitesi	70
6.4.6. Konneksin 37 immunoreaktivitesi	71
6.4.7. Konneksin 43 immunoreaktivitesi	73
6.4.8. Adamts-1 immunoreaktivitesi.....	74

6.4.9. Adamts-9 immunoreaktivitesi.....	75
6.5. OOSİTLERİN İMMUNOFLORESAN DEĞERLENDİRİLMESİ	78
6.5.1. Cep55	78
6.5.2. Cdk4	81
6.5.3. Hsp27	84
6.5.4. Nobox ve Foxl2.....	86
6.5.5. Konneksin 37 ve Konneksin 43	91
6.5.6. Adamts-1 ve Adamts-9	95
7. TARTIŞMA	100
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	113
9. KAYNAKLAR.....	114
10. EKLER.....	148
11. ÖZGEÇMİŞ.....	151

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Dişi üreme sistemi iç ve dış genital organları.....	9
Şekil 2. Ovaryumların gelişimi	10
Şekil 3. Ovaryum kesitinin şematik görünümü.....	12
Şekil 4. Folikül gelişimi ve ovaryumda meydana gelen değişiklikler	16
Şekil 5. Folikülogenez ve oogenez	18
Şekil 6. Memeli folikülgenezi, folikül tipleri atrezinin belirtilmesi ve gonadotropin bağımlı aşamalarının şematik gösterimi.....	20
Şekil 7. Farede folikülogenezi kontrol eden moleküller	23
Şekil 8. Dişi üreme kanalında oosit, sperm ve embriyonun taşınmasının şematik gösterimi.....	27
Şekil 9. Oosit ve foliküler büyüme ile mayotik maturasyonun genel görünümü	38
Şekil 10. PKOS'un olası kökenlerinin şematik modeli	42
Şekil 11. Grup 1 ve Grup 2 için glukoz tolerans testi grafiği	64
Şekil 12. Tüm gruplara ait oositlerdeki Cep55 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi	79
Şekil 13. Tüm gruplara ait oositlerdeki Cdk4 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi	81
Şekil 14. Tüm gruplara ait oositlerdeki Hsp27 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi	84
Şekil 15. Tüm gruplara ait oositlerdeki Nobox immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi	87
Şekil 16. Tüm gruplara ait oositlerdeki Foxl2 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi	88
Şekil 17. Tüm gruplara ait oositlerdeki Konneksin 37 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi.....	91
Şekil 18. Tüm gruplara ait oositlerdeki Konneksin 43 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi.....	92
Şekil 19. Tüm gruplara ait oositlerdeki Adamts-1 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi	95
Şekil 20. Tüm gruplara ait oositlerdeki Adamts-9 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi	96

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Ovaryum foliküllerinin gelişme evreleri	15
Tablo 2. Polikistik Over Sendromunun tanı kriterleri	28
Tablo 3. PKOS'un klinik ayırıcı tanısında dikkat edilmesi gereken diğer hastalıklar	30
Tablo 4. PKOS hayvan modellerinin endokrin hormon profilleri.....	34
Tablo 5. Androgen ile indüklenen PKOS fare modelleri ve insan PKOS ile paylaşılan özellikleri	35
Tablo 6. Parafin doku takip protokolü.....	55
Tablo 7. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	56
Tablo 8. İndirekt immunohistokimya protokolü	58
Tablo 9. Oositler için immunofloresan protokolü	60
Tablo 10. Histokimyasal ve immunohistokimyasal analizlerde kullanılan malzemelerin listesi.....	61
Tablo 11. Tüm gruplara ait Cep55 antikorunun CTCF değerleri.....	78
Tablo 12. Tüm gruplara ait Cdk4 antikorunun CTCF değerleri.....	81
Tablo 13. Tüm gruplara ait Hsp27 antikorunun CTCF değerleri.....	84
Tablo 14. Tüm gruplara ait Nobox antikorunun CTCF değerleri	87
Tablo 15. Tüm gruplara ait Foxl2 antikorunun CTCF değerleri.....	88
Tablo 16. Tüm gruplara ait Konneksin 37 antikorunun CTCF değerleri.....	91
Tablo 17. Tüm gruplara ait Konneksin 43 antikorunun CTCF değerleri.....	92
Tablo 18. Tüm gruplara ait Adamts-1 antikorunun CTCF değerleri.....	95
Tablo 19. Tüm gruplara ait Adamts-9 antikorunun CTCF değerleri.....	96
Tablo 20. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'ün oositlerinin immunofloresan analizine ait immunoreaktivite değerlendirmeleri.	99

RESİM DİZİNİ

Resim 1. Tüm gruplara ait farelerden elde edilen ovaryumların stereo mikroskopik görüntüleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C), Grup (4). Ok başları: Ovaryumda hemorajik kistik yapılar. Ölçek:X60. 63

Resim 2. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum kesitlerinin Hematoksilen-Eozin ile boyanma görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül. Ölçek: 100µm. 65

Resim 3. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Cep55 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 67

Resim 4. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Cdk4 immunohistokimyasal analiz görüntüleri Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 68

Resim 5. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Hsp27 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 69

Resim 6. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Nobox immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 70

Resim 7. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Foxl2 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 71

Resim 8. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Konneksin 37 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 72

- Resim 9.** Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Konneksin 43 immunohistokimyasal analiz görüntüleri Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 74
- Resim 10.** Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 75
- Resim 11.** Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Adamts-9 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm. 76
- Resim 12.** Grup 2'ye ait ovaryum kesitinde immunohistoperoksidaz yönteminin negatif kontrole ait görüntüleri. Ölçek; A: 50 µm; küçük resim: 100 µm. 77
- Resim 13.** Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cep55 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cep55, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm..... 79
- Resim 14.** Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cep55 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cep55, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm..... 80
- Resim 15.** Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cdk4 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cdk4, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm. 82
- Resim 16.** Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cdk4 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cdk4, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm. 83
- Resim 17.** Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Hsp27 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Hsp27, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm..... 85
- Resim 18.** Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Hsp27 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Hsp27, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm..... 86
- Resim 19.** Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Nobox (B, G, R, L), Foxl2 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Nobox, Kırmızı: Foxl2, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm..... 89
- Resim 20.** Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Nobox (B, G, R, L), Foxl2 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Nobox, Kırmızı: Foxl2, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm. 90
- Resim 21.** Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Konneksin 37 (B, G, R, L), Konneksin 43 (C, H, M, S),

DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Konneksin 37, Kırmızı: Konneksin 43, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm. 93

Resim 22. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Konneksin 37 (B, G, R, L), Konneksin 43 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Konneksin 37, Kırmızı: Konneksin 43, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm. 94

Resim 23. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Adamts-1 (B, G, R, L), Adamts-9 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Adamts-1, Kırmızı: Adamts-9, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm. 97

Resim 24. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Adamts-1 (B, G, R, L), Adamts-9 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Adamts-1, Kırmızı: Adamts-9, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm. 98

Resim 25. Oositlere ait immunofloresan olarak negatif boyama görüntüleri. Çekirdek: Mavi. Ölçek: A-C: 100 µm, B-D: 50 µm. 99

Tezin Başlığı: Deneysel PCOS Modelinde Oosit Maturasyonunun

Değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı: Tuna ÖNAL

Danışmanı: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Anabilim Dalı: Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: PKOS’lu kadınlardan oosit elde edilmesinin zorluğu göz önüne alındığında, deneysel PKOS modeli oluşturulduktan sonra elde edilen oositlerin, maturasyon çalışmalarına olanak sağlaması ve bu çalışmalardan elde edilecek verilerin gelecekte infertilite tedavisine katkı sağlayabilecek olması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada deneysel PKOS fare modelinde farklı ilaç uygulamalarından sonra oosit maturasyonunu etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Deneysel PKOS modeli dört haftalık dişi Balb/C farelere 21 gün boyunca 6 mg/100g DHEA verilerek oluşturuldu. PKOS modeli oluşturulan farelerde sadece klomifen sitrat ya da klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon kombine olarak uygulandıktan sonra oosit maturasyonunu etkileyen Cep55, Cdk4, Hsp27, Nobox, Foxl2, Cx37, Cx43, Adamts-1 ve Adamts-9 belirteçlerinin değişimleri hem ovaryumlarda hem de oositlerde immunoperoksidaz ve immunofloresan yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Histolojik ve morfolojik bulgular ile PKOS modelinin geliştiği gösterildi. PKOS grubunda ovaryumlarda özellikle sekonder foliküllerde ve oositlerde oosit maturasyonunu etkileyen belirteçlerin azaldığı, tedavi gruplarından elde edilen ovaryumlarda sekonder ve tersiyer foliküllerde ve oositlerde belirteçlerin ekspresyonlarının arttığı gözlemlendi. Sadece klomifen sitrat ile tedavi uygulanan grupta ekspresyonların kombine tedavi grubuna göre daha fazla artmış olduğu tespit edildi.

Sonuçlar: PKOS grubunda bu belirteçlerin ekspresyonunun azalması ve tedavi gruplarında artmış olması, karmaşık moleküler mekanizmaya sahip olan oosit maturasyonunda, yeni moleküllerin gösterilmesi açısından önemlidir. Aynı belirteçlerin daha ileri teknikler ile incelenmesi PKOS’lu olgularda bu belirteçlerin oosit maturasyonunda kullanılacak yeni moleküller olacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel PKOS, Fare Modeli, Oosit Maturasyonu, Klomifen Sitrat, Metformin, Pioglitazon

Title: Evaluation of Oocyte Maturation in Experimental PCOS Model

Student Name: Tuna ÖNAL

Supervisor: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Department: Department of Histology-Embryology

2. ABSTRACT

Aim: Considering the difficulty of obtaining oocytes from women with PCOS, it is of great importance that the oocytes obtained after the experimental PCOS model has been established allow for maturation studies and that the data from these studies may contribute to future infertility treatment. The aim of this study was to evaluate the factors affecting oocyte maturation after different drug applications in experimental PCOS mouse model.

Material and Method: The experimental PCOS model was established by administering 6 mg / 100g DHEA to 21-week-old female Balb / C mice for 21 days. In the PCOS model mice after the administrations of only clomiphene citrate or clomiphene citrate, metformin and pioglitazone combined treatments, the changings of markers which affect the oocyte maturation Cep55, Cdk4, Hsp27, Nobox, Foxl2, Cx37, Cx43, Adamts-1 and Adamts-9 were evaluated in both ovaries and oocytes using immunoperoxidase and immnuofluorescent methods.

Results: The histological and morphological findings showed that the PCOS model was developed. In PCOS group, it was observed that the markers affecting oocyte maturation decreased in ovaries, especially in secondary follicles and oocytes, and in the ovaries of treatment groups the expression of markers in secondary and tertiary follicles and oocytes were increased. It was found that only Clomiphene Citrate treated group had higher expressions than the combined treatment group.

Conclusions: The decrease in the expression of these markers in the PCOS group and the increase in the treatment groups is important for demonstrating new molecules in oocyte maturation with a complex molecular mechanism. Examining the same markers with more advanced techniques suggests that these markers will be new molecules to be used in oocyte maturation in PCOS patients.

Key Words: Experimental PCOS, Mouse Model, Oocyte Maturation, Clomiphene Citrate, Metformin, Pioglitazone

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kadınlarda en yaygın görülen hastalık olan PKOS, dünya sağlık örgütünün verilerine göre görülme sıklığı %6-10 arasında iken Rotterdam kriterlerine göre %15'e kadar ulaşmaktadır. PKOS tedavisinin ekonomik açıdan maliyetinin yüksek olması ve PKOS'un etiyolojisinin çok iyi anlaşılamamış olması yapılacak çalışmalar açısından oldukça önemlidir. PKOS ergenlik ya da erken üreme yaşlarında görülmektedir aynı zamanda çoklu ovulasyon ya da ovulasyonun görülmemesi, erkeklik hormonlarının yüksekliği (hiperandrogenizm) ve çoklu kistik overlerin görülmesi ile karakterizedir. Ayrıca tüylenme (Hirsutizm), obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik anomalilere de neden olmaktadır.

PKOS, ovulatuvar disfonksiyon sebebinden dolayı kadına ait infertilite sebeplerinin %5-10'unu oluşturur. Foliküller belli büyüklükten sonra hormonal bozukluklar nedeniyle daha fazla gelişemez ve ovulasyon gerçekleşemez. Ovulasyonun yarım kalmasıyla milimetrik çaplarda kistik yapıda foliküller gelişir. Folikül gelişimi overlerin dış yüzeyine yakın kısmında olduğundan, gelişemeyen ama tamamen de kaybolmayan, foliküller overlerin yüzeye yakın kenarı boyunca dizilerek, ultrasonda tipik görünümü oluşturur. PKOS'tan dolayı fazla sayıda oosit gelişmesi oositlerin kalitesinin azalmasına neden olmaktadır. PKOS özellikle foliküler gelişim ile birlikte ovulasyonun gerçekleşmemesinden dolayı infertiliteye neden olan ve tedaviye gerek duyulan en önemli hastalıklardandır. Gebelik isteyen hastalarda ovulasyon indüksiyonu, gebelik istemeyenlerde hormonal tedavi ile menstrual siklusun düzenlenmesi yapılır. Tedavi hastanın yaşı, anovulasyon sebebine, gebelik istenip istenmemesine göre düzenlenmesi gerekir.

PKOS tedavisinde metformin, pioglitazone ve klomifen sitrat gibi insülin direncini düzenleyen ve ovulasyon indüksiyonu sağlayan ilaçların kullanıldığı tedavi

seçenekleri vardır. Metformin ve Pioglitazon PKOS tanısı alan kadınlarda infertilite tedavisi için kullanılan insülin duyarlaştıracı bir moleküldür. PKOS’lu hastaların insülin direncinin düşürülmesinde ve tip 2 diyabette yaygın olarak kullanılmaktadır. PKOS’lu kadınlarda metformin, ovulasyonu, oositin olgunlaşması ve oosit kalitesini arttırmaktadır. Ancak mekanizması hala tam olarak anlaşılmış değildir. Klomifen sitrat PKOS’da ovulasyon indüksiyonu için anovulatuvar PKOS’ta da birinci basamak tedavi olarak kullanılan geleneksel ilaçtır ve östrojenik bileşiklere benzer ve östrojen reseptörlerini bloke ederek östrojen etkisini azaltarak antiöstrojenik etki gösterir. Klomifen sitratin antiöstrojen etkisi hipotalamustaki östradiol reseptörlerini bloke etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda klomifen sitrat tedavisi ile ovulasyonun başarı oranının %50-70 arasında olduğu ancak gebelik oranlarının beklenenden daha az olduğu (%25-43) gösterilmiştir.

İn vitro fertilizasyon uygulamalarında oosit maturasyonu önemli bir rol oynamaktadır. İnsanlarda oositlerin immatür elde edilmesi in vitro fertilizasyon işlemlerinde önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu yüzden elde edilen oositlerin in vitro maturasyonunun artırılabilmesi IVF uygulamalarının da başarısının artacağı yönünde çalışmalar bildirilmiştir.

İnfertilite tedavilerinde son yıllarda ovaryan indüksiyon sonrasında alınan immatür oositlerin maturasyonunu sağlamak için çeşitli çalışmalar yapılmakla birlikte henüz tam bir başarı sağlanabilmiş değildir. Oosit maturasyonu hastaların indüksiyon tedavisi almaksızın pahalı ilaç tedavilerinin önüne geçmek için alternatif bir yöntem olarak sunulmaktadır.

Oosit maturasyonu, germinal vezikülün yıkımından MII’ ye kadar geçen süreçte, 1. mayoz bölünmenin tamamlanması olarak tanımlanır. Oosit maturasyonu, oosit kalitesini belirleyen ve birbirleriyle senkronize gelişim gösteren nükleer maturasyon ve sitoplazmik maturasyon olmak üzere iki farklı süreç tarafından belirlenir; Mayozun farklı aşamalarına göre, oositler, germinal vezikül, metafaz I ve metafaz II gibi üç farklı aşamada nükleer olgunlaşma göstermektedir. Nükleer olgunlaşma sürecinin sonunda, ilk polar body oluşmasını takiben metafaz II’de duraklayan oosit olgunlaşmıştır ve sperm tarafından döllenmeye müsaittir. PKOS hastalarında, IVF destekli gebeliği engelleyen başlıca problemler, folikülogenez sürecinin anormalliği ve oositlerin embriyonik gelişim ve implantasyon açısından yetersizliğidir.

Bir oosit ile oositi çevreleyen kumulus hücreleri arasındaki haberleşme, oosit yeterliliğinin sağlanması, erken embriyonik gelişim ve kumulus hücrelerinin büyümesi için önemlidir. Önceki araştırmalar, kumulus hücrelerinin farklı gen ekspresyonlarının oosit yeterliliğini gösterebileceğini veya embriyo gelişiminin ve gebelik sonuçlarının etkinliğini öngörebileceğini göstermiştir.

Bununla birlikte, insan kumulus hücrelerinin gen ekspresyon profilleri hakkındaki önceki çalışmalar, oositleri çevreleyen kumulus hücrelerine odaklanmışken, oositlerden izole edilen insan kumulus hücrelerinin, germinal vezikül, metafaz I ve metafaz II evrelerinde belirgin gen ifadesini vurgulamaktadır. Ayrıca, PKOS üzerine yapılan çalışmalarda, kumulus hücrelerindeki farklı gen ekspresyon paternleri, PKOS hastalarının oositlerinden izole edilen kumulus hücreleri ve normal hastaların oositlerinden elde edilenlerle karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

Cep55, sentrozomal protein ailesinin bir üyesidir ve mayotik fare oositlerinde iğ iplikçiklerinin bütünlüğünün ve hücre döngüsü ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Cep55 fare oositlerinde germinal vezikülden metafaz II safhalarına kadar eksprese edilmektedir.

Cdk4, protein serin kinaz süper ailesine ait olan hedef proteinlerin fosforilasyonunu katalizleyen ve hücre döngüsü ilerlemesini destekleyen bir proteindir. Cdk4 ve tip-D siklin arasında oluşan kompleks G1 fazı sırasında hücre proliferasyonunu düzenler. Bununla birlikte, Cdk4, folikülogenez ve oogeneze sırasında hücre büyümesinin kontrolünde de rol oynamaktadır ve farelerde oosit olgunlaşması sırasında G1 / S progresyonunda yer almaktadır.

Isı şok protein ailesine ait olan Hsp27, ısı şoku, toksinler, hasar ve oksidatif stres gibi çeşitli streslere karşı hücrel korumayı sağlayan moleküler şaperon proteindir. Aynı zamanda insan oositlerinde lokalize olan güçlü bir anti apoptotik düzenleyicidir ve PKOS'lu hastaların oositlerinde downregüle olmaktadır. Fare oositlerinde Hsp27'nin downregüle olması oosit maturasyonunu sağlamakta ve oositin erken dönemde kaspaz-8 aracılı ekstrinsik yolağı aktive ederek apoptozunu arttırmaktadır. Hsp27'nin PKOS'taki oosit olgunlaşması ve gelişme yeterliliği üzerindeki kesin etkisi açıklığa kavuşmamıştır.

Nobox, germ hücrelerinde, folikül gelişiminde, insan ile fare primordiyal ve büyüyen oositlerinde eksprese olan oosit spesifik bir genidir. *Nobox* homozigot knockout farelerde doğum sonrası oosit kaybı görülmektedir. Ayrıca Nobox geninin yokluğunda *Gdf-9*'un ve birçok oosit spesifik genin ekspresyonu downregüle olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Foxl2, ovaryan foliküllerin gelişimini ve maturasyonunu sağlayan gerekli transkripsiyon faktördür. Foxl2'nin heterozigot mutasyonları kadınlarda prematur ovaryan yetmezlik ve infertiliteye neden olmaktadır. Foxl2 granüloza hücrelerine etki ederek foliküllerin gelişimine katkı sağlamaktadır.

Gap junctionlar amino asitler, glukoz, nükleotidler, büyüme faktörleri ve RNA gibi folikül gelişimi ve oosit maturasyonu için gerekli olan moleküllerin ve iyonların geçişinde ve hücre içi haberleşmede önemli rol oynarlar. Overlerde Konneksin 26, Konneksin 30, Konneksin 32, Konneksin 37, Konneksin 40, Konneksin 43 ve Konneksin 45 gibi çeşitli konneksinler tanımlanmıştır ancak özellikle Konneksin 37 ve Konneksin 43 folikülogenezde önemlidir.

Konneksin 43, granüloza hücrelerinde tanımlanmıştır ve granüloza hücreleri arasında bulunmakta olup primordiyal folikül hücrelerinde de bulunmaktadır. Aynı zamanda somatik hücreler arasındaki ilişkiye aracılık eder. Konneksin 43 protein ekspresyonu seviyesi, folikül gelişiminde artar ve foliküler atrezi ile azalır. Konneksin 43 olmadığında, somatik hücreler arasındaki gap junctionlar oluşmaz ve folikülogenez unilaminer aşamada durmaktadır. Ayrıca Konneksin 43 null farelerden elde edilen oositlerde infertiliteye neden olan mayotik maturasyon gerçekleşmemiştir. Konneksin 37'de oosit ve kumulus hücreleri arasındaki iletişimde görev almaktadır. Konneksin 37' nin mutasyonu, olgun Graaf foliküllerinin üretimini ve oositlerin gelişimini durdurmaktadır.

Adamts-1 gibi bir serin proteinaz ovulasyonda kumulus oosit kompleksinin büyümesine katkı sağlar. Adamts-1 matriks metalloproteinazlardan farklı olarak salgılanan metalloendopeptidazlar ile ilişkili bir aileye aittir. Ayrıca Adamts-1 proteinaz aktivitesi aracılığıyla inflamatuvar süreçte de rol oynamaktadır. Adamts-1'in konsantrasyon artışı kemirgenlerde, ineklerde, atlarda, domuzlarda ve insanlarda ovulasyon boyunca preovulatuvar foliküllerde tespit edilmiştir. İnsanlarda da IVF uygulamasında elde edilen granüloza hücrelerinde eksprese olmaktadır. PKOS'lu hastalarda düzensiz Adamts-1 ekspresyonu intrinsik oosit anomalilerine neden

olmaktadır.

Adamts-9, ekstrasellüler matriks bağlanmasına katılan bir gendir ve MII oositlerden elde edilen kumulus hücre gruplarında MI oositlerden elde edilen kumulus hücre gruplarına kıyasla artmış olarak gösterilmiştir. Buna ek olarak, Adamts-9'un fare embriyo gelişimi sırasında yaygın şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir. Adamts-9'un oosit olgunlaşması sırasında ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler, PKOS'ta folikülogenez ve oosit olgunlaşması için hücre iskeletinin ve hücre dışı matriks oluşumunun önemli olduğunu göstermektedir.

PKOS'lu kadınlardan oosit elde edilmesinin zorluğu göz önüne alındığında, deneysel PKOS modeli oluşturulduktan sonra elde edilen oositlerin, maturasyon çalışmalarına olanak sağlaması ve bu çalışmalardan elde edilecek verilerin gelecekte infertilite tedavisine katkı sağlayabilecek olması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada deneysel PKOS fare modelinde farklı ilaç uygulamalarından sonra oosit maturasyonunu etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. DIŞI ÜREME SİSTEMİNE GENEL BAKIŞ

Dişi üreme sistemi; ovaryumlar, tuba uterinalar, uterus ve vajinadan oluşan iç üreme organları ve mons pubis, labiyum majuslar ve minuslar, klitoris, vestibül ve vajina açıklığı, himen ve dış üretra açıklığından oluşan dış üreme organlarını kapsayan bir sistemdir (Şekil 1). Embriyonun genetik olarak dişi olacağı belli olmasına rağmen, dişi üreme organları embriyolojik gelişimin 7. haftasına kadar farklılaşmamış evre içerisinde ve dişiye ait morfolojik özellikler bu haftadan sonra belirginleşmeye başlar. Dişi üreme sistemi puberteye girişte menarş ile başlayan ve menopoza kadar süren siklik değişiklikler ile karakterizedir (Ross ve Pawlina 2014).

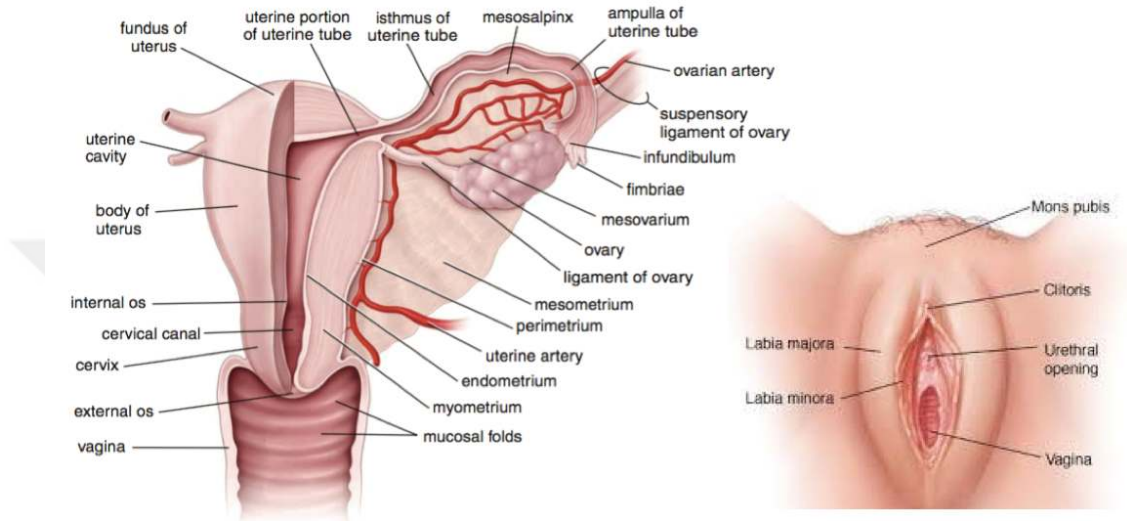
Ovaryumlar, germinal epitel adı verilen tek katlı kübik epitel ile örtülü altında yoğun kollajenden zengin düzensiz bağ doku olan tunika albuginea, onun altında da foliküller içeren korteks ve en içte de medulladan oluşmaktadır. Ovaryumlar steroidogenez ve gametogenezden sorumlu organlardır (Gartner LP ve Hiatt JL 2016).

Tuba uterinalar, yaklaşık 12 cm uzunluğunda fertilizasyonun gerçekleştiği organlardır. İnfundibulum, ampulla, istmus ve intramural parça olmak üzere dört bölümde incelenmektedir. Her tuba uterinanın duvarı içten dışa tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika serozadan oluşmaktadır (Junqueira ve Carneiro 2005).

Uterus; fundus, korpus ve serviks olmak üzere üç bölümden meydana gelmektedir. Menstrual sikluslar ve embriyonun implantasyonu uterusunda meydana gelmektedir. Serviks epitelisi menstruasyon ile dökülmemektedir fakat siklusa bağlı olarak salgıları değişmektedir.

Vajina fibromusküler bir kanal olup, içten dışa tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya tabakalarından meydana gelmektedir.

Dış üreme organlarından labia majörler ince deri histolojisi gösterirler. Labia minörler ise vasküler deri kıvrımlarıdır fakat kıl folikülleri içermezler. Vestibül iki labia minör arasında bulunan açıklıktır. Klitoris ise çok sayıda sinir sonlanmaları içeren erektile cisimciklerden oluşmaktadır (Kierszenbaum 2006).



Şekil 1. Dişi üreme sistemi iç ve dış genital organları (Ross ve Pawlina 2016; http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/66701/41774/üreme_sisteminin_anatomisi.pdf, Erişim tarihi: 23 Mayıs 2019).

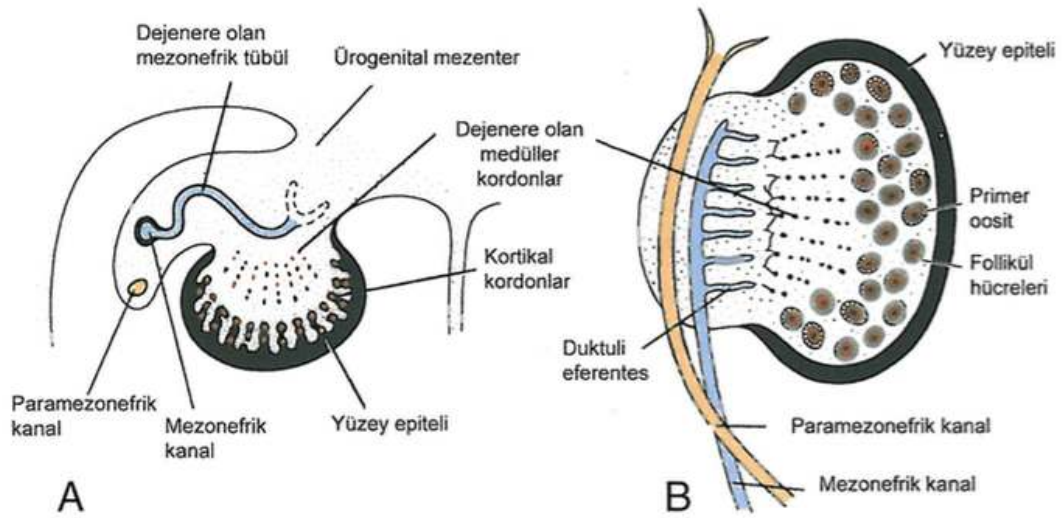
4.2. OVARYUMLAR

Embriyonik yaşamın 5. haftasında gonadal kabartıların gelişmesi ile ovaryumlar meydana gelmektedir. Epitel proliferasyonu ve altındaki mezenşim dokusunun yoğunlaşması ile tanımlanan gonadal kabartı 5. haftanın başından itibaren primordiyal germ hücreleri (PGH) tarafından işgal edilmeye başlamaktadır (Şekil 2). Y kromozomunun olmamasına ve PGH'nin indükleyici etkilerine bağlı olarak medüller kordonların dejenere olması ve kortikal kordonların gelişmesi overlerin gelişimini sağlamaktadır (Moore ve ark. 2013).

WNT4 over gelişiminin temel moleküler belirteci olarak hizmet etmektedir. Y kromozomu üzerinde bulunan SRY geninin varlığında üretilen SOX9, WNT4 inhibisyonu sağlamaktadır. SOX9 olmadığında WNT4 aktif hale gelmekte ve gelişim dişi yönünde devam etmektedir. WNT4 hem erkek gelişimini inhibe etmekte hem de

over diferansiasyonu için gerekli genleri aktive etmektedir. Overler salgıladıkları östrojenler sayesinde paramezonefrik kanalları tuba uterinaları, uterusu, serviksi ve vajinanın üst kısmını oluşturmak üzere uyarırken aynı zamanda dış genital organların gelişimini de sağlamaktadırlar (Sadler 2011).

Yaklaşık altıncı haftada over taslaklarında yerleşmiş PGH tek katlı yassı epitel hücreleri ile çevrenirler ve oogonyum adını alırlar (Şekil 2). Oogonyumlar foliküler hücreler ile çevrildikten sonra gelişmeye başlarlar ve içerisinde bir adet birinci mayoz bölünmenin profazının diploten evresinde bekletilen bir primer oosit bulunacak şekilde primordiyal folikülleri oluşturur. Oosit maturasyon inhibitörü (OMI) olarak biline bir faktör sayesinde ise primordiyal foliküller içerisindeki primer oositlerde mayoz duraklatılır (Dudek 2014).



Şekil 2. Ovaryumların gelişimi. (a) Yedinci hafta, (b) Beşinci ay (Sadler 2011).

Ovaryumlar steroidogenez ve gametogenez olmak üzere iki temel fonksiyona sahiptirler (Ross ve Pawlina 2014).

Steroidogenez: Ovaryumlar steroid hormonlar sınıfına ait olan östrojenleri ve progesteronları salgılamaktadırlar. Östrojenler, gestasyon sırasında iç ve dış dişi genital organların oluşumu ve gelişimi için esastır (Junqueira ve Carneiro 2005). Ayrıca puberteye gelindiğinde ikincil dişi karakteristiklerin ve meme bezleri gelişimini sağlamaktadır. Progesteronlar ise puberteden başlayıp menopoza kadar

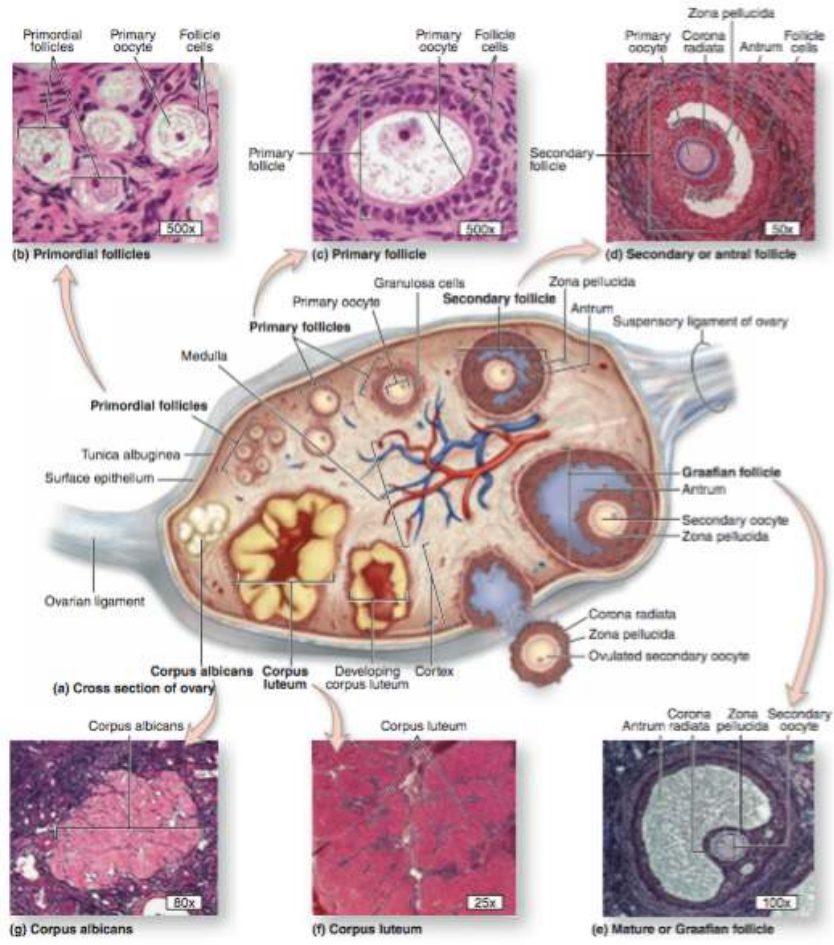
devam eden siklik değişimleri sağlamakta, ayrıca dişiyi gebeliğe hazırlayan ve laktasyonu destekleyen etkileri bulunmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Gametogenez: Gamet üretilmesi anlamına gelen gametogenez dişilerde oogenezi adını almaktadır. Oogenezi sonucunda olgun oositler meydana gelmektedir (Ross ve Pawlina 2014).

4.2.1. Ovaryumun Histolojik Yapısı

Dişi iç genital organları pelviste yerleşiktir. Embriyonik gelişim sırasında karın içerisinde gelişen overler iniş geçeri ve erişkindeki yerlerini aldıklarında duraklar. Ovaryumlar doğum yapmamış kadınlarda 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında boyutlara sahiptir ve ligamanetlerle pelvis duvarına tutunmaktadır (Şekil 3) (Ross ve Pawlina 2014).

Ovaryumun dış yüzeyi germinal epitel ya da over yüzey epiteli adı verilen genellikle tek katlı kübik bazı bölgelerde ise yassı olabilen epitel ile kaplıdır. Germinal epitelin altında sıkı bağ doku yapısında olan tunika albuginea bulunur. Histolojik olarak ovaryum tunika albuginea tabakasının altında korteks ve korteks tarafından çevrelenen medulla olmak iki kısımdan oluştuğunu ortaya koymaktadır. Korteks; primoriyal, primer, sekonder ve olgun ovaryum foliküllerini içeren bağ dokusu yapısındadır. Medulla ise; kan damarlarını, lenf damarlarını ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu yapısı ile ovaryumun merkezini oluşturmaktadır (Kierszenbaum 2006).



Şekil 3. Ovaryum kesitinin şematik görünümü. (a) Ovaryum kesiti, (b) Primordiyal folikül, (c) Primer folikül, (d) Sekonder folikül, (e) Tersiyer (Graff) folikülü, (f) Korpus luteum, (g) Korpus albicans (Mescher 2019).

Korteks herbiri bir oosit içeren foliküllerden meydana gelmektedir. Gelişim aşamasına göre ovaryum folikülleri 4 temel sınıfa ayrılmaktadır: Primordiyal foliküller, primer foliküller, sekonder foliküller ve olgun foliküller. Her folikül içerisinde bir adet birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde bekletilen bir primer oosit bulunmaktadır. Olgun (Graff) folikülün ovulasyonu esnasında primer oosit birinci mayoz bölünmeyi bitirir ve ikinci mayoz bölünmenin metafaz safhasında bekletilir. Ovulasyondan sonra olgun foliküller farklılaşarak sırası ile korpus luteuma ve korpus albikansa dönüşür (Kierszenbaum 2006).

Primordiyal Foliküller: İlk olarak fetal gelişimde ortaya çıkan primordiyal foliküller, içlerinde gelişimlerinin birinci mayotik bölünmesinde arreste uğramış primer oosit içeren ve oositin tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrelenmiş halidirler (Ross ve Pawlina 2016). Primordiyal foliküller Tunika Albuginea'nın hemen altında yer alırlar. Primordiyal foliküller folikül gelişiminin ilk evresidir ve bu

aşamada oosit ile foliküler hücreler birbirleriyle yakın halde bulunurlar. Bu aşamada oosit büyük, eksantrik bir çekirdek, anüler lameller ve Balbiani cisimcikleri içerir ve yaklaşık 30 µm çapındadır. Yassı foliküler hücreleri ile bağ doku arasında ise bir bazal lamina mevcuttur (Kierszenbaum 2006). Gelişmekte olan foliküller olan primordiyal foliküllerin gelişimleri Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) bağımlı değildir, onun yerine parakrin faktörler olan Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF), aktivin ve Ca^{2+} tarafından gelişmeleri uyarılmaktadır (Gartner ve Hiatt 2016).

Primer Foliküller: Primordiyal foliküller büyümeye başladıklarında primer folikülleri oluşturmaktadırlar. Primer foliküller gelişim aşamalarına bağlı olarak 2 tiptir: Tek tabakalı primer foliküller ve çok tabakalı primer foliküller.

Primer foliküllerin gelişimi de primordiyal foliküllerin gelişimleri gibi FSH bağımlıdır ve EGF, IGF, aktivin ve Ca^{2+} etkisi altında gelişirler (Gartner ve Hiatt 2016).

Primer foliküller oluşurken, primordiyal foliküllerin yassı folikül hücreleri kübik şekil alır ve granüloza hücreleri adı verilen bu hücreler birbirlerine gap junctionlar aracılığıyla tutunur. Primer foliküller gelişirken oosit çapı da büyür ve bu aşamada Balbiani cisimciği kaybolur, organeller ile lipid damlacığı sayısında artış meydana gelir. Zona pellusida gelişir ve oolemmaya yakın bölgelerde de kortikal granüller ortaya çıkar (Junqueira ve Carneiro 2005). Oosit büyüdükçe Zona Pellusida'yı geliştir ve zona pellusida glikoproteinleri, ZP-1, ZP-2 ve ZP-3 primer oosit tarafından salgılanır. Oositten uzanan mikrovilluslar ile granüloza hücreleri temas halindedir. Primer foliküller gelişimlerine devam ederek folikül hücreleri hızlı mitoz ile sayıca çoğalır, çok tabakalı granüloza tabakası oluşur (Eroschenko 2013).

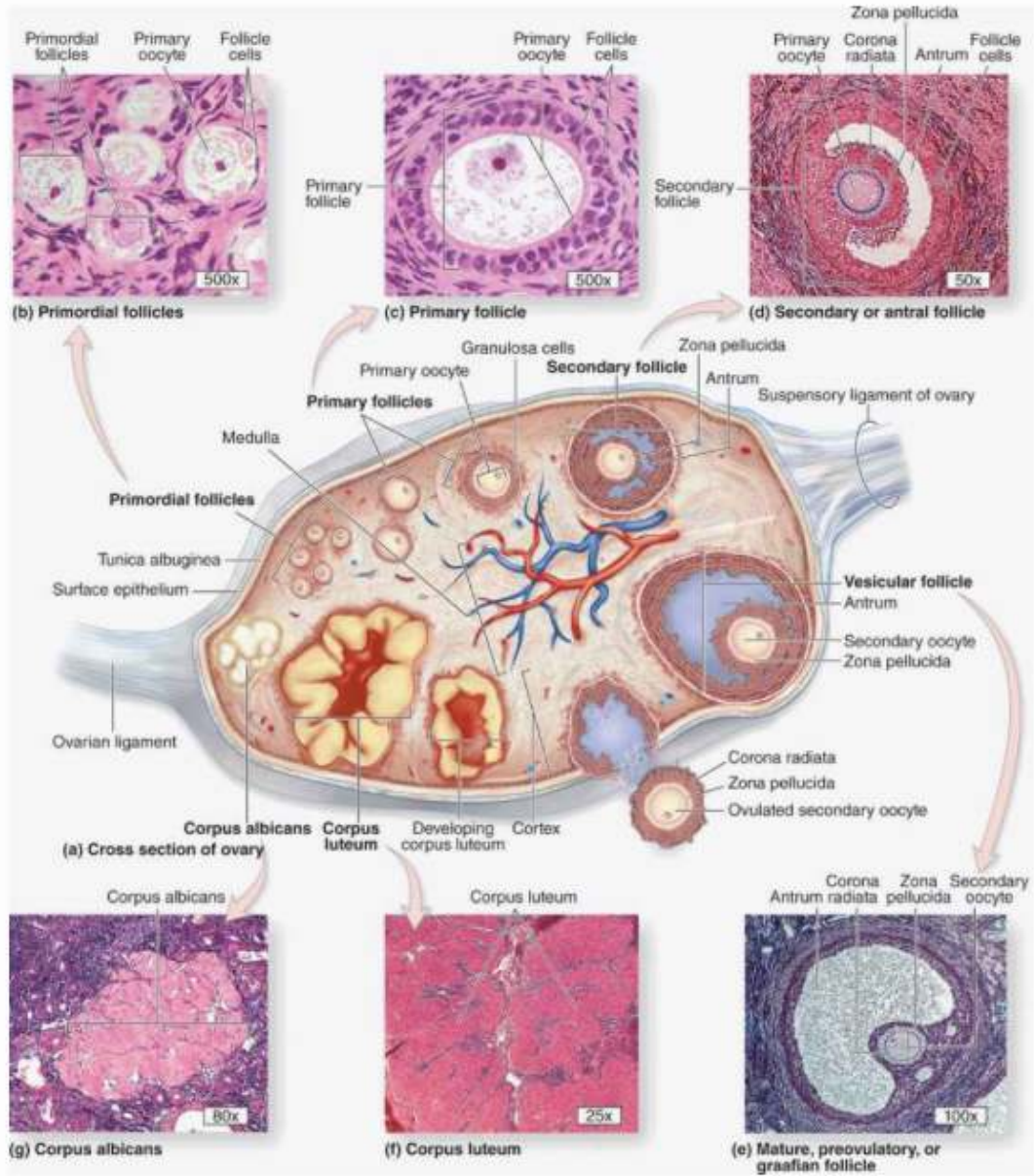
Granüloza hücrelerinin etrafında bulunan stromal hücreler ise teka interna ve teka eksternayı kapsayan bir teka folikülü oluşturacak şekilde yapılanma gösterir. Teka interna, kübik salgı hücrelerinden, fibroblastlardan ve kollajen demetlerinden meydana gelen vaskülarize iç tabakadır (Eroschenko 2013). Teka interna hücreleri sahip oldukları çok sayıda luteinizan hormon (LH) reseptörleri sayesinde LH varlığına yanıt olarak androjenleri üretir. Bu androjenler östrojen prekürsörleridir ve granüloza hücreleri tarafından alınarak östrojene dönüştürülür. Teka eksterna ise, düz kas hücreleri ve kollajen liflerden oluşan ve teka internayı saran dış tabakadır (Kierszenbaum 2006).

Sekonder Foliküller: Sekonder folikül granüloza hücrelerinin aralarında antrum adı verilen sıvı dolu boşlukların oluşması ile karakterizedir. Bu boşluklar likör folikülü adı verilen ve hiyaluronan açısından zengin sıvı ile doludur. Oluşan bu boşluklar gelişim ilerledikçe birleşir ve hilal şeklinde antrum adı verilen tek bir boşluk haline gelir (Kierszenbaum 2006). Sekonder folikül aşamasında granüloza hücrelerinin arasında Call-Exner cisimciği adı verilen hiyaluronan ve proteoglikanlar içeren Periyodik Asit Schiff (PAS) ile pozitif boyanan ekstrasellüler materyaller oluşur. Sekonder folikül büyüdükçe oosit ile ilişkili olan granüloza hücreleri kumulus ooforus adı verilen bir çıkıntı meydana gelir. Oositin hemen etrafını tek sıra şeklinde çeviren ve ovulasyondan sonra oosit ile birlikte atılan kumulus ooforus hücreleri ise korona radiata olarak adlandırılır (Ross ve Pawlina 2014). Sekonder foliküllerin oluşumu FSH bağımlıdır (Gartner ve Hiatt 2016).

Tersiyer (Olgun) Foliküller: Graff folikülü adı da verilen olgun folikülün çapı yaklaşık 10 mm'dir. Sekonder foliküller arasından beş folikül gelişir ve biri ovulasyona giderek FSH bağımlı bir şekilde olgun folikül halini alır ve FSH'dan bağımsız olarak ovulasyon ile atılır (Tablo 1) (Gartner ve Hiatt 2016).

Tablo 1. Ovaryum foliküllerinin gelişme evreleri (Gartner ve Hiatt 2016).

Evre	Zona Pellusida	Granüloza	Folikül Sıvısı	Teka	Hormon Bağımlılığı
Primordiyal Folikül	Mevcut değil	Tek tabakalı yassı hücreler	Mevcut değil	Mevcut değil	Lokal faktörlere bağımlı
Tek Tabakalı Primer Folikül	Mevcut	Tek tabakalı kübik hücreler	Mevcut değil	Mevcut değil	Lokal faktörlere bağımlı
Çok Tabakalı Primer Folikül	Mevcut	Çok tabakalı granüloza hücreleri	Mevcut değil	Mevcut	Lokal faktörlere bağımlı
Sekonder Folikül	Mevcut	Granüloza hücreleri arasında boşluk	Granüloza hücreleri arasında boşlukta birikir	Mevcut	FSH bağımlı
Graff Folikülü	Mevcut	Kumulus ooforus oluşur	Antrumu doldurur	Mevcut	FSH bağımlı



Şekil 4. Folikül gelişimi ve ovaryumda meydana gelen değişiklikler. (a) Ovaryum kesiti, (b) Primordiyal folikül, (c) Primer folikül, (d) Sekonder folikül, (e) Tersiyer folikül veya Graff folikülü, (f) Korpüs luteumdan sonra (g) Korpüs albicans (Mescher 2016).

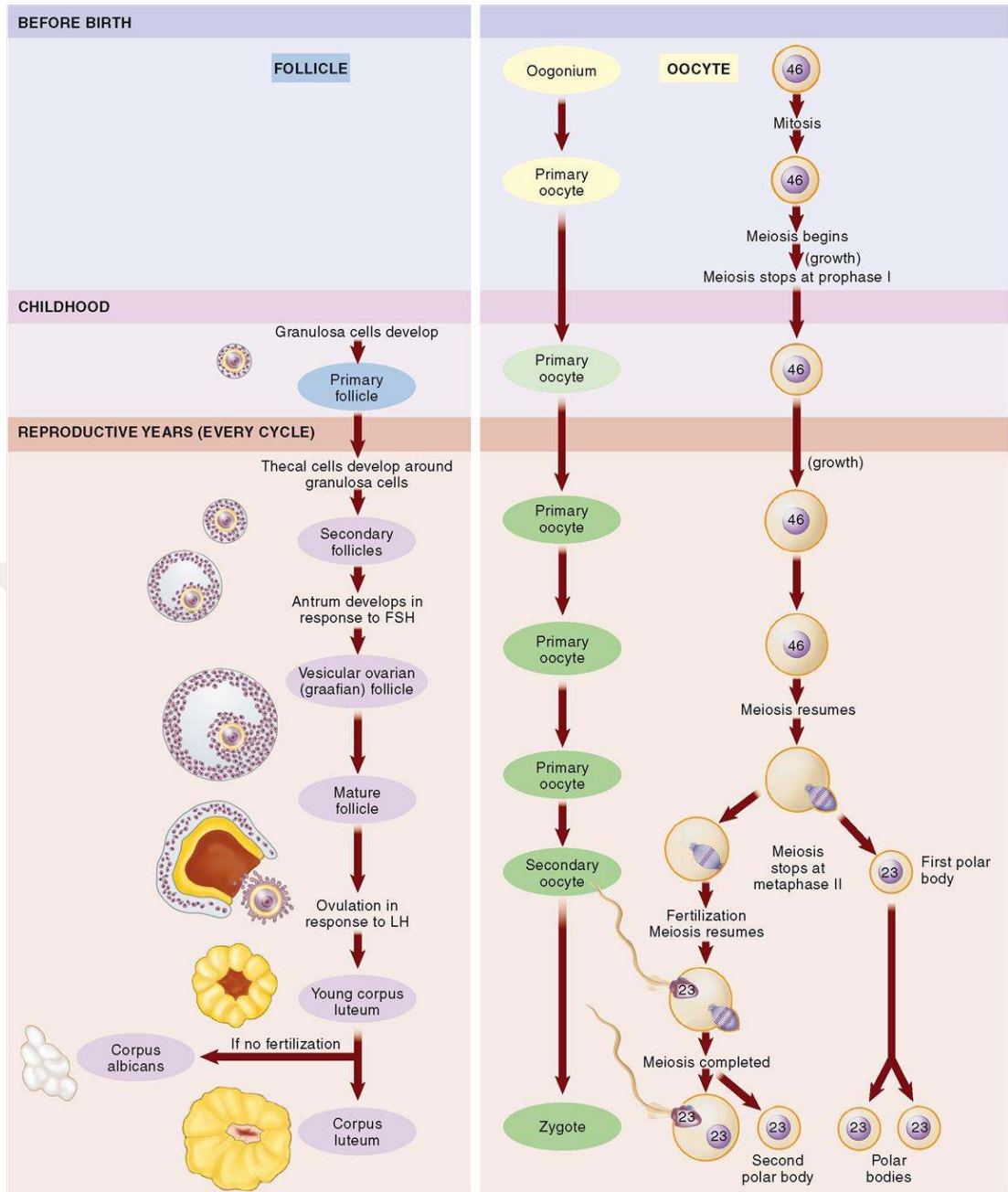
Ovulasyon inhibin hormonu etkisiyle FSH'n baskılanması ile meydana gelir. LH'n ani yükselişi ile sekonder oosit ve korona radyata hücreleri ovaryum yüzeyinden atılır ve fimbrialar tarafından tutularak tuba uterinalar içerisine alınır (Eroschenko 2013). Bu aşamada primer oosit sekonder oosit haline gelir, birinci polar cisimcik oluşur ve ikinci mayozun metafaz evresinde fertilizasyona kadar sürecek ikinci bir tutulma evresine girer. Granüloza hücrelerinden ve teka hücrelerinden kalan yapılar önce korpüs hemorajikum halini alır, daha sonra ise

korpus luteumu oluşturur. Korpus luteum progesteron, östrojen ve androjenleri üreten granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerinden meydana gelir. Fertilizasyon gerçekleşirse gebelik korpus luteumu adını alan yapı progesteron sentezlenmesi ile gebeliğin devamlılığını sağlar. Ovulasyondan sonra fertilizasyon meydana gelmezse oluşan korpus luteumda atrofi başlayarak korpus albikansa dönüşerek geriler ve ovaryumda skar doksu şeklinde kalır (Gartner ve Hiatt 2016).

4.2.2. Oogenez

Dişi gametogenez, oogenez olarak adlandırılır. PGH mitoz ile çoğalıp oogonyumlara farklılaştıktan sonra, oogonyumlar Mayoz I'e giriş yapar ve primer oosit oluşur. Bütün primer oositler fetal dönemin beşinci ayına kadar oluşur ve doğumda hiç oogonyum bulunmaz. Puberteye kadar primer oositler Mayoz I'in profaz evresinde (diploten) kalır. Puberteden sonra, ovaryumdaki oositlerde siklik değişiklikler meydana gelir. Her bir siklusta 5-15 adet primer oosit (primordiyal folikül) gelişmeye başlar ve sadece biri ovulasyon ile atılacak olan olgun (Graff) folikül meydana getirebilecek olgunluğa ulaşabilir (Dudek 2014).

Her siklus boyunca primer oosit, LH etkisi ile Mayoz I'i tamamlayarak iki kardeş hücreye bölünür ve böylece birinci polar cisimcik ile sekonder oosit meydana gelir. Sekonder oosit hemen mayoz bölünmeye başlar ancak Mayoz II'nin metafaz evresinde tekrar tutuklu kalır. Ancak fertilizasyon gerçekleşirse sekonder oosit mayoz II bölünmeyi tamamlar ve ikinci polar cisimcik meydana gelir (Dudek 2014).



Şekil 5. Folikülogenez ve oogenez (<https://basicmedicalkey.com/growth-and-development/#cesec11>, Erişim tarihi: 05 Mart 2019).

4.2.3. Primordiyal Germ Hücreleri

PGH oositlerin ve spermilerin öncü hücreleridir. Epiblast kökenli olan primordiyal germ hücreleri ikinci hafta içinde oluşur ve yolk kesesine göç eder. Dördüncü haftadan itibaren yolk kesesini terkederek gelişmekte olan gonadal bölgelere göç eder. Beşinci haftada gonodal bölgeye göç eden yaklaşık 1000 adet PGH hem göç sırasında hem de gonodal bölgede mitozla sayılarını artırır. Altıncı haftada göç tamamlanmış olur ve sayıları altıncı haftada 10,000, sekizinci haftada 600,000, 20.

haftada ise 6-7 milyona ulaşır. PGH'lerin oluşumu visseral endodermden salgılanan Kemik morfogenetik protein 2 (BMP-2), ekstraembriyonik ektodermden salgılanan BMP-4 ve BMP-8b faktörlerinin etkisi ile gerçekleşir (De Felici 2013).

Embriyonik yaşamın 20. haftasından sonra sayıları hızlıca azalan PGH'leri üçüncü ayın sonunda yassı folikül hücreleri ile çevrelenerek primordiyal folikül karakteri kazanır. Yenidoğanda sayıları 1 milyona düşen PGH'leri pubertede yaklaşık 300,000-400,000 adettir. Reprodüktif yaşamı boyunca bir kadının 400 kadar germ hücresi olgun hale gelebilmekte ve ovulasyon ile atılabilir (Sadler 2011).

4.2.4. Folikülogenez

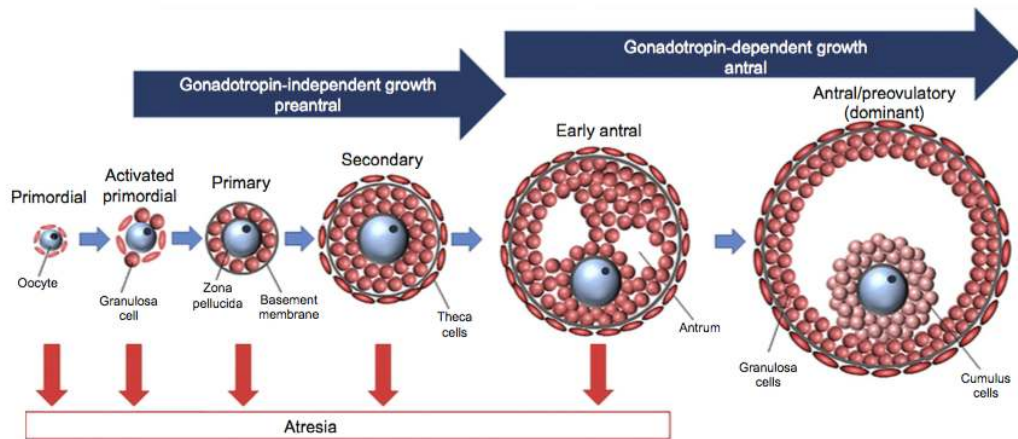
Folikülogenez, primordial folikülden başlayarak primer folikül oluşturma ve sırası ile sekonder ve olgun (ovulasyon öncesine kadar) foliküllerin gelişmesine kadar olan ardışık safhaların ilerlemesi olarak tanımlanır (Oktem ve Oktay 2008). Bununla birlikte, primordial folikül seçiminin gerçekleşmesi ile mayotik olarak olgun ve gelişimini tamamlamış bir oosit üretilmesiyle sonuçlanan süreç de folikülogenez olarak adlandırılır (Tingen ve ark. 2009) (Şekil 6). Folikülogenez ile olgun oosit meydana gelirken, aynı zamanda fertilizasyon ve implantasyon için bir kumulus-oosit kompleksi (KOK) ve progesteron hormonu üretilmesini sağlayarak gebeliğin sürdürülmesi için gerekli olan korpus luteum oluşur (Oktem ve Oktay 2008).

Folikülogenezin ve ovulasyonun moleküler mekanizmaları hakkındaki bilgilerin çoğu, hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar sayesinde oluşturulmuştur. Primordial folikül havuzu veya over rezervi, foliküllerin atreziye uğraması ya da büyüyen folikül havuzuna girmelerinden dolayı yaşla birlikte azalır. Over rezervinden aktive olacak primordial foliküllerin seçimini ve seçilen foliküllerden atılacak folikülün kararının verilmesi üzerine birçok çalışma olmakla birlikte, kontrolü sağlayan mekanizmalar hala tartışmalıdır (Findlay ve ark. 2018).

Primordial foliküllerdeki atrezinin odak noktası oositir ve son araştırmalar genomu koruyan DNA tamir yolağının aksine, özellikle BH3 faktörleri olan intrinsik apoptotik yolları üzerinde durmaktadır (Liew SH ve ark 2014; Findlay J. K ve ark. 2018). Büyüyen foliküllerde ise, atrezinin odak noktası granüloza hücreleridir. Sekonder foliküller seçilerek dominant graaf folikülleri meydana getirir. Ovulasyondan önce FSH'ın hızla azalması graaf foliküllerinin sağ kalımına izin verir.

Ayrıca graff folikülleri, oosit ve foliküler somatik hücrelerde meydana gelen ovulatuvar değişikliklerle birlikte, LH'nin dalgalanmasını tetikleyecek yeterli estradiol-17 β üretebilir. Ayrıca oosit, folikülogenez sırasında özellikle antrum oluşumundan sonra kontrol noktaları sağlayarak seçim süreçlerini de etkiler (Findlay ve ark. 2018).

Primordial foliküllerden oluşan over rezervi, yaşamın erken dönemlerinde oluşmakta ve büyüyen tüm foliküller ile ovulasyonu gerçekleştiren tüm oositler buradan meydana gelir. Bu nedenle, başlangıçta overde oluşan primordiyal foliküllerin sayısı, kadınların fertil yaşam ömrünü büyük ölçüde etkiler. Analiz edilen tüm memeli türlerinde ovulasyon için gerekenden çok daha fazla primordiyal folikül olduğu gözlemlenmiştir. İnsanlarda doğumda yaklaşık 1 milyon primordial folikül bulunur ve bu sayı ergenlikte yaklaşık 300,000'e düşer, menopoza başladığında yaklaşık 1000 adet kalmış durumdadır (Baker 1963; Wallace ve Kelsey 2010; Findlay ve ark. 2018). Ergenlik ile üreme ömrünün sona ermesi arasındaki süre zarfında sadece 400-500 insan oositinin ovulasyonu gerçekleşir. Deneysel verileri ve matematiksel modellemeyi kullanan Tingen ve arkadaşları, genç farelerde (doğum sonrası 6.-19. günler) günde ortalama 155 primordial folikülün atreziye maruz kaldığını bildirmiştir (Tingen ve ark. 2009).



Şekil 6. Memeli folikülogenez, folikül tipleri atrezinin belirtilmesi ve gonadotropin bağımlı aşamalarının şematik gösterimi. (Findlay ve ark. 2018).

Granüloza hücreleri, gap junction'lar aracılığı ile komşu hücrelerle temas halindedir ve herhangi bir vasküler kaynağa sahip değildir. Bu gap junctionlar sadece fonksiyonel bir hücresel sinsityumun oluşmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda

metabolik maddelerin ve çeşitli moleküllerin komşu hücreler arasında taşınması için de önemlidir. Granüloza hücrelerini bağlayan bu gap junctionlar, konneksin 32, 43 ve 45 gibi farklı konneksin molekülleri içerir. Konneksin 43 içermeyen farelerde, çok tabakalı folikül gelişimi gözlenmediği ve folikül büyümesi için konneksin 43 proteininin önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Ackert 2001).

Kemirgen modellerinden ve in vitro deneylerden elde edilen veriler, dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) süper ailesinin belirli üyelerinin foliküllerin gelişim aşamasına bağlı olarak oosit ve ovaryum somatik hücreleri tarafından eksprese edildiğini gösterir. Örneğin, ovaryum stromal hücreleri ve/veya teka hücreleri tarafından eksprese edilen BMP-4 ve BMP-7 primordial folikülden primer foliküle geçişin pozitif düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır. Bunun tam tersi olarak, TGF- β ailesinin başka bir üyesi olan granüloza kökenli anti-müllerian hormonun (AMH) antagonistik etkisi olduğu ve primordial folikülden primer foliküle geçişi engellediği bulunmuştur (Nilsson ve ark. 2011).

Bazı in vitro çalışmalar ile primordial foliküllerin foliküler hücrelerinden c-Kit-ligand (KITL, kök hücre faktörü olarak da bilinir) ve lösemi inhibitör faktörü (LIF) gibi peptid hormonlarının salgılandığı ve bu faktörlerin folikül büyümesini primordiyal aşamadan primer aşamaya geçirdiği, oosit büyümesini desteklediği ve teka hücrelerinin çevresindeki stromada proliferasyona yol açtığı gösterilmiştir. Granüloza hücrelerinden salgılanan KITL primer oosit membranı yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak, oositlerin gelişmesi ve büyümesi için sinyal oluşturur (Jones ve Pepling 2013). Ayrıca, KITL ekspresyonu ile teka hücre kaynaklı fibroblast büyüme faktörü-7 (FGF-7)'nin artışı oosit büyümesini ve teka hücre çoğalmasını daha da arttırılabilir. Benzer şekilde, primordial foliküllerin oositlerinden salınan fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2)'nin, foliküler hücrelerde KITL ekspresyonunu arttırdığı ve primer foliküle geçişi in vitro olarak teşvik ettiği bulunmuştur. Yenidoğan ovaryumunda kodlanan homeobox geni (newborn ovary homeobox-encoding gene, NOBOX) adı verilen ve germ hücrelerinde eksprese edilen bir diğer önemli genin, erken folikülogenez sırasında önemli rol oynadığı gösterilmiş ve NOBOX geni içermeyen farelerde primordial folikülden primer foliküle geçişin bozulduğu bildirilmiştir (Rajkovic ve ark. 2004).

Primer folikülün preantral evreye doğru ilerlemesi menopoz durumuna kadar devam eder. Folikül gelişiminin bu safhasında oosit büyümesi, granüloza

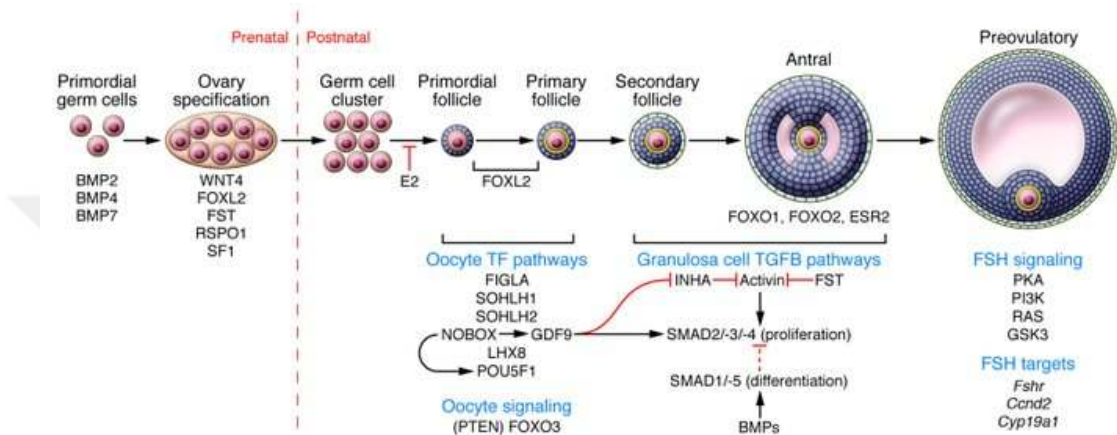
hücrelerinin proliferasyonu ile çok tabakalı bir yapı ve bazal lamina ile teka interna hücre tabakasının oluşumunu meydana getirir. Bu fazda bir folikül çapı 40 μ m'den 120 μ m'ye kadar ulaşır. FSH veya FSH reseptörü yokluğunda da oosit ve foliküllerin gelişebileceğini gösteren kanıtlar olduğu için bu sürecin insanlarda gonadotropin-bağımsız olduğu düşünülür. Ayrıca, FSH'nin yokluğunda sekonder foliküllerin in vitro büyümeyi sürdüremediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, preantral yapıların FSH reseptörlerini ifade ettiği ve over-transplant çalışmaları da dahil olmak üzere birçok deney FSH'in in vivo erken folikül büyümesini indükleyebildiğini göstermiştir. FSH'ın in vitro ve in vivo etkileri arasında gözlemlenen bu tutarsızlığın, in vivo folikül büyümesini ve sağkalımını desteklemek için sinerjistik olarak hareket eden bazı başka faktörlerin varlığı sebebiyle olabileceği düşünülmektedir (Barnes ve ark. 2002).

Primer oosit tarafından üretilen aktivin sayesinde foliküler hücreler çoğalarak granüloza hücrelerini oluştururlar. Ayrıca primer oosit tarafından salgılanan Büyüme ve Farklılaşma Faktörü-9 (GDF-9) ve BMP-15 faktörleri de granüloza hücrelerinin proliferasyonunu sağlar. Primer oositlerin sekonder oositlere dönüşümü için de GDF-9 ve BMP-15 kritik önem taşımaktadır (Dudek 2014).

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, TGF- β ailesindeki bazı üyelerin preantral folikül büyümesini düzenlediği ortaya çıkarmıştır. GDF-9 genindeki homozigot mutasyona sahip farelerde ilk evrede folikül büyümesi duraklamış ve bu oosit kaynaklı büyüme faktörünün folikül büyümesi için önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, doku kültürü çalışmalarında overlerin GDF-9'a maruz bırakılması, insanlarda ve farelerde primer folikül progresyonunu teşvik etmiştir. GDF-9'un, türler arasında uyumlu olan ve büyümeyi teşvik edici etkilerinin tersine, TGF- β ailesinden bir başka oosit kaynaklı faktör olan BMP-15'in folikül büyümesine etkileri türler arasında farklılık gösterir. BMP-15 geninde mutasyona sahip fareler subfertilirdirler ve koyunlarda ise foliküller primordiyal aşamada areste kaldığı bildirilmiştir. Son zamanlarda, BMP-15 geninde bir mutasyon, insanlardaki prematür over yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir (Knight ve ark. 2012).

Folikülogenezi etkileyen faktörlerden biri olan folikülogenez spesifik germline alfa (FIGLA), germ hücresine özgü bir bHLH transkripsiyon faktörüdür. FIGLA susturulmuş farelerde primordiyal foliküller oluşmamaktadır. Bu nedenle ilk folikül oluşumu için FIGLA'nın gerekli olduğu düşünülmektedir (Soyal ve ark. 2000).

Diğer önemli bir transkripsiyon faktörü olan Forkhead box L2 (FOXL2) olmadığında ise farelerde, granüloza hücreleri büyümekte olan oosit çevresinde gelişmemekte ve büyümeyi erken başlatarak atrezi ile sonuçlanmasına sebep olmaktadır (Uda ve ark. 2004). Nörotrofinler (NT) ve bunların tirozin kinaz reseptörleri (NTRK) de folikülogenezde rol oynayan önemli faktörler arasındadır (Kerr ve ark. 2009).



Şekil 7. Farede folikülogenezi kontrol eden moleküller (Richards ve Pangas 2010).

4.3. İNFERTİLİTE

İnfertilite, bir çiftin korunmasız bir yıl cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememelerine denir (Üstün 2015). Dünya sağlık örgütü infertilite teşhisi ve tedavisinde standart bir tanı protokolü kullanarak 8500 infertil çift ile yaptığı çalışma sonucunda gelişmiş ülkelerde infertil durumun %37'sinin kadın kaynaklı, %8'nin erkek kaynaklı, %35'nin her iki cinsten kaynaklandığını tespit etmiştir. Çiftlerin %5'inin tanımlanabilir infertilite nedeni olmadığı (açıklanamayan infertilite) ve çiftlerin %15'inin araştırma sırasında gebe kaldığı bildirilmiştir. En sık tespit edilen dişilerdeki hastalıklar ovulatuvar bozukluklar (%25), açıklanamayan infertilite (%20), endometrioz (%15), pelvik adezyonlar (%12), ovaryan tüplerin tıkanması (%11), diğer tubal anormallikler (%11) ve hiperprolaktinemi (%7) dir.

Toplam 14.141 infertil çiftin katıldığı 21 raporun yayınlandığı bir derlemede, çiftlere konulan primer tanının, %27'si ovulatuvar bozukluklar, %25'i anormal semen parametresi, %22'si tubal defekt, %17'si açıklanamayan nedenler, %5'i,

endometrioz ve %4'ünün diğer nedenler olduğu bildirilmiştir (Collins 1995). Diğer bir çalışmada ise 2198 infertil çift ile yapılmış ve primer tanılarının dağılımı %26 açıklanamayan, %24 anormal semen parametresi, %23 tubal defekt, %18 ovulatuvar bozukluklar, %6 endometrioz ve %3 diğer olarak bildirilmiştir (Smith ve ark. 2003; Barbieri 2019). Bu gözlemler sonucunda gebeliği etkileyen faktörler beş grup altında toplanabilir:

1. Gelişimini tamamlamış oosit üretiminde anormallikler (anovulasyon, oosit havuzunun tükenmesi veya düşük oosit fonksiyonu / kalitesi)
2. Sperm, oosit ve embriyonun (tubal, uterin, servikal ve peritoneal faktörler) üreme sistemi kanalı boyunca taşınmasındaki anormallikler
3. İmplantasyon sürecindeki anormallikler, embriyo gelişiminde erken kusurlar ve embriyo-endometriyal etkileşim bozuklukları (embriyo-endometriyal faktörler)
4. Sperm üretimindeki anormallikler (erkek faktörü)
5. Sürecin birden fazla bileşenini etkileyebilen immünolojik faktörler de dahil olmak üzere diğer koşullar (Barbieri 2019).

4.3.1. Kadına Ait İnfertilite Problemleri

İnfertilite, kadınların yaklaşık %13'ünü ve erkeklerin %10'unu etkiler. Kadın infertilitesinin başlıca nedenleri anovulasyon, PKOS, tubal faktörler, endometrioz, uterin faktörler ve açıklanamayan infertilitedir. Ayrıca çevresel faktörler, yaş ve kilo değişiklikleri de kadınlarda diğer infertilite nedenlerindendir (Eniola ve ark 2012). Anovulatuvar kadınlarda gebe kalabilmeyi arttıran müdahaleler, ağırlığın optimizasyonu, polikistik over sendromlu kadınlar için letrozol veya klomifen ovulasyon indüksiyonu, fonksiyonel hipotalamik amenorlu kadınlar için gonadotropin enjeksiyonu veya pulsatil gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) tedavisini kapsamaktadır. Distal tubal hastalığı olan kadınlar için, etkili tedaviler in vitro fertilizasyon (IVF) veya laparoskopik tubal ameliyatı içerir. Açıklanamayan infertiliteye sahip çiftler için, klomifen ile intrauterin inseminasyon (IUI), gonadotropin ile IUI ve IVF etkili tedavilerdir (Barbieri 2019).

Anovulatuvar infertiliteye pek çok hastalık neden olabilir. Yetişkinlerde görülen en yaygın nedenler hipotalamik disfonksiyon (vakaların %35'i), pitüiter hastalık (%15) ve ovaryan disfonksiyondur (Reindollar ve ark. 1986; Laufer ve ark. 1995). Hipotalamik disfonksiyonun en yaygın nedenleri, ağırlık ve vücut kompozisyonu,

stres ve yorucu egzersizdeki anormalliklerdir. Hipotalamik disfonksiyonun daha az yaygın nedenleri, lenfoma ve histiyositoz gibi hastalıklardır. Anovulasyona neden olan hipofiz bozuklukları prolaktinoma, boş sella sendromu, Sheehan sendromu, Cushing hastalığı, akromegali ve diğer hipofiz tümörleridir. En yaygın ovaryan anovulasyon nedenleri ovaryan yetmezlik (oosit havuzunun tükenmesi) ve ovaryan hiper-androjenizmidir (örneğin, polikistik over sendromu). Bazen, tiroid hastalığı anovulasyon ile ilişkilendirilebilir (Barbieri 2019).

PKOS, kadına ait infertilite sebeplerinin %5-10'unu oluşturur. Foliküller 2-9 mm çapa ulaştıktan sonra hormonal bozukluklar nedeniyle daha fazla gelişemez ve ovulasyon gerçekleşemez. Ovulasyonun yarım kalmasıyla sayıları değişen ancak genellikle 10-12 adet kistik yapıda folikül overlerin yüzeye yakın kenarı boyunca dizilerek, ultrasonda tipik görünümü oluşturmaktadır. PKOS özellikle ovulatuar disfonksiyona neden olduğundan dolayı infertilite meydana gelen ve bunun sonucunda tedaviye gerek duyulan en önemli infertilite hastalıklardan biridir. Üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkilemektedir (Apridonidze ve ark. 2005; Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. 2008). PKOS'un kadınlarda ovaryan kalite ve fonksiyonu etkilediği, endokrin ve jinekolojik anomalilere neden olarak fertilitiyi azaltır (Hart ve Doherty. 2015). Ovulasyonun yarım kalmasıyla milimetrik çaplarda kistik yapıda foliküller gelişir. Folikül gelişimi overlerin dış yüzeyine yakın kısmında olduğundan, gelişemeyen ama tamamen de kaybolmayan, foliküller overlerin yüzeye yakın kenarı boyunca dizilerek, ultrasonda tipik görünümü oluşturur. PKOS'tan dolayı fazla sayıda oosit gelişmesi oositlerin kalitesinin azalmasına neden olmaktadır. In vitro fertilizasyon tedavisi ile PKOS'lu hastalarda oosit sayısında artış olmasına rağmen fertilizasyon, yarıklanma ve implantasyon oranları düşük oosit kalitesi ve bu oositlerden embriyo elde edilmesinden dolayıdır (Huang ve ark. 2015).

İnfertilitede tubal (ektopik) ve peritoneal önem taşıyan faktörler arasında endometrioz (Tomasetti ve ark. 2006), pelvik adezyonlar, genellikle chlamidia (Güven ve ark. 2006) nedeniyle oluşan pelvik inflamatuvar hastalıklar, tubal tıkanma (Garcia-Ulloa ve ark. 2005) ve tubal disfonksiyon bulunur (Eniola ve ark 2012).

Endometrioz, endometriumun, batin içinde başka dokulara yerleşmesine denir ve kadınların yaklaşık yüzde 10'unu etkiler. Bu doku ovaryum, uterus, periton,

bağırsaklar, idrar kesesinde bulunabildiği gibi vajinada da bulunabilir (Eniola ve ark 2012).

Uterin faktörler arasında anormal uterin şekli ve intrauterin septum gibi uterus malformasyonu (Raga ve ark. 1997); polipler, leiomyom ve Asherman sendromu bulunur (Magos 2002). Uterustaki benign fibroid, 30'lu yaşlarda kadınlarda oldukça yaygındır. Büyük fibroidler uterusun bozulmasına, fallop tüpünün tıkanmasına, uterus boşluğunun şeklinin bozulmasına veya serviksin pozisyonunun değiştirilmesine neden olarak infertiliteye neden olabilir (Eniola ve ark 2012).

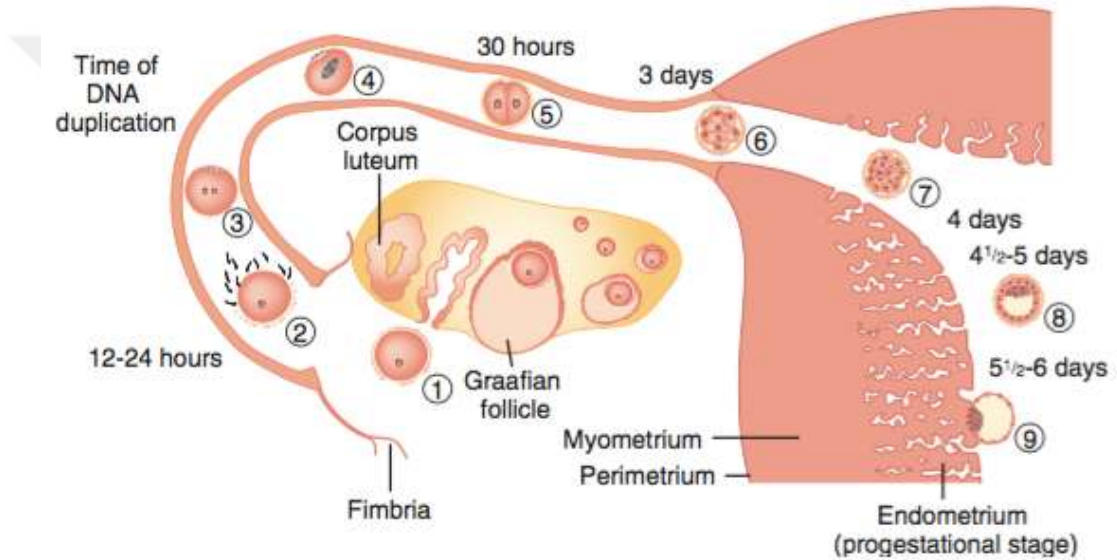
Çevresel faktörlerin infertilitedeki etiyolojik önemi vurgulanmıştır (Hruska ve ark. 2000). Tutkallar, uçucu organik çözücüler veya silikonlar, fiziksel ajanlar, kimyasal tozlar ve böcek ilaçları gibi toksinler infertilitede rol oynar (Mendiola ve ark. 2008). Klorlu hidrokarbonlar ve fümisitler gibi potansiyel olarak zararlı diğer mesleki maruziyetler de kadınlarda kendiliğinden düşüklerin artması ile ilişkilidir (Hruska ve ark. 2000). Dolayısıyla, bu tür kimyasal maddelere doğrudan temas eden veya bunlara maruz kalan bireyler, olabileceği gibi primer veya sekonder infertiliteye sahip olma şansı yüksektir. Ftalatlar gibi östrojen benzeri hormonu bozan kimyasallar, kadınların bebekleri üzerindeki etkileri için özellikle önemlidir (Eniola ve ark 2012).

Over disfonksiyonuna kilo kaybı ve vücut kitle indeksi (VKİ) 27 kg/m^2 'den daha fazla olanlarda aşırı kilo alımı neden olabilir (Imani ve ark. 1998). Aşırı kilonun da tedavi etkinliği ve yardımcı üreme tekniğinin sonuçları üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Freundl ve ark. 2003). Östrojen, yağ hücreleri ve primer cinsiyet organları tarafından üretilir (Nelson ve Bulun 2001) ve bu nedenle, yüksek vücut yağı veya obezite durumu, östrojen üretiminde artışa neden olur. Ayrıca, çok az vücut yağı yetersiz östrojen üretimine ve dolayısıyla da anovulasyon döngüsünde adet düzensizliklerine neden olur. Erken yaşlarda doğru beslenme, daha sonra doğurganlık için majör bir faktör olarak ilişkilendirilir (Sloboda ve ark. 2011; Eniola ve ark 2012).

Doğurganlık yaşla birlikte düşer. Kadınların doğurganlığı 18-24 yaşları arasında en yüksek noktadır, 27 yaşından sonra düşmeye başlar ve 35 yaşından sonra biraz daha yüksek oranda düşer. Over rezervi açısından, tipik bir kadın 30 yaşındayken rezervinin %12'sine ve 40 yaşında sadece %3'üne sahiptir. Over rezervindeki değişimin %81'i yalnız yaştan kaynaklanır (Wallace ve Kelsey 2010), bu da

kadınlarda infertilitede en önemli faktördür. Ovulatuvar disfonksiyon, genç çiftlerde yaşı çiftlerden daha çok yaygındır (Eniola ve ark 2012).

Gebelik, endometriyumda embriyonun implantasyonuna izin veren hem erkek hem de kadınlarda bir dizi kompleks fizyolojik olayların başarılı bir şekilde tamamlanmasının sonucudur. Gebeliğin gerçekleşmesi için gelişimini tamamlamış ve ovulasyonu gerçekleştiren oositin, kapasitasyonunu tamamlamış spermin üreme kanalında birleşerek, embriyonun uterus boşluğuna taşınması ve endometriyuma başarılı bir şekilde implante olması gerekir (Barbieri 2019).



Şekil 8. Dişi üreme kanalında oosit, sperm ve embriyonun taşınmasının şematik gösterimi (Strauss ve ark. 2019).

4.4. POLİKİSTİK OVER SENDROMU

4.4.1. Tanımı ve Tarihçesi

Polikistik over sendromunun (PKOS) ilk tanımı, 1844 yılında düzgün bir kapsül ile çevresi genişlemiş ovaryumların varlığı olarak bildirilmiştir (Chereau 1844). Bu bulgulara ilaveten 1897 yılında hipertekozla birlikte gözlemlendiği bildirilmiştir (Bulius ve Kretchmar 1897; Chang ve Dumesic 2019). Daha sonra ise gebe kadınların idrarından elde edilen gonadotropik ekstraktın çoklu ovaryum kist oluşumlarını indükleyebildiği gösterilerek PKOS tekrar gündeme gelmiştir (Zondek ve Ascheim

1926; Chang ve Dumesic 2019). Fakat sendrom olarak tanımlanması 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından amenore, hirsutizm ve çoklu kistleri olan büyük overlere sahip yedi kadında gözlemlendikten sonra gerçekleşmiştir (Stein ve Leventhal 1935). Günümüzde ise PKOS, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) verilerine göre üreme çağındaki kadınların %6 ile %10'unu, Rotterdam kriterleri uygulandığında ise %15'ini etkileyen, en yaygın görülen endokrin sistem hastalıklarından biri olarak tanımlanmaktadır (Azziz ve ark. 2004).

4.4.2. PKOS'un Tanı Kriterleri

Dünya'da, PKOS tanısı konulması için üç büyük temel tanı grubu arasından seçim yapılır (Tablo 2). Tanı kriterleri ilk olarak 1990 yılında Amerika'da Maryland, Bethesda'daki Ulusal Sağlık Enstitülerinde (NIH) özetlenmiştir ancak Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) ve Amerikan Üreme Sağlığı Kurumu (ASRM) tarafından desteklenen ve 2003 yılında Rotterdam'da gerçekleştirilen bir çalışma sonrasında Rotterdam kriterleri adı verilen kriterler belirlenmiştir. 2009 yılında Androjen Fazlalığı ve Polikistik Over Sendromu (AE-PKOS) Topluluğu kendi kriterlerini belirlemiştir. Araştırmacılar tarafından kullanılan çeşitli tanı kriterlerindeki hassas heterojenliklerin belirli bir popülasyonda bildirilen PKOS prevalansını etkilediğinin bilinmesi önemlidir.

Tablo 2. Polikistik Over Sendromunun tanı kriterleri

1990 Ulusal Sağlık Enstitüsü Kriterleri
1. Hiperandrojenizm ve/veya hiperandrojenemi
2. Oligo-anovulasyon
Revize edilmiş 2003 Roterdam Kriterleri
1. Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm
2. Oligo-anovulasyon
3. Polikistik overler
Androjen Fazlalığı ve Polikistik Over Sendromu (AE-PCOS) Topluluğu Kriterleri
1. Hiperandrojenizm (klinik be/veya biyokimyasal)
2. Ovaryan disfonksiyon (oligo-anovulasyon ve/veya polikistik overler)

1990 yılındaki Ulusal Sağlık Enstitülerinde belirlenen PKOS tanısı için gerekli kriterler şunlardan oluşmaktadır:

- i) kronik anovulasyon,

- ii) hiperandrojenizmin klinik veya biyokimyasal belirtileri. Kullanılan bu iki kriter analitik çalışmaların sonuçları yerine, katılımcıların uzman görüşüne dayanır (Zawadski ve Dunaif 1992) ve PKOS tanısı konulması için konjenital adrenal hiperplazi, Cushing sendromu, tiroid disfonksiyonu, hiperprolaktinemi, androjen üreten tümörler ve ilaca bağlı androjen fazlalığı dahil diğer endokrinopatilerin dışlanması gerekir.

Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) ve Amerikan Üreme Sağlığı Kurumu (ASRM) tarafından desteklenen ve 2003 yılında Rotterdam'da yenilenen kriterler ile PKOS tanısı konulması için şu belirtiler olmalıdır : i) oligo-anovulasyon, ii) klinik ya da biyokimyasal hiperandrojenizm, iii) Ultrason ile görüntülenen polikistik overler ve daha önceki tanıların dışlanması gerekir (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004). Rotterdam kriterlerine göre kadınlarda, polikistik ovaryumlar, ultrasonda 2-9 mm çapında, ovaryum başına 12'den fazla folikül varlığı ile tanımlanır (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004).

1990'da yayınlanan kriterlere polikistik overlerin morfolojik görünümünün eklenmesi, daha önce tanısında bulunmayan iki ek fenotipi tanımlar:

- i) hiperandrojenizmi olmayan fakat polikistik overleri olanlar,
- ii) ovulatuvar işlev bozukluğu olan, hiperandrojenizmi ve polikistik overleri bulunan ovulatuvar kadınlar.

Rotterdam tanı kriterlerine dayanılarak tanımlanan PKOS içindeki bu alt kategoriler, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) kriterlerine dayanılarak tanımlanan PKOS vakalarıyla kıyaslandığında, farklı hormonal ve metabolik özellikler gösterir. PKOS'u farklı fenotiplere göre kategorize etmenin önemi, NIH kriterlerine göre belirlenen PKOS'lu kadınların sırasıyla menstrüel disfonksiyon, anovulatuvar infertilite, tip 2 diabetes ve metabolik sendrom dahil olmak üzere üreme ve metabolik anormallikler geliştirme riski altında olmasıdır. Buna karşılık, Rotterdam ve AE-PCOS kriterlerine göre tanı alan ovulatuvar PKOS hastaları, NIH tanı PKOS'lu kadınlara göre daha düşük derecelerde hiperinsülinemi ve hiperandrojenizm ile daha düşük vücut kitle indeksine sahiptir (Chang ve ark. 2000; Carmina ve ark. 2005; Welt ve ark. 2006; Chang ve Dumesic 2019).

En yeni tanı kriterleri AE-PKOS topluluğu tarafından 2009'da derlenmiştir (Azziz ve ark. 2009). Menstrüel disfonksiyon, hiperandrojenemi, hiperandrojenizmin klinik bulguları ve polikistik over morfolojisi gibi PKOS'un önemli kabul gören özellikleri yeniden incelenmiştir. Her özellik, mevcut literatürün kapsamlı bir incelemesine dayanılarak, tanımlayıcı bir kriter olarak dahil edilmeye uygunluğu açısından incelenmiştir. PKOS tanısı için;

- i) hirsutizm ve/veya hiperandrojenemi de dahil olmak üzere hiperandrojenizm,
- ii) oligo-anovulasyon ve/veya polikistik görünen overler de dahil olmak üzere ovaryan disfonksiyon ve
- iii) androjen fazlalığı veya ilişkili hastalıkların dışlanması kriterleri belirlenmiştir (Azziz ve ark. 2009).

AE-PKOS kriterleri aynı zamanda hiperandrojenizm ile ilişkili hastalıkların dışlanması gerektiğini kabul etmekle birlikte, klinisyenin hangi testlerin verileceğine karar verirken bu farklı tanıların yaygınlığını dikkate almasına izin verir. PKOS ayırıcı tanısı yapılırken; androjen yüksekliği ve anovulasyon ile birlikte olan klinik durumlar, hipotiroidi, hiperprolaktinemi, konjenital adrenal hiperplazi, androjen salgılayan tümörler, Cushing sendromu göz önünde bulundurulur (Azziz ve ark. 2009). Ayrıca, PKOS tanısı koyabilmek için benzer kliniğe neden olabilecek hastalıkların ekarte edilmesi gerekir (Michlemore ve ark 1999). NIH kriterlerine benzer şekilde androjen fazlalığı, AES kriterlerine göre tanıda gerekli bir bileşendir. Bu nedenle, ovulasyon bozukluğu ve yalnızca PKOS'un fenotipi AES kriterlerine göre sendromun teşhisine uygun değildir. PKOS'u tanımlamak için AES konsensüs kriterleri ise NIH versiyonundan daha kapsayıcıdır ancak Rotterdam kriterlerinden daha az kapsayıcıdır (Azziz ve ark. 2009).

PKOS'un ayırıcı tanısı, çok fazla hastalık fenotipi taklit ettiği için oldukça fazladır. Ayırıcı tanıları anlamak ve tanıları koymadan önce bunların dışlanmasını sağlamak önemlidir (Tablo 3). PKOS'un uygun tanısına yardımcı olmak için ayrıntılı bir öykü ve fiziksel muayene yapılması şarttır.

Tablo 3. PKOS'un klinik ayırıcı tanısında dikkat edilmesi gereken diğer hastalıklar.

-
1. Hipotiroidi
 2. Hiperprolaktinemi
 3. Konjenital Adrenal Hiperplazi
-

4. Androjen salgılayan tümörler
5. Cushing sendromu
6. Diğer nedenler

Dehidroepiandrostenodion sülfat ve DHEA düzeyleri androjen salgılayan tümörlerde çok yüksektir. Konjenital adrenal hiperplazi ile ayırıcı tanı periferik kanda 17-hidroksi progesteron (17-OHP) düzeylerinin yüksekliğinin gösterilmesi ile yapılabilir. Hiperprolaktinemi, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) pulsasyonlarını değiştirerek gonadotropin salgısını etkiler. Östrojenin LH üzerine olan “pozitif feedback” etkisini engeller, adrenal kaynaklı androjenlerin salgısını uyarır. PKOS ile ayırıcı tanıda prolaktin (PRL) düzeyleri de önemlidir. PKOS’da %3-12 oranında orta düzeyde PRL yüksekliği görülür. Cushing sendromu, devamlı olarak kortizol sekresyonu fazlalığıdır. Tanıda bazal şartlarda en faydalı ölçümler 24 saatlik idrarda kortizol miktarı (10-90 µg/24 saat) ve gece plazma kortizol düzeyidir (<15 µg/dL) (Leon ve ark. 2005).

4.4.3. Epidemiyolojisi

PKOS, kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur ve tipik olarak reproduktif dönemin ilk yıllarında tanımlanır. Klinik tablo değişir ancak genellikle oligo-ovulasyon veya anovulasyon, hiper-androjenizm (klinik veya biyokimyasal) ve polikistik overlerin varlığı bulunur (Michelmore ve ark. 1999). NIH’e göre %6 ile %10 arasında ve yaygın Rotterdam kriterleri uygulandığında ise %15’lik bir prevalans ile görülür (Michelmore ve ark. 1999). 248 Aborjin ve/veya Torres Boğazı Adalısında PKOS prevalansı Rotterdam tarafından tanımlandığında %20.9 ve NIH kriterlerine göre tanımlandığında %15.3 olduğu bildirilmiştir (Boyle ve ark. 2012). Türkiye’de 400 kadın üzerinde yapılan çalışmada NIH kriterlerine göre %6.1, Rotterdam kriterlerine göre %19.9 ve AES kriterlerine göre %15.3 oranında PKOS görülme sıklığına rastlanılır (Yıldız ve ark. 2012). Rotterdam Konsensüs Konferansı ve AE-PKOS Derneği tarafından ultrasonografi ile ovaryum morfolojisini içerecek daha sonra genişletilmiş kriterlerin getirilmesi, bu hastalığın yaygınlığını artırır. Rotterdam kriterlerine benzer şekilde, AE-PKOS Derneği tarafından oluşturulan PKOS için tanısal kriterler, Türk kadınlarında da %15,3 oranında artmış prevalans gösterir (Yıldız ve ark. 2012).

Hirsutizm olmadığında, anovulasyonu olan kadınların yüksek oranda hiperandrojenemi olduğu ve PKOS tanısı aldığı görülür. Oligomenore ile başvuran 87 kadında, amenore olanların %87'sinde yüksek miktarda dolaşımdaki testosteron (T) görülürken, %32'sinin hiperandrojenik olduğu belirtilmiştir (Franks 1989).

4.5. DENEYSEL PKOS MODELİ

PKOS modelleri; androjenlere, östrojenlere, antiprogesterinlere veya ışığa kronik maruz bırakma ya da genetik manipülasyonlar gibi bir dizi yöntem kullanılarak oluşturulur (Walters ve ark. 2012; Walters 2015; Walters ve ark. 2018). Bununla birlikte, hiperandrojenizm indüklenmesi ile oluşturulan hayvan modellerinin çoğu üreme, endokrin ve metabolik PKOS özelliklerini gösterir. PKOS hayvan modellerinin çoğunun, androjen fazlalığının uyarılmasıyla oluşturulmasının nedeni, PKOS'un gelişiminde ve ilerlemesinde kilit rol oynayan elemanın androjen olduğu gösterildiği içindir (Walters ve ark. 2012, Padmanabhan ve Veiga-Lopez 2013, Abbott ve ark 2013). Kontrollerle karşılaştırıldığında, PKOS hastalarında sürekli olarak çeşitli androjenler (testosteron (T) ve androstenedion (A4), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi pro-androjenler) serum seviyelerinde bir artış sergiler (Keefe ve ark. 2014). Klinik olarak androjenler, PKOS ovaryum fenotipinin gelişimine doğrudan dahil edilir. Büyümüş, çoklu kistik yapılara sahip ve teka interstisyel hiperplazi gibi belirgin arreste olmuş foliküller gelişim özellikleri gösteren ovaryan PKOS, konjenital adrenal hiperplazi de endojen adrenal androjen hipersekresyonu uygulanan (Lucis ve ark. 1966, Hague ve ark 1990) ve kadından erkek olan transseksüellerde ekzojen testosteron uygulaması nedeniyle yüksek androjen seviyelerine maruz kalan hastalarda bildirilmiştir (Spinder ve ark 1989, Pache ve ark. 1993). Androjenler etkilerini, androjen reseptörü (AR) aracılığıyla gösterir ve bazı PKOS hastalarında AR antagonisti flutamid kullanımı ile menstrüel düzensizliği ve ovulasyonu tedavi eder (Rittmaster 1999, Paradisi 2013). Bugüne kadar PKOS modeli kemirgen, koyun ve primatlarda oluşturulmuştur (Tablo 4) (Walters ve ark. 2012; Padmanabhan ve Veiga-Lopez 2013; Abbott ve ark. 2013). Özellikle PKOS'un kemirgen modelleri, kullanım kolaylığı ve satın alınabilirliği, kısa üreme ömrü ve patojenik mekanizmaların mekanik çalışmalarına izin veren

kararlı genetik yatkınlıkları nedeniyle PKOS'un patogenezinine önemli bilgiler sağlar (Walters ve ark. 2018).

Memeli üremesinin hipotalamo-hipofiz gonadal düzenlemesinin evrimsel açıdan yüksek derecede korunmuş olması, insanlar ve kemirgenler arasında paralelliklerin çizilmesine izin verir (Tablo 5). Bununla birlikte, PKOS gibi insanda görülen hastalıkların kemirgen modellerini yorumlarken bazı fizyolojik farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. İnsanlardan farklı olarak, kemirgenler polioovulatuvardır ve insanlar doğumdan önce tüm yumurtalık foliküllerinin oluşumunu tamamlarken, farelerde bu ilk yenidoğan döneminde gerçekleşir (Bristol-Gould ve ark. 2006). İnsan üreme biyolojisi ve doğurganlığına daha çok benzeyen türlerden bir diğeri koyunlardır. Koyunlar, monoovulatuvardır ve doğumdan önce ovaryan foliküllerin tamamının oluşumunu tamamlar. İnsan olmayan primatlarda hem anatomik hem de fizyolojik olarak insanlara olan benzerliklerinden dolayı bilimsel araştırmalar için ideal modeldir. Diğer memelilerin aksine insan olmayan primatlar, insanlara benzer adet döngüleri yaşar ve Rhesus maymununda doğal olarak hiperandrojenizm tanımlanmıştır (Abbott ve ark. 2017; Walters ve ark. 2018). Bugüne kadar, en yaygın kullanılan hayvan modelleri olan koyunlar ve Rhesus maymunlarında, PKOS'un farklı fenotiplerini indüklemek için, doğum öncesi, doğum sonrası ya da erişkin dönemlerinin farklı gelişim evrelerinde steroid indüksiyonu ile oluşturulurken (Shi ve Vine 2012), kemirgenlerde ise genetik manipülasyon ile oluşturulur (Caldwell ve ark. 2015; Abbott 2017; Caldwell ve ark. 2018; Walters ve ark. 2018). Bunlar, androjenlerle indüklenen PKOS modelleri hiperinsülinemi ve/veya insülin direnci ile ilişkilidir (Shi ve Vine 2012).

PKOS'un ana nedeni androjenlerin fazlalığıdır. Yapılan çalışmalarda androjenlerle indüklemeye PKOS modelinin oluşturulmasında en çok kullanılan yöntemdir. PKOS'nun klinik semptomları sıklıkla ergenlik döneminde başladığından, puberteden önce farelere uygulama yapılması insanlarda görülen PKOS'a daha fazla benzerdir (Frank S 2002; van Houten ve Visser 2014). Farelerde PKOS modelinin oluşturulmasında kullanılan, testosteron (T), dihidrotestosteron (DHT), östrojen (E2) ve dihidroepiandrosteron (DHEA) androjenler iken, Letrozol nonsteroidal aromataz inhibitörüdür. Kaufmann ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 4 haftalık dişi farelere günlük 50 μ g salınım yapan letrozol pelletleri subkutan yerleştirilerek model oluşturulmuştur. Modelin oluşumunu değerlendirmek için östrus siklusuna,

serumdaki LH, FSH, T ve E2 hormonlarına ve histolojik olarak ovaryum dokularına bakılmıştır. Ayrıca farelere Glukoz Tolerans Testi (GTT) uygulanmıştır (Kaufmann ve ark. 2015). Bir başka çalışmada, Kaufmann ve arkadaşlarından farklı olarak serumda T ve 17β östrodiol seviyelerine ve vücut ağırlıklarına da bakılmıştır (Kelly ve ark. 2016). Yaba ve Demir yaptıkları çalışma da 25 günlük dişi farelere 6 mg/100g olacak dozda subkutan DHEA enjeksiyonu gerçekleştirmiştir. PKOS'u değerlendirmek için serumda 17β östrodiol ve progesteron seviyeleri ve histolojik olarak ovaryum dokusuna incelenmiştir (Yaba ve Demir 2012). Bizim çalışmamızda GTT, vücut ağırlığı ve histolojik olarak ovaryum incelenmesi ile PKOS fare modeli değerlendirildi.

Tablo 4. PKOS hayvan modellerinin endokrin hormon profilleri.

Türler	Yöntem	Hormon					
		T	E2	P	LH	FSH	PLR
Sıçan	-DHEA	↑	↑	↑	↑/=	↑/=	↑
	-TP	↑	↓	↓	↑	↓	↑
	-DHT	=	=	↓	-	-	-
	-PA	=	=	=	=	=	-
	EV	↓	↓	↑	↓	↓	-
	RU486	↑	↑	↓	↑	↓	↑
	Letrozol	↑	↓	↓	↑	↑	-
	Sabit Işık	↓/=	↑	↓	=	↓	-
	JCR:LA-cp	↑	=	-	-	-	-
Rhesus	Doğum sonrası						
Maymunu	TP uygulaması						
	Erken uygulama	↓ =	=	=	↑	=	-
	Geç uygulama	=	=	=	=	=	-
Koyun	Doğum öncesi						-
	TP uygulaması	=	=	↓	↑	=	

PA= Prenatal androjenize edilmiş; ↑=artmış; ↓=azalmış; ==değişiklik yok; -=bildirilmemiş

Tablo 5. Androgen ile indüklenen PKOS fare modelleri ve insan PKOS ile paylaşılan özellikleri (van Houten ve Visser 2014).

Uygulama	Uygulamanın zamanı	Ovaryan Fenotip	Hormon seviyeleri	Metabolik fenotip
DHT	Doğum öncesi	-Bozulmuş östrus siklusu -Daha az sayıda korpus luteum -Küçük antral folikül sayısı ↑ -İnce granüloza tabakası -İncelmiş teka hücre tabakası	LH ↑ T ↑ GnRH aktivitesi ↑	-Visseral adiposit boyutu ↑ -Açlık şekeri ↑ -Glukoz intoleransı
DHT	Puberte öncesi	-Anöstrusun devam etmesi -Korpus luteumun olmaması -Atretik folikül sayısı ↑	Leptin ↑ Adiponektin ↓	Vücut ağırlığı ↑ Adipozite ↑ Adipositlerin boyutu ↑ Glukoz intoleransı
Testosteron	Yenidoğan	-Anovulasyon -Polifoliküler overler	belirlenmemiş	belirlenmemiş
Testosteron propionat	Yenidoğan	-Kist benzeri foliküller -Korpus Luteumun olmaması	belirlenmemiş	belirlenmemiş
DHEA	Puberte öncesi	-İnferitlite -Atretik folikül sayısı	belirlenmemiş	Vücut ağırlığı ↑ İnsülin ↑ Glukoz ↑
Östradiol	Yenidoğan	-Kist benzeri foliküller -Korpus Luteumun olmaması	belirlenmemiş	belirlenmemiş

PKOS'lu kadınlarda gözlenenler ile androjen indüklenmesi ile PKOS fare modellerinde gözlenen üreme ve metabolik özellikleri. DHT: dihidrotestosteron; DHEA: dehidroepiandrosteron; T: testosteron; LH: luteinize edici hormon; GnRH: gonadotropin salgılayan hormon; ↑: artış; ↓: azalma.

4.6. OOSİT MATURASYONU

Oosit maturasyonu, olgun bir oositin fertilizasyona hazır hale gelme sürecidir ve GV safhasından metafaz II'ye kadar meydana gelen olayları içermektedir. Oosit maturasyonu nükleer ve sitoplazmik maturasyon olarak iki kısımda incelenir. Her iki

süreç birbirinden ayrı değerlendirilmesine rağmen birbirlerine bağlıdır ve nükleer maturasyon sitoplazmik maturasyon tarafından kontrol edilir. Düzgün bir nükleer ve sitoplazmik maturasyonun ürünü kaliteli bir oositir (Conti 2013).

Dişi germ hücresinin mayozu fetal hayatta başlar, ovulasyonda mayoz I tamamlanıp, mayoz II de arreste olan oositin atılmasından sonra fertilizasyon ile II. Mayozda tamamlanır (Gosden ve Lee 2010). Oosit olgunlaşması, pek çok faktör tarafından kontrol edilen karmaşık ve senkronize bir süreçtir. En yaygın görüşe göre, yenidoğana ait oositler GV safhası olarak adlandırılan ve hücre döngüsünün profaz safhasında arreste kalır (White ve ark. 2012). Tam olarak büyümüş foliküldeki oosit, belirgin bir çekirdek içeren ve GV olarak adlandırılan kolayca tanımlanabilen bir çekirdek sergiler. Bunun yanı sıra hücre dışı matriks olan zona pellusida ve kumulus ooforus da belirgindir. Kumulus hücreleri, gap junction'lar ile birbirleri ile ve zona pellusidayı geçen projeksiyonların karmaşık bir ağı yoluyla da oositle fiziksel temastadır. Bu hücreler arası iletişim oosit metabolizması, gelişimi ve maturasyonu için gereklidir (Anderson ve Albertini 1976).

Bu süreç için ilk meydana gelen olay germinal vezikül breakdown (GVBD) olarak adlandırılan ışık mikroskobu altında görülen germinal vezikülün yok olmasıdır. Bir GVBD'da oositler ilk mayotik bölünmenin metafazından (Metafaz I) geçer ve bunu takiben ilk polar cisimcik meydana gelir ve oosit ikinci mayotik bölünmeye girer. Fertilizasyon gerçekleşene kadar ikinci mayotik bölünmesinin metafazında oositler areste kalır ve bu süreç hipofiz tarafından üretilen gonadotropinler tarafından kontrol edilir. Bununla birlikte, maturasyonun oosit ve somatik hücrelerden salgılanan parakrin ve otokrin sinyalleri de gerektirdiği bilinmektedir (Delilbaşı 2008).

Gonadotropin artışı, mayoz I'in hücre döngüsüne yeniden girişini ve tamamlanmasını, ardından da oositin nükleer maturasyonu olarak tanımlanan mayoz II'ye girişini başlatır. Bununla birlikte, fertilizasyon için uygun olması ve embriyo gelişimini sürdürebilmesi için oosit sitoplazmasında yer alan ek değişiklikler gereklidir ve bu değişiklikler sitoplazmik maturasyon olarak tanımlanır.

Oositlerin arrestten çıkarak mayotik hücre döngüsüne yeniden girmeleri, kadınlarda menstruasyon döngüsünün ortasında ortaya çıkan ve LH'da görülen büyük ve geçici artış ile tetiklenir. LH, G proteine bağlı reseptör (GPCR) ailesine ait spesifik bir reseptöre bağlanarak etki eder. Reseptörün LH ligandı ile etkileşmesi

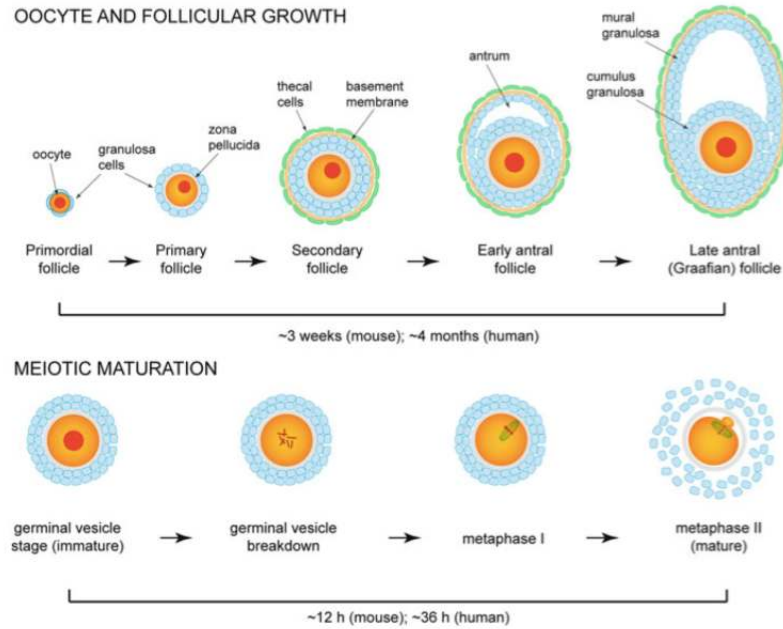
sonucu adenilat siklaz aktivasyonu gerçekleşir ve ikincil mesajcı olarak cAMP üretilir. LH reseptörleri oosit tarafından eksprese edilmediği için oosit maturasyonunun indüksiyonunda gamet hücresi üzerinde LH'nin dolaylı bir etkisi vardır. Somatik hücreler LH tarafından uyarıldıktan sonra somatik hücrelerden kaynaklanan ara sinyallerin oosite ulaştırılması gerekir. LH reseptörleri granüloza ve teka hücrelerinde bol miktarda eksprese edilir ancak kumulus hücrelerinde bulunmaz veya çok azdır. Kumulus-oosit komplekslerinin LH'ye in vitro maruz kalması, fare ve sıçan gibi bazı türlerde, az veya hiç bulunmayan reseptör ekspresyonu ile tutarlı olarak, belirgin bir etki yaratmaz (Segalo ve Ascoli 1993).

Granüloza hücrelerinden üretilen cGMP'nin mayotik arrestin korunmasında merkezi rolünün anlaşılması ile LH sinyalinin nasıl aktarıldığını tarif edilebilmiştir. İn vitro sekonder foliküllere LH ilave edildikten çok kısa bir süre sonra (yaklaşık 5 dakika gibi), granüloza hücrelerindeki cGMP seviyesi düşer (Shuhaibar ve ark. 2015). Bu durumu kumulus hücrelerinde ve oositte cGMP'de bir azalma takip eder. En önemlisi de kumulus hücrelerindeki ve oositteki hızlı cGMP düşüşü, gap junction'ların permeabilitesinin kimyasal inhibitörleri tarafından engellenir. cGMP, gap junctionlar fonksiyonel olmadığında bile kumulus hücrelerinde ve oositlerde azalır ve bu nedenle birden fazla mekanizmanın azalmaya katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Shuhaibar ve ark. 2015).

Oositlerin arrestte kalmasını dolayısıyla maturasyon sürecinin inhibisyonunu sağlayan mekanizmalar büyük önem taşır. Bu etkilerin teka ve granüloza hücrelerinden salgılanarak oosite iletilen TGF- β , anti-Müllerian hormon (AMH), aktivin, inhibin ve folistatin gibi parakrin faktörler yolu ile olduğu ileri sürülmüştür (Azziz ve ark. 2016).

Memeli türlerindeki erken gelişimi araştırmak için Edwards ve arkadaşları oosit in vitro maturasyon (IVM) yöntemini geliştirmiştir (Edwards 1965). Yardımcı üreme tekniklerinin geliştirilmesi ile IVM, kontrollü over stimulasyonu ile ilişkili ilaç maliyetleri ve yan etkileri ortadan kaldırmak veya azaltmak için son yirmi yılda giderek daha fazla kullanılmaktadır. Folikülden oosit ve kumulus hücreleri alındığında teka ve granüloza hücrelerinin lokal salgılarından ayrıca hipofiz bezinin endokrin salgılarından uzaklaşmış olur. Ayrıca oosit maturasyonunu inhibe edici faktörlerde ortadan kalktığı için nüklear maturasyon başlar. İn vivo maturasyonun aksine in vitro maturasyonda ilk işaret gap junction'ların yıkılması ve nüklear

membranda katlantıların meydana gelmesidir. Kültür ortamı içerisinde oosit maturasyonu meydana gelmesine rağmen bu durum başarılı fertilizasyon ve implantasyon meydana geleceğini garanti edemez (Delilbaşı 2008).



Şekil 9. Oosit ve foliküler büyüme ile mayotik maturasyonun genel görünümü (El-Hayek ve ark. 2016).

4.7. PKOS'DA FOLİKÜLOGENEZ VE OOSİT MATURASYON PROBLEMLERİ

Polikistik overin belirgin morfolojik özelliklerini etkileyen süreç henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Normal foliküler büyüme midantral evreye kadar gerçekleşiyor gibi görünmektedir, daha sonra olgunlaşma sona ermekte ve foliküllerin çoğu aşamalı olarak atreziye uğramaktadır (Erickson 2003). Folikül gelişiminin midantral aşamasında, granüloza hücre katmanı kademeli olarak dejeneratif hale gelir ve tüm yapı ince duvarlı bir kist görünümüne sahip olur. Bununla birlikte, folikül gelişimi midantral evrede arreste kalırsa, bu atrezinin hemen başladığını göstermez. PKOS'lu kadınların uyarılmamış overlerinden elde edilen granüloza hücreleri, normal kadınların overlerinden elde edilen granüloza hücrelerinin canlılıkları ile karşılaştırıldığında, daha fazla hücre sağkalımı olduğu gösterilmiştir (Almahbobi ve ark. 1996; Chang ve Dumesic 2019). PKOS'taki

foliküllerin çoğunun apoptotik olmadığı ve geniş fonksiyonel kapasiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgular PKOS granüloza hücrelerinin, apoptotik çekirdek ve proteinlerin azaldığını ve normal hücrelere kıyasla artmış antiapoptotik proteaz gen ekspresyonunu gösterir (Das ve ark. 2008; Chang ve Dumesic 2019). Midantral arreste kalmanın ardından, kistik foliküllerin klasik görünümüne yol açan antrumun genişlemesine neden olan artan bir foliküler sıvı birikimi olduğu görülmektedir. Folikül büyüdükçe, granüloza hücre katmanı kademeli olarak dejeneratif ve ince hale gelir. Granüloza hücrelerinin aksine, folikülü çevreleyen teka hücre tabakası normal foliküllerinkine kıyasla büyük ölçüde hiperplastik hale gelir, kalınlaşır ve artan androjen üretiminden sorumludur. PKOS'ta teka hücrelerinin olağandışı çoğalmasından sorumlu mekanizma bilinmemektedir (Chang ve Dumesic 2019).

PKOS'lu overlerdeki folikül sayısı, normal overlerdekilerle karşılaştırıldığında, primer, sekonder ve erken antral aşamalarda artmıştır (Maciel ve ark. 2004; Webber ve ark. 2003; Chang ve Dumesic 2019). Folikül popülasyonlarında sayısal eşitsizliğin temeli açık değildir. Webber ve arkadaşları polikistik overlerde, primer foliküllerin primordiyal foliküllere oranının arttığını, primordiyal foliküllerden büyüme havuzuna girişin artmış olabileceğini göstermiştir (Webber ve ark. 2003). Buna karşılık Maciel, artan sayıda büyüyen folikülün, primordiyal foliküllerin azalması ile ilişkili olmadığını göstermiştir ve büyüyen foliküllerin birikmesinin sınırlı büyüme progresyonundan kaynaklanabileceğini göstermiştir (Maciel ve ark. 2004; Chang ve Dumesic 2019).

Bu gözlemler, PKOS'da ekstraovaryan veya intraovaryan faktörlerin gebelik, çocukluk veya erken erişkinlik döneminde değişen foliküler gelişime katkıda bulunup bulunmadığı sorusunu gündeme getirmektedir. PKOS için genetik bir yatkınlık varlığında, uterus içinde, gebelik sırasında embriyo gelişimini etkileyebilir. Alternatif olarak, PKO morfolojisi genç kadınların genel popülasyonunda nispeten yaygındır. Bununla birlikte, normal postpubertal ve genç ergenlerde ovaryum ve folikül gelişiminin düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Ergenlik döneminde, over büyümesinin aktivasyonunun gonadotropin seviyelerinin yükselmesiyle artması, folikül gelişiminin ilerlemesine neden olabilir. Bu sürecin başlatılması daha sonra erken preantral folikül büyümesini düzenleyen intraovaryan faktörleri aktive edebilir (Chang ve Dumesic 2019).

4.7.1. PKOS'ta İnfertilite

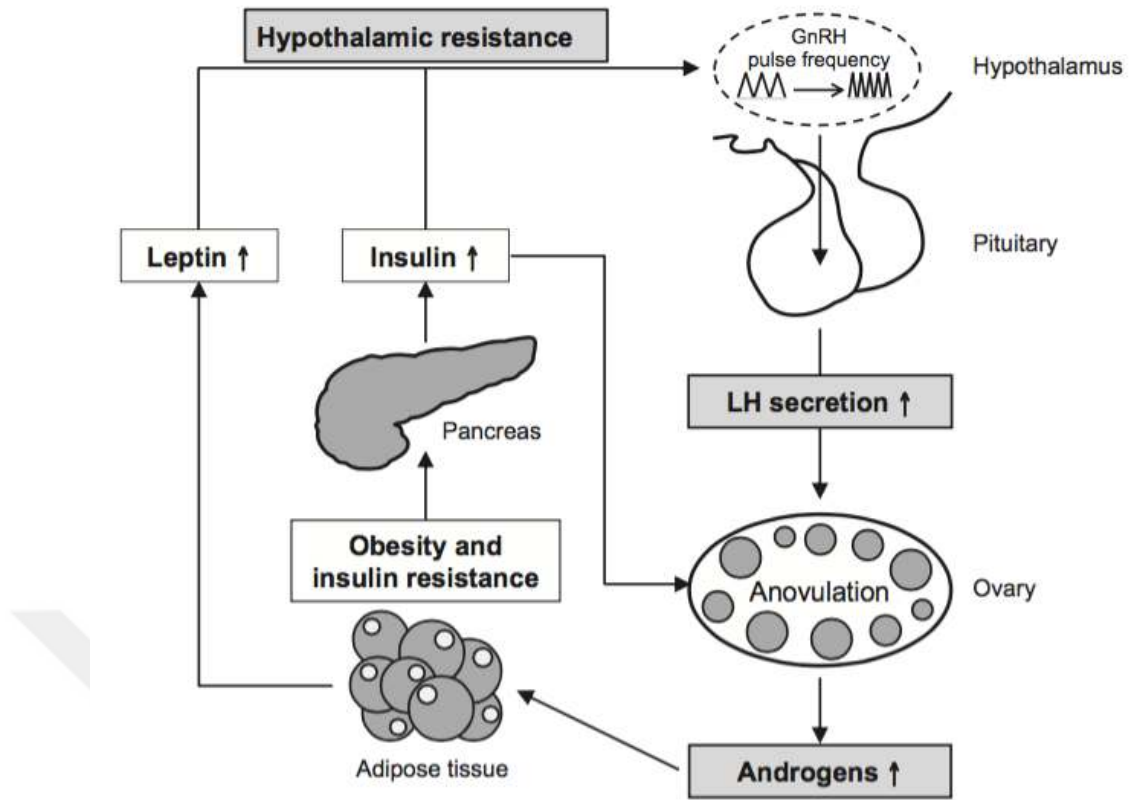
PKOS'lu kadınların over kalitesini ve fonksiyonunu etkileyen ilişkili endokrin ve jinekolojik anormallikler doğurganlığı azaltabilir (Hart ve Doherty, 2015). İnfertilitenin PKOS'lu kadınlar arasında sağlıklı kontrollere kıyasla 10 kat daha yaygın olduğunu gösterilmiştir (Hart ve Doherty, 2015). Anovulatuvar infertilitenin başlıca nedeni PKOS'tur (Adams ve ark. 1986; McGovern ve ark. 2007). Bir başka çalışmada da PKOS ile ilişkili kalıcı anovulasyon periyotları, infertilite ile pozitif yönde ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Imani ve ark., 1998). PKOS'lu kadınların yaklaşık %75-85'i ovulatuvar fonksiyon bozukluğuna sahiptir ve ovulasyon bu bireylerde nadiren meydana gelir (March ve ark. 2010). Düzenli menstrüel siklusları olan PKOS'lu kadınlar da anovulatuvar olabilir. Yapılan bir çalışmada, hiperandrojenizm ve oligo-anovulasyonu olan 316 PKOS'lu kadının %16'sının normal görünen menstrüel sikluslara (27-34 günlük aralıklarla) sahip olduğu bildirilmiştir (Chang ve ark. 2005).

PKOS, obezite, insülin direnci, Tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve infertilite gibi hastalıklarla ilişkilidir (El-Hayek ve ark. 2016). PKOS sıklıkla anovulasyon için ek bir risk faktörü olan obezite ile birlikte (The Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2008; Palomba ve ark. 2015). Obez PKOS'lu kadınlarda ovulatuvar fonksiyon bozukluğunun altında yatan endokrin olaylar belirsiz olmasına rağmen, PKOS ve obezite ovulasyonun bozulmasını birlikte etkiler (Dumesic ve ark. 2013). Ayrıca normal kilolu ve obez PKOS hastalarındaki ovulatuvar fonksiyon bozukluğu süreci farklıdır. Normal kilolu PKOS hastalarında LH hipersekresyonu ve ovaryan hiperandrojenizmi, değişen folikül gelişimini düzenleyen primer faktörler gibi görünmektedir, ayrıca insülin ovaryan steroidogenez ve granüloza hücre farklılaşmasında gonadotropinin etkilerini arttırmaktadır. Öte yandan, obez PKOS hastalarında, anormal glukoz-insülin homeostazı ve adipojenik fonksiyon bozukluğundan oluşan metabolik faktörler, folikül gelişimini ve oosit olgunlaşmasını değiştirmede LH'den daha önemlidir. Bu da ovulasyon indüksiyonunun gerektiği normal kilolu PKOS hastaları hariç, kilo kaybının neden birçok obez PKOS hastasında ovulasyon ve fertilitiyi geri kazanabileceğini açıklayabilir (Dumesic ve ark. 2013).

IVF tedavisi gören PKOS'lu kadınlar iyi tanımlanmıştır (Sahu ve ark. 2008; Qiao ve Feng 2011). PKOS'lu hastalar artmış sayıda oosit üretmekle karakterize

olmalarına rağmen, bu oositlerin genellikle kaliteleri zayıftır ve daha düşük fertilizasyon, bölünme ve implantasyon oranlarına sahiptir (Sahu ve ark. 2008; Boomsma ve ark. 2008; Qiao ve Feng 2011). PKOS'lu kadınlarda bozulmuş oosit olgunlaşması ve embriyonik gelişim yeterliliği kromozomal faktörler, anormal endokrin/parakrin faktörler, metabolik disfonksiyon ve folikülogenezis sırasındaki intrafoliküler mikroçevredeki değişikliklerle bağlantılıdır (Franks ve ark. 2002; Dumestic ve ark. 2007; Wood ve ark. 2007; Dumesic ve Abbott 2008; Qiao ve Feng 2011). Bu nedenle, PKOS'un over dışı ve over içi faktörlerdeki anomalliklerle ve bunların granüloza hücresi (GH)-oosit etkileşimleri, oosit olgunlaşması ve potansiyel embriyonik gelişim yeterliliği üzerindeki etkileri hakkında daha iyi fikir edinmek, infertiliteyi iyileştirmek için klinik stimülasyonu optimize etmek ve böylece IVF tedavisi gören PKOS'lu kadınlarda gebelik sonuçlarını arttırmak için önemlidir.

Ovulasyon indüksiyonu, obezitesi olmayan veya farmakolojik olmayan bir yaklaşımın başarısız olduğu hastalarda ilk tercih edilen tedavi yöntemidir. Canlı doğum, 2 yıl içerisinde IVF tedavisi gören PKOS'lu kadınlarda yaklaşık %80 oranında sağlanır (Veltman-Verhulst ve ark., 2012). PKOS'lu ve anovulatuvar infertiliteye sahip kadınlarda ilk tercih edilen ovulasyon indüksiyon tedavisi anti-östrojen klomifen sitrattır (The Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2008; Balen 2013). 2014 yılında yapılan çalışma da aromataz inhibitörü letrozolün PKOS'lu infertil kadınlarda klomifen sitrata göre daha yüksek ovulasyon ve canlı doğum oranı sağladığı bildirilmiştir. Ancak 2016 yılında yapılan başka bir çalışma da sadece klomifen sitrata dirençli PKOS'lu kadınlarda, ovulasyon indüksiyonu için letrozol ve metformin ayrıca klomifen sitrat kullanan grup ile olan etkisini karşılaştırılmış, ovulasyon hızında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Abu Hashim ve ark. 2010; El-khayat ve ark. 2016).



Şekil 10. PKOS'un olası kökenlerinin şematik modeli.

4.8. PROJE KAPSAMINDA İNCELENEN PROTEİNLER

4.8.1. Cep55

Cep55, 464 aminoasitten oluşan ve 55 kDA ağırlığında olan, c10orf3 ve FLJ10540 olarak da bilinen, memeli hücrelerinde sitokinezin başarıyla tamamlanması için gerekli olan bir sentrozom proteindir (Fabbro ve ark. 2005). Cep55 tümörögenizde gerçekleşen sitokinez sırasında intraselüler köprülerin yıkılmasına kısıtlama getiren endozomal sorting kompleksinin (ESCRT) taşınma mekanizması için gereken faktörler ile birlikte fonksiyon gösterir (Carlton ve ark. 2007; Carlton ve ark. 2008; Lee ve ark. 2008; Jeffery ve ark. 2015). Xu ve arkadaşları, Cep55'in iğ bütünlüğünün sağlanmasında, kromozomların hizalanmasında ve metafaz-anafaz geçişinde özellikle mayotik oositlerde önemli rolü olduğunu göstermiştir. Ayrıca Cep55, mitoz bölünme ve mayoz bölünmede farklı işlevlere sahiptir. Mayozda iğ oluşturmak için mikrotübülleri organize ederken, mitozda sitokinezde rol oynar ancak oositlerin sitokinezinde rol oynamaz (Xu ve ark. 2015).

Erişkin dokularda çoğunlukla testislerde ve kanser hücre dizilerinde eksprese olur. Cep55'in germ hücre fonksiyonundaki rolleri de bilinmektedir (Fratta ve ark. 2011; Jeffery ve ark. 2015). Cep55 kanserde anormal olarak eksprese olur ve bundan dolayı Cep55 kanser aşı tedavisi için ideal bir aday olarak görülür (Inoda ve ark. 2011a; Jeffery ve ark. 2015). Cep55 bazlı immünoterapi aşılarının etkinliğinin ilk çalışmaları, kemoterapiye dirençli kolon kanseri kök hücreleri ve tümör başlatan hücrelerin tedavisinde ümit vaat ettiğini gösterir (Inoda ve ark 2011b; Jeffery ve ark. 2015).

4.8.2. Cdk4

Cdk4, hedef proteinlerin fosforilasyonunu katalize eden ve hücre döngüsü ilerlemesini hızlandıran protein-serin kinaz süper ailesine aittir. Cdk4 ve siklin D arasındaki kompleks oluşumu, G1 fazı boyunca hücre proliferasyonunu düzenler (De Falco ve ark. 2004). Cdk4'ün hem çekirdekte hem de sitoplazmada ekspresyonu gözlenir (Brüssow ve ark. 2011; Kempisty ve ark. 2013). Cdk4'ün hücre döngüsünü düzenleyici mekanizması, çoğunlukla karsinogenez sırasında kontrolsüz hücre çoğalması üzerinde çalışılmıştır (Roberts ve ark. 2012). Bununla birlikte, Cdk4'ün folikülogenez ve oogenez sırasında hücre büyümesinin kontrolünde de yer aldığı gösterilmiştir (Kempisty ve ark 2014). Siklin bağımlı kinazlar mayotik süreçte rol oynar ve oositlerin mayotik yeterliliğini kontrol eden başlıca proteinlerdir (Adhikari ve ark. 2012). Cdk4, farelerde oosit olgunlaşması sırasında G1/S progresyonunda rol oynar (Kohoutek ve ark. 2004). Ayrıca, folikül boyutu, oosit içindeki spesifik Cdk4 translokasyonu ile bağlantılıdır (Brüssow ve ark. 2011). Domuz oositlerinde Cdk4'ün olgunlaşmadan önce ve olgunlaşmadan sonraki ekspresyonu karşılaştırıldığında, in vitro maturasyon sonrasında ekspresyonunun arttığı ve oosit maturasyonu sırasında kontrol noktası olarak kullanabileceği bildirilmiştir (Kempisty ve ark. 2014). Ayrıca domuz oositlerinin domuz foliküllerinden elde edilen kumulus hücreleri ile kültüre edilmesi sonucunda sitoplazmadan nükleusa doğru ekspresyonun geçtiği gösterilmiştir (Kempisty ve ark. 2013). Cdk4 domuz oositlerinde hem zona pellusida'da hem de sitoplazmada bulunur (Brüssow ve ark. 2011).

4.8.3. Hsp27

Isı şoku proteini 27 (Hsp27), 12-43 kDa ağırlığında, sitoplazmik olarak bulunan küçük ısı şoku protein ailesinin bir üyesidir. Hsp27, bir şaperon proteini olarak birçok önemli apoptotik yolda hücre apoptozisini düzenlemeye katılmaktadır (Banerjee ve ark. 2011; Liu ve ark. 2013) ve fonksiyonel olarak apoptozu inhibe edebilen bir apoptotik regülatördür (Concannon ve ark. 2003). Bir moleküler şaperon proteini olan Hsp27, ısı şoku, toksik maddeler, yaralanma ve oksidatif stres gibi çeşitli streslere yanıt olarak hücrel korumada yer alır (Lanneau ve ark. 2008). Hsp27 apoptotik yollardaki kaspaz aktivasyon bileşenleri ile doğrudan etkileşim halindedir ve güçlü anti-apoptotik özelliklere sahiptir. Bunun sonucunda apoptozla ilişkili yaralanmalara karşı koruyucu etkiler gösterir (Garrido ve ark. 2003; Whitlock ve ark. 2005). Hsp27, renal yaralanma ve fibrozis, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi bir çok hastalıkta eksprese olur. Bundan dolayı potansiyel biyobelirteç ve terapötik hedef olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Vidyasagar ve ark. 2012). Ayrıca Hsp27'nin PKOS'lu kadınlarda (Ma ve ark. 2007), farelerde oosit maturasyonu (Liu ve ark. 2010; Cai ve ark. 2013) ve erken embriyonik gelişim çalışmalarında (Liu ve ark. 2013) rolü incelenmiştir. Hsp27 foliküler oogeneizde hücre apoptozisini önler (Ma ve ark. 2007).

4.8.4. Nobox

NOBOX (Newborn Ovary Homeobox), oosite özgü bir homeobox geni olup, fare ve insanlarda primordiyal ve büyüyen oositlerde eksprese olur (Suzumori ve ark. 2002). Nobox homozigot knockout farelerde doğum sonrası oosit kaybını hızlandırır (Rajkovic ve ark. 2004). Ayrıca oositlerde *Nobox* geninin yokluğunda eksprese olan 33 genin sadece 5'i eksprese olur (Choi ve ark. 2006). Nobox üç adet transkriptten eksprese edilir. İnsan overlerinde eksprese edilen Nobox transkripti 1725 baz çiftinden oluşur ve folikülogenezde bu transkript rol oynar. Diğer iki Nobox transkripti fetal ve erişkin overlerinden eksprese olmaz (Huntriss ve ark. 2006; Bayne ve ark. 2015). Nobox geni olmayan dişi farelerde, kadınlarda over yetmezliğine benzer bir fenotip gözlenir (Rajkovic ve ark. 2004). Prematür over yetmezliğinde (primer ovaryan yetmezlik) Nobox önemli rol oynar ve Nobox'un doğum öncesi farelerin over gelişiminde somatik hücre bileşenlerinin ve/veya germline/soma iletişiminin uygun gelişimi için vazgeçilmezdir (Lechowska ve ark.

2011). Nobox ve prematur ovaryan yetmezlik ilişkisi ile yapılan başka bir çalışma sonucunda, prematur over yetmezliği olan bir hastada NOBOX'un transkripsiyonel aktivasyonunun önemli bir fonksiyon kaybı sergilediği ve G2 / M arrestinin kontrol edilmesinde NOBOX'un yeni bir rolü olduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 2017). Oosit kalitesi üzerine yapılan bir diğer çalışma da ise NOBOX ekspresyonundaki farklılığın gelişimsel olarak yeterli ya da yetersiz oositlerde kalite farkını ortaya koyabilecek bir protein olduğu bildirilmiştir (Belli ve ark. 2013).

4.8.5. Foxl2

Forkhead Transkripsiyon Faktörü (Foxl2), canlılarda ilk kez *Drosophila*'da, memelilerde ilk kez 1998 yılında fare hipofiz bezinin gelişiminde rol oynayan genler içinde tanımlanmıştır (Weigel ve ark. 1989; Treier ve ark. 1998). Foxl2, 110 amino asit DNA binding forkhead domaini içeren, 2.7 kb'lik bir tek ekzon genidir (Lehmann ve ark. 2003; Verdín ve De Baere 2012). Bu ailenin üyeleri mayadan insana kadar değişen türlerde de tanımlanmıştır (Lehmann ve ark. 2003). Etki biçimleri öncü faktörler, transkripsiyon faktörleri veya her ikisi gibi olduğundan oldukça çeşitlidir (Leung ve ark 2016). Gelişim, kök hücre farklılaşması, metabolizma, bağışıklık ve cinsiyet belirleme de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik sürece katılır (Leung ve ark 2016). Embriyogenez (Weigel ve ark. 1989; Mahlapuu ve ark. 2001; Lehmann ve ark. 2003), hücre farklılaşması (Brissette ve ark. 1996; Dottori ve ark. 2001; Nakae ve ark. 2003), tümörögenizde (Parry P ve ark. 1994; The ve ark. 2002; Radisavljevic 2003), göz kapağı gelişimini etkileyen Blepharophimosis-Ptois-Epicanthus Inversus Sendromunda (BPES) (Crisponi ve ark. 2001), granüloza hücre tümörlerinde rol oynar (Leung ve ark 2016). Ayrıca Foxl2, over gelişimi ve ovaryan foliküllerinin büyümesi ve maturasyonunda merkezi bir transkripsiyon faktörü olarak ortaya çıkar (Pisarska ve ark. 2011).

Foxl2' deki heterozigot mutasyonlar, kadınlarda karakteristik erken over yetmezliği ve infertiliteye neden olur (Zlotogora ve ark. 1983). Farelerde, Foxl2'nin ekspresyonu cinsiyete bağlı olarak değişkenlik gösterir. Dişi gonadlarında embriyonik 12.5 günden itibaren ekspresyonu başlar ancak erkeklerde gonadların gelişmesinde saptanamamıştır. Foxl2 ifadesi over farklılaşmasının en erken belirteçlerinden biridir ve yetişkinlik boyunca tüm foliküler evrelerde somatik granüloza ve teka hücrelerinde devam eder (Schmidt ve ark. 2004). Fenotipik olarak

homozigot geni susturulmuş farelerin fenotipik analizlerinde Foxl2'nin granüloza hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (Uda ve ark. 2004). Foxl2 mutant farelerin foliküllerinde granüloza hücreleri yassıdan kübik hale geçemez ve gelişemeyen granüloza hücrelere sahip foliküller atreziye uğrar. Tüm bunların sonucunda ilerlemiş foliküler yetmezlik ve infertilite ortaya çıkar (Schmidt ve ark. 2004, Uhlenhaut ve Treier 2011).

4.8.6. Konneksin 37

Gap junctionlar, komşu hücre sitoplazmalarını birbirine bağlayan ve hücreler arasında 1000 kDa'dan daha küçük sekonder mesajcılar, inorganik iyonlar ile küçük metabolitlerin geçişine izin veren hücrelerarası kanal kümeleridir (Bruzzone ve ark. 1996). Her gap junction, hemi kanallar olarak bilinen bir konneksondan oluşan ve moleküler ağırlığına göre adlandırılan altı adet konneksin alt biriminden oluşmaktadır (White ve ark. 1995). Folikülün gelişimi ve fonksiyonu için oosit ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimin gap junctionlar tarafından yapıldığı gösterilmiştir (Kidder ve ark. 2002). Gap junctionlar, endokrin ve parakrin olarak büyüme sinyalleri göndererek oosit ve granüloza hücreleri arasındaki metabolik koordinasyonu sağlar (Heller ve ark. 1981; Matzuk ve ark. 2002; Wigglesworth 2013). Böylece foliküler büyümenin koordinasyonunda ve oosit maturasyonunda rol oynar (Grazul-Bilska ve ark. 1998, Kalma ve ark., 2004). Konneksin 37 (Cx37) hem granüloza hücrelerinde hem de oositlerde heteroselüler gap junctionların oluşmasında bulunur (Veitch ve ark. 2004). Cx37, hücreler arası iletişimi kolaylaştıran ve hücre farklılaşması, göçü ve gelişmesine katkıda bulunan gap junction proteinlerinin konneksin ailesine aittir (Kidder ve Mhawi, 2002). Ovaryumda, Cx37 oosit ve granüloza hücreleri arasındaki hücreler arası iletişimde önemli bir rol oynar ve folikülün normal gelişimi için gerekli olan çift yönlü sinyal iletimini kolaylaştırır (Teilmann 2005). Farelerde primer foliküllerden preantral over foliküllere geçtikçe Cx37'nin sayısında önemli bir artış olduğunu gösterilmiştir (Teilmann 2005). Cx37 bulunmayan farelerde Cx37'nin oosit büyümesi ve preantral foliküllerdeki sitoplazmik mayotik yetkinlik kazanımı için gerekli olduğunu belirtmiştir (Carabatsos ve ark. 2000). Fare geni knockoutları, hem Cx37 hem de Cx43'ün folikül büyümesinin erken dönemlerinde gerekli olduğunu açıkça ortaya koymuştur (Kidder ve Vanderhyden, 2010). Fare ovaryumlarında, Cx37, oosit

yüzeyindeki gap junctionlarda lokalizedir ve bu nedenle oosit-granüloza hücresi metabolik bağlanmasından sorumludur (Simon ve ark. 1997; Gittens ve Kidder 2005). Cx37'yi şifreleyen Gja4 knockout edildiğinde, oositler, granülozadan metabolik olarak ayrılmalarının bir sonucu olarak, mayotik yetkinlik kazanamayıp büyüyemez ve sonunda dejenere olurlar (Simon ve ark. 1997). Oositlerin kaybıyla birlikte, Cx37 null ovaryumların granüloza hücrelerinde erken luteinizasyon gözlenir. Bu nedenle, oosit yüzeyindeki Cx37 gap junctionlarının sadece oosit tarafından ihtiyaç duyulan granüloza hücre metabolitlerini değil, aynı zamanda granüloza hücrelerinin ovulasyondan önce luteinize olmasını engellemek için oositten gelen sinyalleri alması içinde önemlidir (Winterhager ve ark. 2015).

Gap junction protein ailesi içinde farelerde folikül ve oosit büyümesi için iki izoform tanımlanmıştır: Gap junction alfa 1 (GJA1, konneksin-43, Cx43) ve Gap junction alfa 4 (GJA4, konneksin-37, Cx37) (Kidder ve ark. 2002; Kidder 2005; Gershon ve ark. 2008; Santiquet ve ark. 2013). Cx37 ve Cx43, hem büyüyen hem de olgun foliküllerin gap junctionlarında ancak farklı konumlarda tanımlanmıştır. Kumulus hücrelerinin (trans-zonal çıkıntılar) uzantıları oosit yüzeyine temas etmek için zona pellusida boyunca uzanır ve farelerde, büyüyen foliküllerde oosit yüzeyindeki gap junctionlar Cx37'den oluşan homomerik-homotipik bağlantıları oluşturur (Albertini ve ark. 2001; Winterhager ve ark. 2015). Cx37 olmadan foliküler gelişim durmakta ve daha sonra ovulasyon gerçekleşmemektedir (Simon ve ark. 2006). Cx37, folikülogenezin tüm evrelerinde oositler tarafından eksprese edilir. Gja4'ün delesyonu, oosit ile granüloza hücrelerinin arasındaki gap junctionların kaybı ile sonuçlanır ve hücrelerarası iletişimin kesilmesine neden olur. Bu nedenden dolayı kadınlarda infertiliteye neden olur (Simon ve ark. 1997). Bu hayvanlarda primordial foliküller büyüyen havuza dahil edilmeye devam ederken, folikül gelişimi preantral-antral geçişte başarısız olur.

Farklı insan popülasyonlarında Cx37 geninde polimorfizmler görülür ve protein sekanslaması ile C terminal domaininde T domanine bir kayma belirlenmiş ve Cx37'nin başka bir biçimdeki formu tanımlanmıştır (Lee ve ark. 2008; Han ve ark. 2008). C terminal domainindeki bu değişiklik sonucunda bağlantıların iletkenliğinde voltaj duyarlılığına neden olabileceği bildirilmiştir (Kumar ve ark. 2000). Bu değişiklik sonucunda ortaya çıkan duyarlılık, Tayvanlılarda koroner arter hastalıkları (Yeh ve ark. 2001; Leu ve ark. 2011), karotid intimal-medial kalınlık ve bunu

takiben inmeye ve Japonlarda koronar arter hastalıklarına (Yamada ve ark. 2002), İsviçrelilerde (Listi ve ark. 2007) ve Sicilyalılarda (Listi ve ark. 2005) miyokard enfarktüsüne neden olduğu, Çinlilerde ise sepsis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yu ve ark. 2017).

4.8.7. Konneksin 43

Gap junction alfa 1 (GJA1, Konneksin 43, Cx43), foliküler büyümenin her aşamasında bol miktarda bulunan, hücreler arası küçük moleküllerin ve iyonların taşınmasını sağlayan hücreler arası bağlantılardır (Teilmann 2005). Cx43 protein ekspresyonu seviyesi, folikül gelişimi sırasında artar ve foliküler atrezi ile azalır (Ackert ve ark. 2001). Konneksinlerin oosit maturasyonundaki rolleri çoğunlukla knockout fare modellerinde araştırılmıştır (Carabatsos ve ark. 2000; Li ve ark. 2007). Fare ovaryumlarında, Cx43 granüloza hücrelerini birbirine bağlar (Simon ve ark. 1997; Gittens ve Kidder 2005). Cx43-null farelerden toplanan oositler mayotik maturasyona ulaşmada başarısızdır ve bu durum infertilite ile sonuçlanır (Ackert ve ark. 2001). Fare knockout modellerinin subfertil olduğu ve farelerde normal oogenez, folikülogenez ve erken embriyonik gelişimler gözlenir iken, implantasyon gerçekleşmemektedir (Li ve ark. 2007; Gershon ve ark. 2008). Bu proteinlerin sadece oosit maturasyonunda değil aynı zamanda oositin gelişmesinden ve embriyonunun büyümesinden sorumlu oldukları bildirilmiştir (Brevini ve ark. 2002). Cx37, somatik granüloza hücreleri ve oositler arasındaki bağlantıyı sağlayan majör protein iken, Cx43 granüloza hücre bağlantısında önemli rol oynar (Shimada ve ark. 2001; Shimada ve ark. 2004). Bununla birlikte Cx43 hem granüloza hücrelerinde hem de denude oositlerde bulunur (Calder ve ark. 2005; Pandey ve ark. 2009; Brüssow ve ark. 2011) .

Cx43 protein seviyesi zamanla değişir ve domuz kumulus-oosit kompleksleri in vitro olgunlaşması sırasında PKC ve PI3K'dan etkilenir (Shimada & Terada, 2001; Shimada ve ark. 2001). Cx43 mRNA'sı mayotik yeniden başlatma sırasında domuz kumulus-oosit komplekslerinde eksprese edilir ve ekspresyon seviyesi gonadotropinlerden etkilenir (Granot ve Dekel, 2002; Santiquet ve ark. 2013). Cx43'ün domuz oositlerinde değil sadece kumulus hücrelerinde eksprese olduğu bildirilmiştir ancak in vitro maturasyon sırasında seviyesinin değiştiği ve zona pellusida yoluyla ooplazmik membran içerisinde lokalize olduğu bildirilmiştir

(Santiquet ve ark. 2013; Lee ve ark. 2015). Domuz oositleri ile yapılan başka bir çalışmada MAPK inhibitörü olan U0126 ile muamele edilen oositlerin blastosist evresine gelişim oranını arttırdığı bulunmuş; bu, uygulama sonucunda GAPJ'nin parçalanmasının ertelenmesinin oosit gelişim yeterliliğini geliştirebileceği bildirilmiştir (Shinohara ve ark. 2018). Fare oositlerinde, Cx43 proteini, kumulus hücrelerinde, transzonal uzantılarda ve oositlerde eksprese olur (Kidder ve Mhawi 2002; Simon ve ark. 2006). Aşırı Dihidrotestosteron (DHT)'nin Cx43 ekspresyonunu azalttığı ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimi bozduğu gösterilmiştir (Wu ve ark. 2010). Yapılan başka bir çalışmada 1,25D₃ 'ün insan deri fibroblastlarındaki nükleer VDR aracılığıyla Cx43 protein seviyelerini ve Cx43 mRNA stabilitesini arttırdığı gösterilmiştir (Clairmont ve ark. 1996). İnsan kumulus hücrelerinde eksprese olan mitokondrial uncoupling protein 2 (UCP2) 'nin rolünü keşfetmek için yapılan bir çalışmada UCP2'nin inhibisyonu için kullanılan Genipin veya siRNA'nın Cx43 mRNA ve protein ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca kumulus hücrelerinden salgılanan steroid hormonlarının değişebileceği ve bu değişimin folikül içerisindeki endokrin dengeyi bozarak folikül sağlığı ve büyümesi ile birlikte oosit olgunlaşmasını da etkileyebileceği düşünülmüştür. Bunların sonucunda UCP2, otofajinin ve apoptozun düzenlenmesi, gap junction bütünlüğünün ve progesteron sentezinin korunması ile ilişkilidir (Ge ve ark. 2017). Cx43 protein seviyesi, yarıklanma durumu ve morfolojisi ile değerlendirmiş ve embriyo kalitesi ile pozitif korelasyon göstermiştir (Wang ve ark. 2009). Ayrıca hamile olan hastalarda hamile olmayanlara göre anlamlı derecede yüksektir (Wang ve ark. 2009). Hasegava ve arkadaşları, IVF-ICSI siklusları sırasında kumulus hücrelerinde Cx43'ün mRNA ekspresyonunu incelemiş ve Cx43'ün ekspresyonu ile fertilizasyon veya yarıklanma oranı arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır. Bununla birlikte, Cx43 ekspresyonunun iyi morfoloji (3. günde blastomer sayısının 7'den daha fazla olduğu ve fragmentasyon oranını %10'dan daha düşük olduğu grup) grubunu diğer deney grupları ile karşılaştırdığında daha düşük olduğunu bulmuştur. ICSI'de kullanılacak oositler toplanırken kumulus hücrelerinde Cx43 ekspresyonunun tam olarak azaltılmasının insan oositlerinin gelişimsel yetkinliği için şart olduğunu ileri sürmüştür (Hasegeva ve ark. 2007). Talhouk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada polikistik over sendromu için uygun bir kültür modeli oluşturmuş, Cx43 ve Gap junction bağlantılı hücrelerarası iletişim (GJIC)'in polikistik over sendromunun patogeneze katkıda bulunabileceğini göstermiştir

(Talhouk ve ark. 2012). Yapılan başka bir çalışma da oosit maturasyonu için GnRH agonisti ve insan koryonik gonadotropin (hCG) ile tetiklenen hastalar ve sadece hCG ile tetiklenen hastalar karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak iki tetikleyici alan hastaların granüloza hücrelerinden Cx43 ekspresyonunun azaldığı bununda oosit ve embriyo kalitesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Haas ve ark. 2016). Yıldız ve arkadaşlarının diyabetik sıçanların overleri ile ilgili yaptıkları çalışmada Likopen verilen sıçanların primordiyal, sekonder ve büyük antral foliküllerinde Cx43'ün arttığı gösterilmiştir (Yıldız ve ark. 2016). Yang ve arkadaşları PKOS'lu hastalarda androjen fazlılığından yola çıkarak farelere testosteron uygulamış ve bu uygulama sonucunda androjen reseptörünün (AR) önemli ölçüde arttığını, Cx43'ün de belirgin bir şekilde azaldığını bildirmiştir. Değişen bu AR ve Cx43 ekspresyon seviyeleri folikülogenezi etkileyeceğini düşünmüşlerdir (Yang ve ark. 2015).

4.8.8. Adamts-1

Adamts'ler hücre dışına salınabilen, ekstraselüler matriks hasarında ve onarımında önemli role sahip proteinazlardır. Kollajen, agrekan, versikan gibi ekstraselüler matriks substratlarını parçalayan Adamts ailesi 19 adet üyeye sahiptir (Gao ve ark. 2007). Ekstraselüler matrikste önemli fizyolojik süreçlerin büyük bölümüyle ilişkilendirilen bu enzimler, metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) tarafından inhibe edilir (Wang ve ark. 2006, Wayne ve ark. 2007; Demircan ve ark. 2014). Bu grubun aile üyeleri, ekstraselüler matriksteki görevlerine göre çeşitli alt gruplara ayrılmıştır. Trombospondin benzeri motifler içeren bir disintegrin ve metalloproteinaz-1 (Adamts-1= a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1) bunlardan biridir ve hücre dışı matrikse bağlanabilen, matriks metalloproteinazlardan farklı olarak salgılanan metalloendopeptidazlar ile ilişkili bir aileye aittir (Kuno ve ark. 1999).

Adamts ailesinin bazı üyelerinin ifadesi, bazı memeli türlerinde ovulasyon sırasında, büyüyen foliküllerde bulunduğu bildirilmiştir. Adamts-1, esas olarak kemirgenler, inekler, atlar, domuzlar, maymunlar ve ayrıca insanların GH'leri tarafından eksprese edilir. Adamts-1, kumulus oosit kompleksi oluşumu veya stabilizasyonu üzerinden ovulasyonu etkileyebilir (Robker ve ark. 2000; Madan ve ark. 2003; Boerboom ve ark. 2003; Tang ve ark. 2016). Adamts-1, -4, -9 ve -15 mRNA ekspresyon seviyelerinin iki kat veya daha büyük bir artışının, hCG

uygulamasý sonrasýndaki ovulatuvar foliküllerde bulunduđu gösterilmiřtir. Buna ek olarak, progesteron, östrojen ve androjenler, ekstraselüler matrikste sindekan ve perlekanýn proteolizi ile foliküler parçalanmayı sađlayan Adamts-1 ekspresyonunu arttırır (Pelú ve ark. 2011; Russell ve ark 2015).

Ovulasyon öncesi dönemde ya da ovulasyonun erken veya geç evrelerinde insan overleri üzerinde yapılan bir çalışmada, GH'lerinde, Adamts-1 ve Adamts-9 ekspresyon seviyesi 30 veya 40 kat artmıştır ancak teka hücrelerinde dikkate değer bir değişiklik olmamıştır (Tang ve ark. 2016). ADAMTS moleküllerinin PKOS patogenezinde rol oynayabilir (Mishra ve ark. 2013; Karaköse ve ark. 2016). Freimann ve arkadaşları yardımcı üreme teknolojilerinin (YÜT) kullanımıyla In Vitro Fertilizasyon (IVF) prosedüründen elde edilen insan granüloza hücrelerinde Adamts-1'in eksprese edildiğini göstermiştir (Freimann ve ark. 2005). Adamts-1 ovulasyonda önemli rol oynadığı ve Adamts-1 geninin susturulması ile yapılan modellerde ciddi ovulatuvar bozukluklar saptanmıştır. Xiao ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucunda PKOS hastalarında Adamts-1 ekspresyonunun azalması bozulan oosit kalitesi ile yakýndan ilişkili olduğunu göstermiştir (Xiao ve ark 2014). GohariTaban ve arkadaşları, Progesteron resptörleri ile birlikte Adamts-1 ve Adamts-9'un PKOS hastalarının kumulus hücrelerinde azalmasının, düşük fertilizasyon oranı ile birlikte bozulmuş oosit maturasyonu, azalmış oosit geri kazanımı ve oosit maturasyon oranlarına yol açabileceğini göstermiştir (GohariTaban ve ark. 2019).

4.8.9. Adamts-9

Adamts-9, sırasıyla Gon-1 ve adlı nematodlarda Gon-1 ve meyve sineklerindeki Adamts-A proteazlarıyla yüksek homoloji gösteren, Adamts proteinaz ailesinin evrimsel olarak en çok korunmuş ve en büyük proteazıdır (Blelloch ve ark. 1999; Clark ve ark. 2000; Somerville ve ark. 2003; Ismat ve ark. 2013). Yapılan çalışmalarda Adamts-9'un substratları olarak iki ekstraselüler matriks proteoglikanı Agrekan ve Versikan tanımlanmıştır (Somerville ve ark. 2003). Adamts-9, MII oositin kumulus hücrelerinde MI oositin kumulus hücrelerine kıyasla artmış olarak gösterilmiştir (Huang ve ark. 2013). Buna ek olarak, Adamts-9 fare embriyo gelişimi sırasında yaygın şekilde eksprese edilir. Adamts-9 ve Ank2'nin oosit olgunlaşması sırasında ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler, PKOS'ta

folikülogenez ve oosit olgunlaşması için hücre iskeletinin ve hücre dışı matriks oluşumunun önemli olduğunu gösterir (Huang ve ark. 2013). Yapılan başka bir çalışmada PKOS'lu hastaların kontrol grubu hastalarla karşılaştırılması sonrasında serum seviyelerinde Adamts-1, Adamts-5 ve Adamts-9 seviyelerinde herhangi bir farklılık bulunmamıştır (Karaköse ve ark. 2016).

PKOS'lu kadınlardan oosit elde edilmesinin zorluğu göz önüne alındığında deneysel olarak oluşturulan PKOS modeli ile oositlerin olgunlaşmasının sebeplerinin anlaşılması ve bunların gelecekte infertilite tedavisinde kullanılması çocuk sahibi olmak isteyen olgunlaşmamış oosit rezervinin düşük olduğu vakalar açısından önemlidir. Bu çalışmada kadınlardaki infertilite sebeplerinden biri olan PKOS'un deneysel fare modelinde farklı ilaç uygulamalarından sonra oosit maturasyonunu etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda PKOS dişi Balb/C farelerde DHEA kullanılarak deneysel PKOS modelinin oluşturulması hedeflendi. Deneysel PKOS fare modelinin oluştuğunu kanıtlamak için ovaryumlar morfolojik olarak ve Glukoz Tolerans testi uygulanarak değerlendirildi. PKOS modeli oluşturulan farelerde ovulasyon indüksiyonu ve oosit kalitesinin arttıran klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon ilaçlarının uygulanmasını takiben toplanan over dokularında oosit maturasyonunda önemli olan Cep55, Cdk4, Hsp27, Foxl2, Nobox, Konneksin 37, Konneksin 43, Adamts-1 ve Adamts-9 proteinlerinin seviyesi ovaryumlarda immunohistokimyasal olarak, oositlerde immunofloresan olarak incelendi.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 22/08/2017 tarih, 77.637.435 numaralı onayı ile yapıldı.

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2016-163 no'lu proje ile desteklendi.

5.1. DENEYSEL PKOS MODELİ OLUŞTURULMASI

Çalışmada Kobay deney hayvanları laboratuvarından temin edilen 21 günlük 36 adet dişi Balb/C cinsi fare kullanıldı. Fareler, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında, sessiz, sıcaklık ve nem kontrolü olan bir ortamda 12 saat aydınlık (08:00-20:00) ve 12 saat karanlık siklusuna uyularak bakıldı. Çalışma boyunca su ve yiyecek alımında bir kısıtlama yapılmadı. Ortam sıcaklığı 24 ± 1 °C olacak şekilde ayarlandı.

DeneySEL PKOS modeli 4 haftalık 36 adet dişi Balb/C cinsi farede oluşturuldu. Modeli oluşturmak için 21 gün boyunca farelere 0,01 ml %95'lik etanolde çözdürüldükten sonra 0,09 ml susam yağı ile karıştırılarak hazırlanan Dihidroepiandrosteron (DHEA, Merck Millipore, katalog no:252805) 6 mg/100g olacak şekilde 0.1 cc subkutan olarak enjekte edildi (Yaba ve Demir 2012; Bakhshalizadeh ve ark. 2017).

5.2. ÇALIŞMA GRUPLARI

Grup I (n=6): Bu gruptaki deneklere herhangi bir uygulama yapılmadı ve 21 gün sonunda sakrifiye edildi. Kontrol grubu olarak belirlendi.

Grup II (n=12): Bu gruptaki deneklere 21 gün DHEA subkutanöz enjekte edildi ve bu süre sonunda sakrifiye edildi. Deneysel PKOS modeli kontrolü olarak belirlendi.

Grup III (n=9): Bu gruptaki deneklere 21 gün boyunca DHEA subkutanöz enjekte edildikten sonra 5 gün boyunca 1,5 mg/kg klomifen sitrat orogastrik kanül ile, 0,2 ml serum fizyolojikte çözülerek verildi ve bu süre sonunda sakrifiye edildi. Deneysel PKOS modeli klomifen sitrat tedavi grubu olarak belirlendi.

Grup IV(n=9): Bu gruptaki deneklere 21 gün boyunca DHEA subkutanöz enjekte edildikten sonra 5 gün boyunca klomifen sitrat (Klomen, Koçak Farma) (1,5 mg/kg) + ½ metformin (Glifor, Bilim İlaç) (12 mg/kg) + pioglitazone (Glifix, Bilim İlaç) (0,20 mg/kg) orogastrik kanül ile 0.2 ml serum fizyolojikte çözülerek verildi ve bu süre sonunda sakrifiye edildi. Deneysel PKOS modeli kombine tedavi grubu olarak belirlendi.

Grup II de bulunan deneklerden üçü PKOS modeli oosit analizi için 21. günde sakrifiye edildi ve ovaryum dokuları M2 kültür vasatına (M7167, Sigma, USA) alınarak oositler toplandı ve %4'lük paraformaldehitte (1040051000, Merck Millipore, GER) fikse edildi.

5.3. GLUKOZ TOLERANS TESTİ

Çalışmada PKOS deneysel modelin teyiti için her gruptan deneklere sakrifiye edilmeden önce glukoz tolerans testi uygulandı (Kaufmann ve ark. 2015). Fareler sadece su içebilecekleri şekilde 6 saat aç bırakıldı ve siklik evrelerden bağımsız olarak Glukoz Tolerans Testi uygulandı. Tek doz intraperitoneal olarak glukoz serum fizyolojik içinde 2g/kg doz olacak şekilde enjeksiyonu yapılmadan önce (0. Dakika'da) glukometre ile bazal kan şekerleri ölçüldü. Tek doz intraperitoneal olarak glukoz (serum fizyolojik içinde 2g/kg doz olacak şekilde) enjeksiyonu yapıldıktan sonra 15., 60. ve 120. dakikalarda kan şekerleri ölçüldü ve kayıt edildi (Kaufmann ve ark. 2015).

5.4. OVARYUM DOKULARININ HİSTOLOJİK ANALİZİ

5.4.1. Dokuların Alınması ve Parafin Doku Takibi

Alınan ovaryum doku örnekleri ışık mikroskop ile değerlendirilmek üzere %10 formalin solüsyonu ile 48 saat süreyle fikse edildi. Daha sonra doku örnekleri dehidratasyon için sırası ile %60'lık, %70'lik, %80'lik alkollerde (Alkomed, BUL) 30 dakika, %100 alkolde 1 saat olacak şekilde tutuldu. Şeffaflaştırma için iki değişim olacak şekilde ksilende (Surgipath, USA) tutuldu. Şeffaflaştırma işlemini takiben, iki değişim olacak şekilde parafinde tutulduktan sonra parafine gömüldü. Uygulanan doku takip protokolü Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Parafin doku takip protokolü

İŞLEM	SOLÜSYON	SÜRE
FİKSASYON	%10 FORMALİN	48 Saat
	AKAR SU	16 Saat
DEHİDRATASYON	%60 ALKOL	30 Dakika
	%70 ALKOL	30 Dakika
	%80 ALKOL	30 Dakika
	%95 ALKOL	30 Dakika
	%100 ABSOLUT ALKOL	1 Saat
	%100 ABSOLUT ALKOL	1 Saat
ŞEFFAFLAŞTIRMA	ETANOL:KSİLEN(1:1)	30 Dakika
	KSİLEN I	1 Saat
	KSİLEN II	1 Saat
İNFİLTRASYON	KSİLEN -PARAFİN (1:1)	30 Dakika
	PARAFİN I	1 Saat
	PARAFİN II	1 Saat
GÖMME	PARAFİN	

5.4.2. Ovaryum Dokularının Histokimyasal Yöntem ile Analizi

Histokimyasal analiz için parafine gömülen bloklardan 5 µm'lik kesitler mikrotom (Leica RM2245, GER) ile alındı. Kesitler 60°C'de bir gece etüvde bekletildikten sonra parafinden kurtarmak için 30 dakika iki değişim ksilende bekletildi. Kesitler dokuların rehidratasyonu için sırası ile %96, %80, %70, %60'lık azalan alkol serilerinde 2 dakika bekletildi ve akar su altında 5 dakika yıkandı. Çekirdeklerin boyanması için 6 dakika hematoksin (RRSP67, Atom Scientific, UK) ile boyandı ve hematoksin fazlasının uzaklaştırılması için tekrar akar su

altında 5 dakika yıkandı. Kesitler akar su altında yıkandıktan sonra diferansiyasyon için asit-alkol içerisinde birkaç saniye tutulduktan sonra tekrar akar su altında 5 dakika yıkandı ve sitoplazmayı boyanmak için 2 dakika eozin (RRSP35, Atom Scientific, UK) ile boyandı. Kesitler akar su altında eozinin fazlasının uzaklaştırılması için 5 dakika tekrar yıkandıktan sonra %80 ve %96'lık alkol serilerinden geçirildikten sonra bir kaç dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Kesitler son olarak 1 saat ksilende tutulduktan sonra entellan (107961; Merck, GER) ile kapatıldı (Tablo 7) ve ışık mikroskobu (Olympus BX-43, JP) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 7. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İŞLEM	SOLÜSYON	ZAMAN
DEPARAFİNİZASYON	60°C'lik ETÜVDE	GECE
		BOYUNCA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%96 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT- ALKOL	1-2SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	%80 ETİL ALKOL	1 DAKİKA
	%95 ETİL ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA	
	KSİLEN	1 SAAT
KAPATMA	ENTELLAN	

5.4.3. Ovaryum Dokularının İmmunohistokimyasal Yöntem ile Analizi

İmmunohistokimyasal analiz için kesitler gece boyunca 60 °C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün ksilen içerisinde 1 saat bekletilerek deparafinize edildi. Preparatlar daha sonra sırası ile %96'lık, %80'lik, %70'lik, %60'lık alkol serilerinde 2 dakika bekletildikten sonra distile su içine alındı. Distile su 2 kez 5 dakika olacak şekilde değiştirildi. İmmunohistokimya kalemi (Pap-Pen, Invitrogen, UK) ile etrafında hidrofobik alan oluşturulan kesitler 3 kez 5 dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Daha sonra dokulardaki proteinleri çapraz bağları yıkamak için 37

°C’de 15 dakika tripsin (TSS155, ScyTek Laboratories, USA) uygulandı. Kesitler 3 kez 5 dakika tekrar PBS ile yıkandıktan sonra doku örneklerine endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3’lük H₂O₂ (K40391897, Merck, GER) uygulandı. Daha sonra kesitler tekrar 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı ve 1 saat bloklama solüsyonu (859043-histostain plus broad spectrum, Invitrogen, USA) ile inkübe edildi. Kesitlerden solüsyon uzaklaştırıldı ve anti-Cep 55 (sc-377018, Santa Cruz, USA), anti-Foxl2 (19672-1-AP, ProteinTech, UK), anti-Hsp27 (sc-13132, Santa Cruz, USA), anti-Cdk4 (sc-23896, Santa Cruz, USA), anti-Nobox (sc-514178, Santa Cruz, USA), anti-Konneksin 37 (40-4300 Thermo Fisher Scientific, UK), anti-Konneksin 43 (sc-59949, Santa Cruz, USA), anti-ADAMTS1(sc-47727, Santa Cruz, USA) ve anti-ADAMTS9 (orb100101, Biorbyt, UK) primer antikorları kullanılarak +4°C’de 16 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda PBS ile 3x5 dk yıkanan kesitler 30 dakika biotinlenmiş sekonder antikor (859043-histostain plus broad spectrum, Invitrogen, USA) ile inkübe edildi. Kesitlerin 3x5 dk PBA ile yıkanmasının ardından kesitlere 30 dakika streptavidin-HRP (859043-histostain plus broad spectrum, Invitrogen, USA) uygulandı ve tekrar PBS ile yıkandı. İmmunoreaktivitenin görünür hale gelmesi için DAB (Diaminobenzidin Kromojen, DAB Kit, (ACK125, ScyTek, USA) uygulanan kesitler, Mayer’s Hematoksilen (ScyTek Laboratories, USA) ile artalan boyaması yapılarak alkolden geçirilip, ksilen ile şeffalaştırma yapılarak entellan (107961; Merck, GER) ile kapatıldı (Tablo 8).ve ışık mikroskobu altında incelendi (Olympus BX-43, JP) ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 8. İndirekt immunohistokimya protokolü

İŞLEM	SOLÜSYON	ZAMAN
DEPARAFİNİZASYON	60°C'LİK ETÜVDE	GECE BOYUNCA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%96 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT BUFFER SOLÜSYON(PBS)	3X5 DAKİKA
	PAP PEN	
	TRİPSİN 37°C'DE	10 DAKİKA
	ETÜVDE	
	PBS	3X5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOKLAMA	%3'LÜK HİDROJEN PEROKSİT (H ₂ O ₂)	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
BLOKİNG	BLOKİNG SOLÜSYONU	1 SAAT
PRİMER ANTİKOR	PRİMER ANTİKOR	18 SAAT (+4°C'DE)
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BİOTİNLENMİŞ SEKONDER ANTİKOR	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3X5 DAKİKA
	DAB (DİAMİNO BENZİDİN)	5-10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMASI	MAYER'S HEMATOKSİLEN	1 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	%80 ETİL ALKOL	1 DAKİKA
	%96 ETİL ALKOL	1 DAKİKA
	KSİLEN	1 SAAT
KAPATMA	ENTELLAN	

5.4.4. Oositlerin İmmunofloresan Yöntem ile Analizi

Oositler M2 medyum (M7167, Sigma, USA) içerisine alındıktan sonra herhangi bir işlem yapılmadan %4'lük paraformaldehit ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edildi ve 3x10 dakika %1 gr/ml sığır albümini (BSA, Sigma, A7906, USA) içeren PBS ile yıkandı. Zona pellusidanın oositten ayrılması için distile su içerisinde 140 mM NaCl (Merck, 106404), 3mM CaCl₂.2H₂O (Sigma, C3881), 5mM MgCl₂.6H₂O (Sigma, 63063), %0,1 (w/v) glukoz (Sigma, G8270), ve %0,4 (w/v)

polyvinylpyrrolidone (Sigma, PVP-360) bulunan asit tyroid solusyonunda 30 dakika tutuldu. Zona pellusida ayrılması stereomikroskop (Olympus, SZX07) altında kontrol edildikten sonra oositler %0.1 Triton X-100 (A4975, Applichem, GER) içeren PBS ile 15 dakika inkübe edildi. BSA içeren PBS ile yıkandıktan sonra %10 oranında %1gr/ml BSA içeren PBS ile hazırlanmış normal kuzu serumu (Santa cruz, sc-2488) ile oositler 1 gece +4 °C’de bekletildi. Ertesi sabah oositler anti-Cep 55 (sc-377018, Santa Cruz, USA), anti-Foxl2 (19672-1-AP, ProteinTech, UK), anti-Hsp27 (sc-13132, Santa Cruz, USA), anti-Cdk4 (sc-23896, Santa Cruz, USA), anti-Nobox (sc-514178, Santa Cruz, USA), anti-Konneksin 37 (40-4300 Thermo Fisher Scientific, UK), anti-Konneksin 43 (sc-59949, Santa Cruz, USA), anti-ADAMTS1(sc-47727, Santa Cruz, USA) ve anti-ADAMTS9 (orb100101, Biorbyt, UK) primer antikorları ile 30-36 saat +4 °C’de bekletildi. Sonraki gün %1 gr/ml BSA içeren PBS ile 3x10 dakika yıkama yapıldıktan sonra 1/500 oranında %1 gr/ml BSA içeren PBS ile Anti-Cep 55, anti-Hsp27, anti-Cdk4, anti-Nobox, anti-Konneksin 37, anti-ADAMTS1 primer antikorları için goat anti-mouse FITC (AP308F, Millipore, GER), anti-Foxl2, anti-Konneksin 43, anti-ADAMTS9 için goat anti-rabbit Rodamin (sc-2091, Santa Cruz, USA) sekonder antikoru karanlık ortamda bir gece +4°C’de bekletildi. Ertesi gün oositler %1 gr/ml BSA içeren PBS ile 3x10 dk yıkama yapıldıktan sonra 1/10 oranında DAPI (Cell signaling technology, 4083S, USA) içeren kapatma ortamına (sc-24941, Santa Cruz, USA) alındı (Tablo 9) ve floresan ataçmanlı inverted mikroskop altında incelendi (Olympus IX71, JP) ve görüntüleri kaydedildi.

Tablo 9. Oositler için immunofloresan protokolü

İŞLEM	SOLÜSYON	ZAMAN
FİKSASYON	PARAFORMALDEHİT	30 DAKİKA
YIKAMA	%1 gr/ml BSA'lı PBS	3X10 DAKİKA
ZONA PELLUSİDA'NIN AYRILMASI	ASİT TYRODE	30 DAKİKA
YIKAMA	%1 gr/ml BSA'lı PBS	3X10 DAKİKA
PERMEABİLİZASYON	%0.1 TRİTON X-100 içeren PBS	15 DAKİKA
YIKAMA	%1 gr/ml BSA'lı PBS	3X10 DAKİKA
BLOKİNG	BSA'LI PBS ile HAZIRLANMIŞ NORMAL KEÇİ SERUMU	18 SAAT (+4°C'DE)
PRİMER ANTİKOR	PRİMER ANTİKOR	30-36 SAAT (+4°C'DE)
YIKAMA	%1 gr/ml BSA'lı PBS	3X10 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	SEKONDER ANTİKOR	18 SAAT (+4°C'DE)
YIKAMA	%1 gr/ml BSA'lı PBS	3X10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3X5 DAKİKA
ÇEKİRDEK BOYAMASI	DAPI	1 DAKİKA
YIKAMA	%1 gr/ml BSA'lı PBS	3X10 DAKİKA
KAPATMA	KAPATMA ORTAMI	

Tablo 10. Histokimyasal ve immunohistokimyasal analizlerde kullanılan malzemelerin listesi

MALZEME	FİRMA	KATALOG NO	ÜLKE
KSİLEN	SURGİPATH	-----	USA
ETİL ALKOL	ALKOMED	-----	BULGARİA
PBS	BİOSHOP	PBS404.100	CANADA
TRİPSİN	SCYTEK LABORATORİES	TSS155	USA
PAP PEN	İNVİTROGEN	-----	UK
TRİTON X-100	APPLICHEM	A4975, 0100	GERMANY
HİDROJEN	MERCK	LOT NO:	GERMANY.
PEROKSİT		K40391897 935	
SEKONDER	INVITROGEN	859043	USA
ANTİKOR		HİSTOSTAİN PLUS BROAD SPECTRUM	
DAB	SCYTEK	ACK125	USA
MAYER'S	SCYTEK	LOT NO: 12081	USA
HEMATOKSİLEN	LABORATORİES		
ENTELLAN	MERCK	10-20/21	GERMANY
BSA	SIGMA	A7906	USA
NaCl	MERCK	106404	GERMANY
CaCl ₂ .2H ₂ O	SIGMA	C3881	USA
MgCl ₂ .6H ₂ O	SIGMA	63063	USA
GLUKOZ	SIGMA	G8270	USA
POLYVİNYLPYRR	SIGMA	PVP-36	USA
OLİDONE			
FITC	MILLIPORE	AP308F	GERMANY
RHODAMİNE	SANTA CRUZ	sc-2091	USA
DAPI	CELL SIGNALING TECNOLOGY	4083S	USA
KAPATMA ORTAMI	SANTA CRUZ	sc-24941	USA
ANTİ-CEP55	SANTA CRUZ	sc-377018	USA
ANTİ-FOXL2	PROTEİNTech	19672-1-AP	UK
ANTİ-HSP27	SANTA CRUZ	sc-13132	USA
ANTİ-CDK4	SANTA CRUZ	sc-23896	USA
ANTİ-NOBOX	SANTA CRUZ	sc-514178	USA
ANTİ-CX37	THERMO FISHER SCIENTIFIC	40-4300	UK
ANTİ-CX43	SANTA CRUZ	sc-59949	USA
ANTİ-ADAMTS1	SANTA CRUZ	sc-47727	USA
ANTİ-ADAMTS9	BİORBYT	orb100101	UK

5.5. İMMUNOFLORESAN GÖRÜNTÜLERİN IMAGE J İLE ANALİZİ

İmmunofloresan boyamaları yapılan oositlerin gruplar arasındaki yoğunluk farkının kantitatif olarak ölçülmesi için Image J (1.50i, National Institutes of Health, USA) görüntü analiz yöntemi kullanıldı. Analiz için her gruptan X10 büyüklükteki 5 oositin tiff formatındaki görüntüleri kullanıldı. Görüntüler Image J programında Type sekmesinden 8-bit siyah ve beyaz görüntüye dönüştürüldü. Daha sonra Adjust sekmesi içindeki Threshold kısmı seçildi. Threshold, her bir oositi en iyi tanımlayan bir seviye için manuel olarak ayarlandı. Oval veya Freehand simgesi kullanarak taslak çizildi. Seviye belirlendikten sonra, siyah beyaz bir görüntü oluşturmak için Apply'a tıklandı ve bunu takiben Analyze sekmesi altında Measure (Cmd+M) kısmına tıklanarak oositlerin yoğunlukları ölçüldü. Ölçüm sonucunda çıkan değerlerin Düzeltilmiş Total Hücre Floresanı Değeri (CTCF) değeri hesaplandı (Rinaldi ve ark. 2018; Potapova ve ark. 2011). Hesaplama için; “Corrected Integrated Density (CTCF) = Integrated Density (Area of selected cell x Mean fluorescence of background readings)” formülü kullanıldı (Potapova ve ark. 2011).

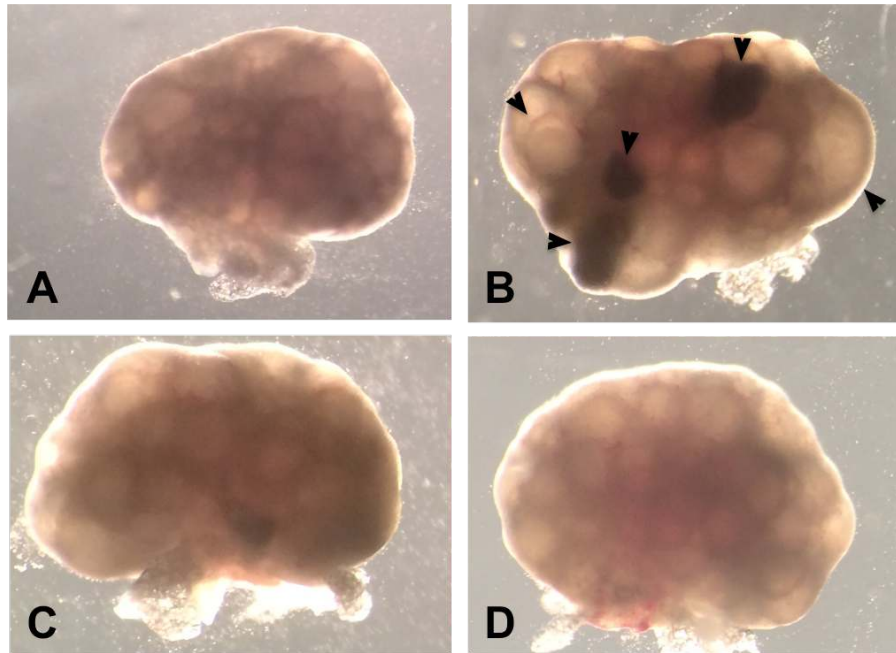
5.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar tüm grupların CTCF değerleri hesaplandıktan sonra ortalamaları ve standart sapmaları alınarak hesaplandı. Elde edilen veriler SPSS Version 18 kullanılarak grupların ortalamaları arasında fark için, Merkezi Limit Teoremi'ne göre her grupta 30'dan az parametre bulunduğundan (n=5), non-parametrik test olan Kruskal-Wallis H testi ile değerlendirildi ve $p<0,05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. $p<0,05$ olan gruplara farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Mann Whitney U testi yapıldı ve $p<0,01$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafikler GraphPad Prism 5 programı kullanılarak elde edildi.

6. BULGULAR

6.1. OVARYUMLARIN MORFOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

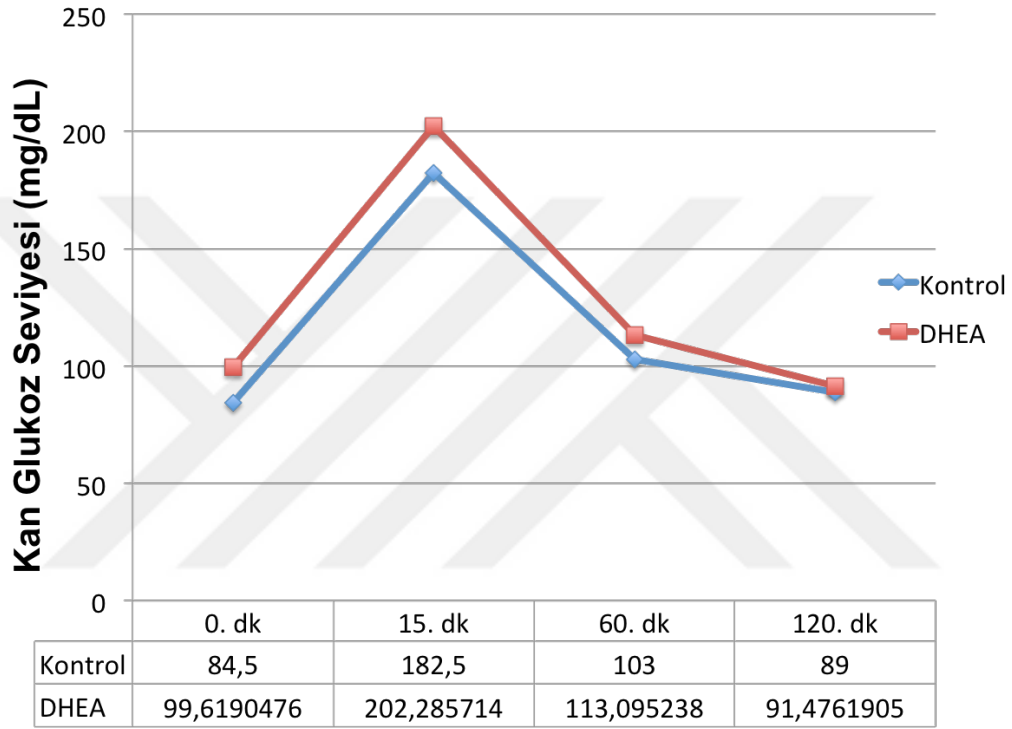
Ovaryumlar elde edildikten sonra stereomikroskop altında morfolojik olarak incelendiğinde, Grup 1'e ait ovaryumların yüzeylerinin düzgün olduğu, çeşitli büyüklüklerde ovaryan foliküllerin olduğu gözlemlendi (Resim 1A). Grup 2'ye ait ovaryumlar incelendiğinde ise ovaryumların yüzeylerinin girintili çıkıntılı olduğu, çeşitli büyüklüklerde foliküllerin yanı sıra kistik yapıların varlığı saptandı, ayrıca kan damarlarının yüzeyde belirgin hale geldiği gözlemlendi (Resim 1B). Grup 3 ve Grup 4'e ait ovaryumların Grup 1'deki kontrol ovaryumları ile benzer özellik gösterdikleri, yüzeylerin düzgün ve çeşitli büyüklüklerde foliküllerin olduğu tespit edildi (Resim 1C, 1D).



Resim 1. Tüm gruplara ait farelerden elde edilen ovaryumların stereo mikroskobik görüntüleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C), Grup (4). Ok başları: Ovaryumda hemorajik kistik yapılar. Ölçek: X60.

6.2. GLUKOZ TOLERANS TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Grup 1 ve Grup 2' ye uygulanan Glukoz tolerans testi sonucunda bazal glukoz seviyesinin kontrol grubu olan Grup 1 ile karşılaştırıldığında, sadece DHEA uygulanan Grup 2'de deneysel PKOS modeline uygun şekilde yüksek olduğu bulundu. Bazal glukoz seviyesinin yüksek olması ile birlikte glukoz toleransının bozulduğu gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Grup 1 ve Grup 2 için glukoz tolerans testi grafiği (n = 8).

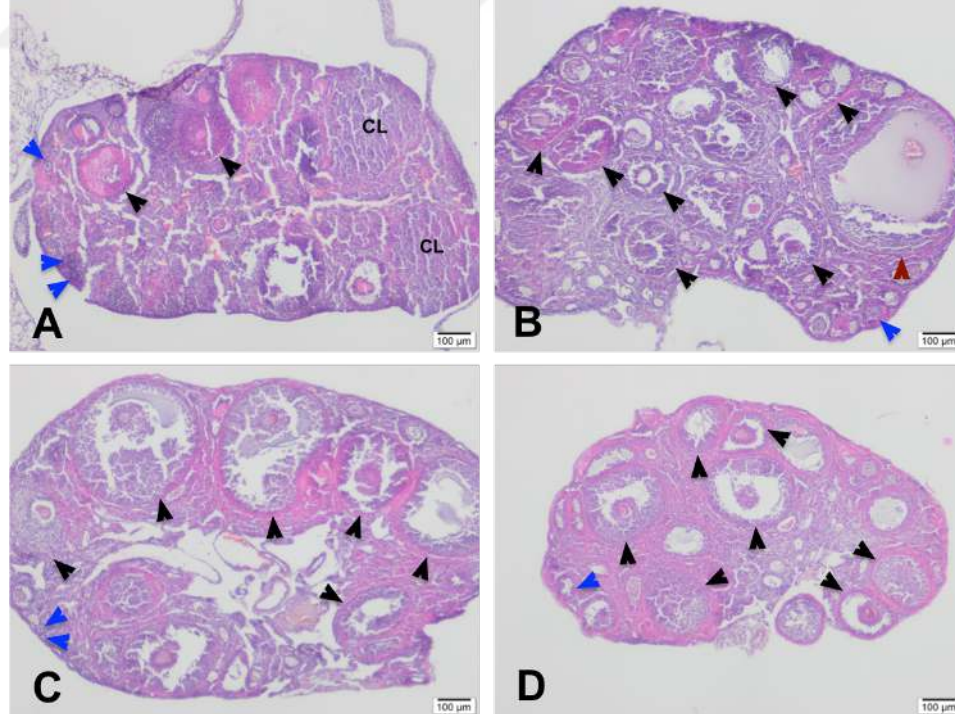
6.3. OVARYUM DOKULARININ HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm gruplara ait farelerden alınan ovaryumların histolojik değerlendirilmesi Hematoksilen-Eozin boyaması ile yapıldı. Grup 1'deki ovaryumlarda korteks ve medullanın normal olduğu, kortekste etrafında tek katlı yassı hücrelerin bulunduğu primordiyal foliküller, tek katlı kübik ve çok katlı kübik granüloza hücrelerinden oluşan primer foliküller, antrumu yeni oluşan ya da antrumları gelişmiş sekonder foliküller ve oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin ve antrumu çevreleyen granüloza hücreleri ile birlikte, geniş antruma sahip tersiyer foliküllerin bulunduğu

izlendi (Resim 2A). Medullada kan damarları ve az miktarda gevşek bağ dokusu gözlemlendi (Resim 2A).

DHEA uygulanan grup 2 ovaryum örneklerinde ovaryum korteksinin gelişmekte olan ovaryan foliküller ile dolu olduğu, yer yer atretik foliküllerin bulunduğu gözlemlendi (Resim 2B). Bazı foliküllerde kanlanmanın arttığı, bazı foliküllerde ise folikül büyüklüğünün beklenen foliküler hücre özeliğine göre daha fazla olduğu saptandı. Granüloza hücre tabakasının büyük foliküllerde ince olduğu izlendi. Atreziye giden foliküllerin granüloza hücre sitoplazmalarında, lipit birikimine bağlı luteinizasyonların yanısıra ovaryan stromal hücre sitoplazmalarında da lipit birikimi tespit edildi (Resim 2B).

Grup 3 ve grup 4'e ait ovaryum örneklerinde farklı farklılaşma sürecinde olan foliküllerin olduğu, büyük ve kanlanması artmış foliküllerin olmadığı, grup 1 kontrol grubu ile benzer olduğu gözlemlendi (Resim 2C, D, sırasıyla). Folikülerdeki granüloza ve teka hücrelerinin normal folikül farklılaşma süreci ile uyumlu olduğu görüldü. Medulla'da kan damarlarının ve az miktarda bağ dokusunun olduğu tespit edildi (Resim 2C, D, sırasıyla).

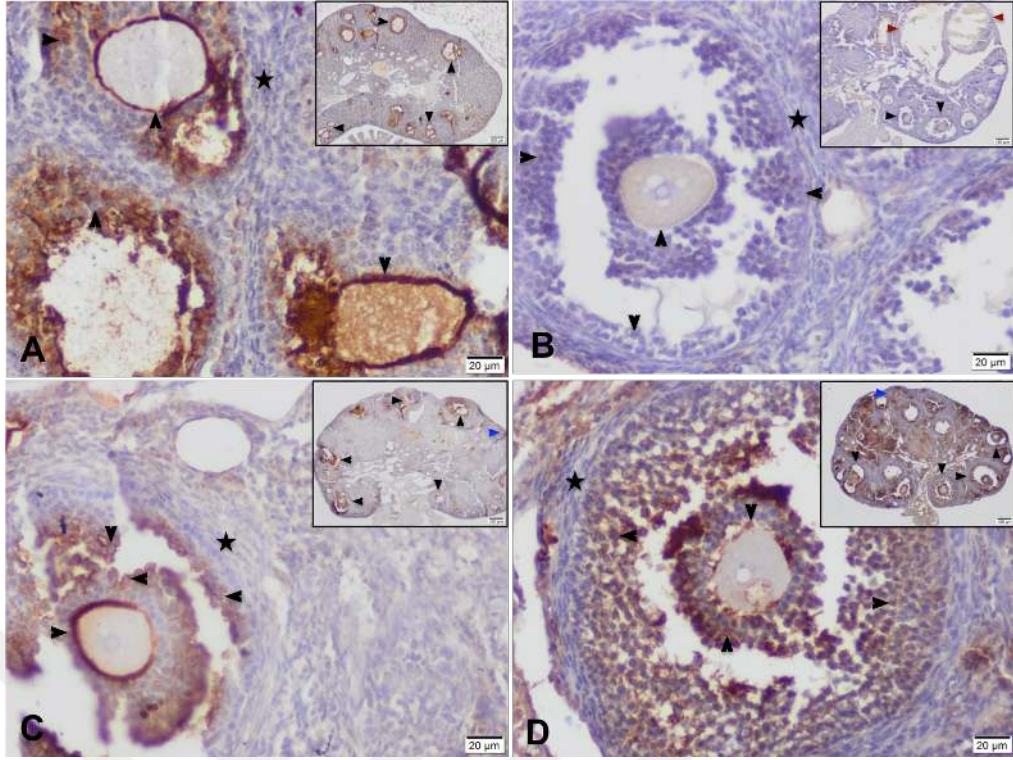


Resim 2. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum kesitlerinin Hematoksilen-Eozin ile boyanma görüntüleri. Mavi ok başı: Primoridyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül. Ölçek: 100µm.

6.4. OVARYUM DOKULARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRİLMESİ

6.4.1. Cep55 immunoreaktivitesi

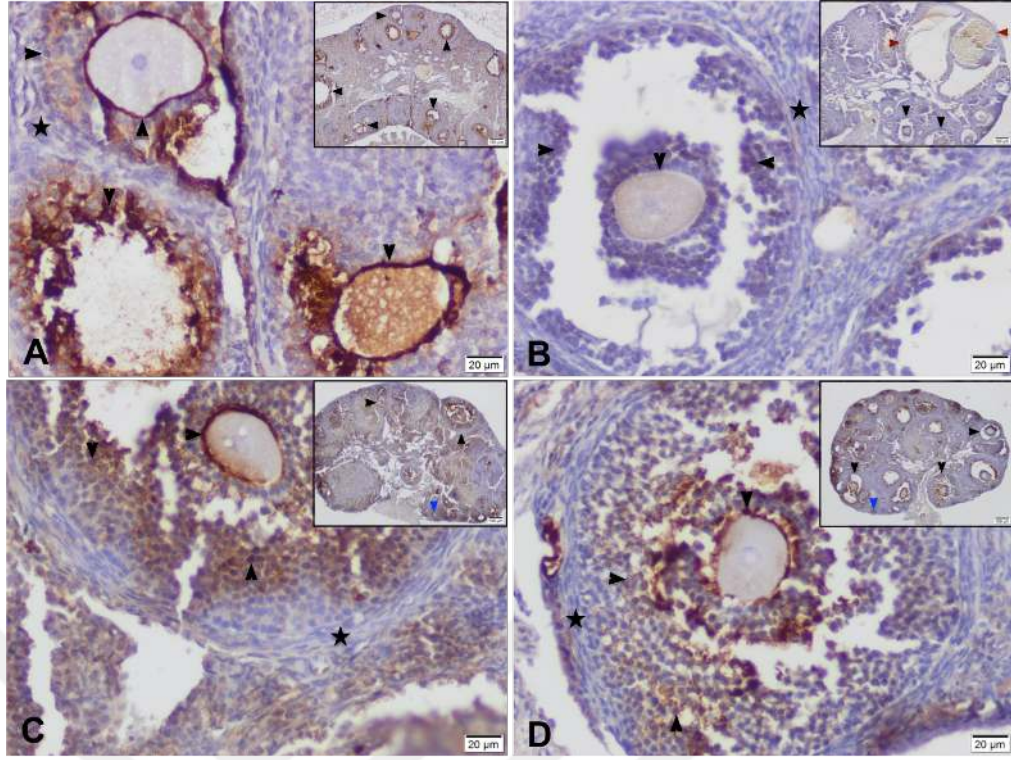
Cep55 immunoreaktivitesinin Grup 1’de farklılaşma sürecindeki tüm foliküllerde oosit ve granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) pozitif olduğu gözlemlendi. Stromal hücrelerde orta şiddette (++) immunoreaktivite belirlenir iken, teka eksternada immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 3A). Grup 2’de kistik foliküllerin antral granüloza hücrelerinde ve farklılaşma sürecindeki tüm foliküllerde oosit ve granüloza hücrelerinde zayıf (+) immunoreaktivite tespit edildi (Resim 3B). Grup 3’te primer folikül oositlerinde kuvvetli (+++), granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) Cep55 immunoreaktivitesi gözlenir iken, sekonder ve tersiyer folikül oositlerinde ve granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) immunoreaktivite saptandı (Resim 3C). Grup 4’te primer foliküllerdeki oositlerde immunoreaktivitenin azalarak orta şiddette (++) olduğu tespit edilirken, sekonder ve tersiyer folikül oositlerinde ve granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) Cep 55 immunoreaktivitesi belirlendi (Resim 3D).



Resim 3. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Cep55 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.2. Cdk4 immunoreaktivitesi

Cdk4 immunoreaktivitesinin Grup 1'de farklılaşma sürecindeki tüm foliküllerde oosit ve granüloza hücrelerinde kuvvetli pozitif (+++) olduğu, bazı primer foliküllerin granüloza hücrelerinde orta/kuvvetli şiddette (++) olduğu izlendi (Resim 4A). Grup 2'de ise kistik foliküllerin antral hücrelerinde zayıf (+) Cdk4 immunoreaktivitesi gözlemlendi. Sekonder foliküllerin bazılarında orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlenirken bazılarında zayıf şiddette (+) olduğu, primer foliküllerde ve granüloza hücrelerinde de zayıf (+) şiddette Cdk4 immunoreaktivitesi tespit edildi (Resim 4B). Grup 3'te primer foliküllerde zayıf (+) immunoreaktivite varken, sekonder ve tersiyer foliküllerdeki oositlerde ve granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 4C). Grup 4'te tüm Cdk4 immunoreaktivitesi sekonder ve tersiyer folikül oositlerinde ve granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) primer foliküllerde ise zayıf (+) idi (Resim 4D).

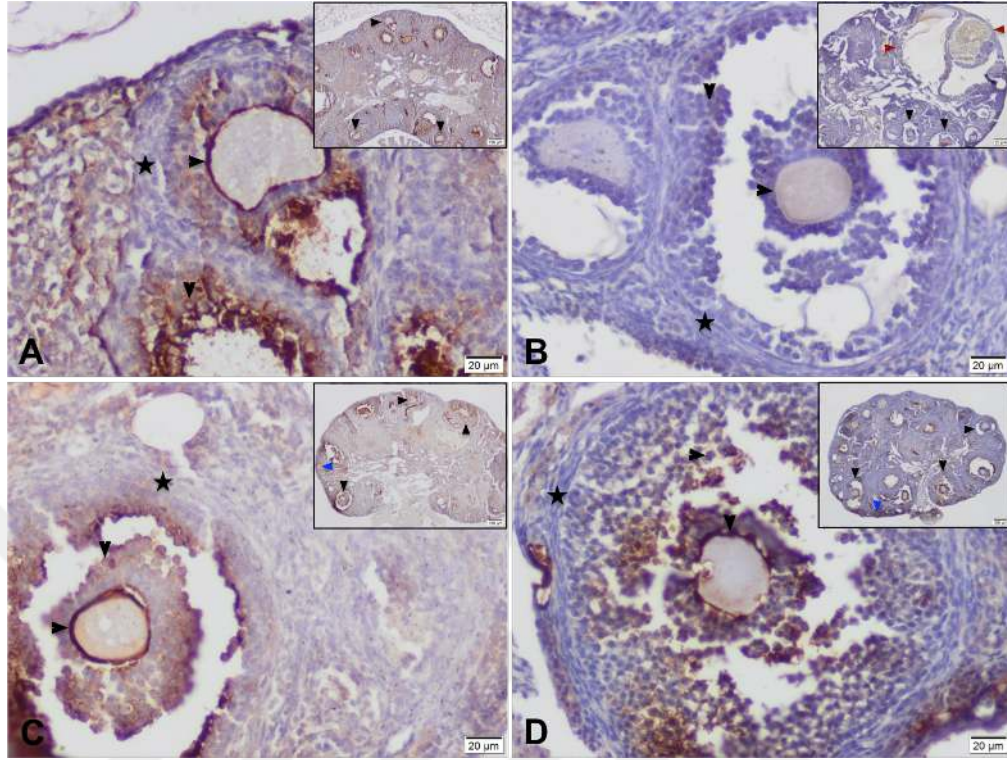


Resim 4. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Cdk4 immunohistokimyasal analiz görüntüleri Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.3. Hsp27 immunoreaktivitesi

Hsp27 immunoreaktivitesinin Grup 1'deki tüm foliküllerde ve stromal hücrelerde pozitif olduğu görüldü. Sekonder ve tersiyer foliküllerdeki oositlerde, antral granüloza hücrelerinde ve primer foliküllerin oositlerinde kuvvetli (+++), primer foliküllerin antral granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite olduğu gözlemlendi (Resim 5A). Ovaryan stromal hücrelerde de orta şiddette (++) immunoreaktivite tespit edildi. Grup 2'de kistik foliküllerdeki antral granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) ve bazı sekonder foliküllerde orta şiddette (++) ve yer yer zayıf (+) Hsp27 immunoreaktivitesi gözlemlendi (Resim 5B). Stromal hücrelerde immunoreaktivite negatif idi. Grup 3'de sekonder ve tersiyer foliküllerin oositleri ve granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlemlendi. Primer foliküllerin oosit ve granüloza hücreleri zayıf (+) immunoreaktivite gösterirken, primordiyal foliküllerde herhangi bir immunoreaktivite gözlemlenmedi (Resim 5C). Grup 4'te sekonder ve tersiyer folikül oositlerinde kuvvetli (+++) immunoreaktivite

görüldü. Bazı granüloza hücreleri kuvvetli (+++) immunoreaktivite gösterirken, bazılarının orta şiddette (++) immunoreaktivite gösterdiği gözlemlendi (Resim 5D).

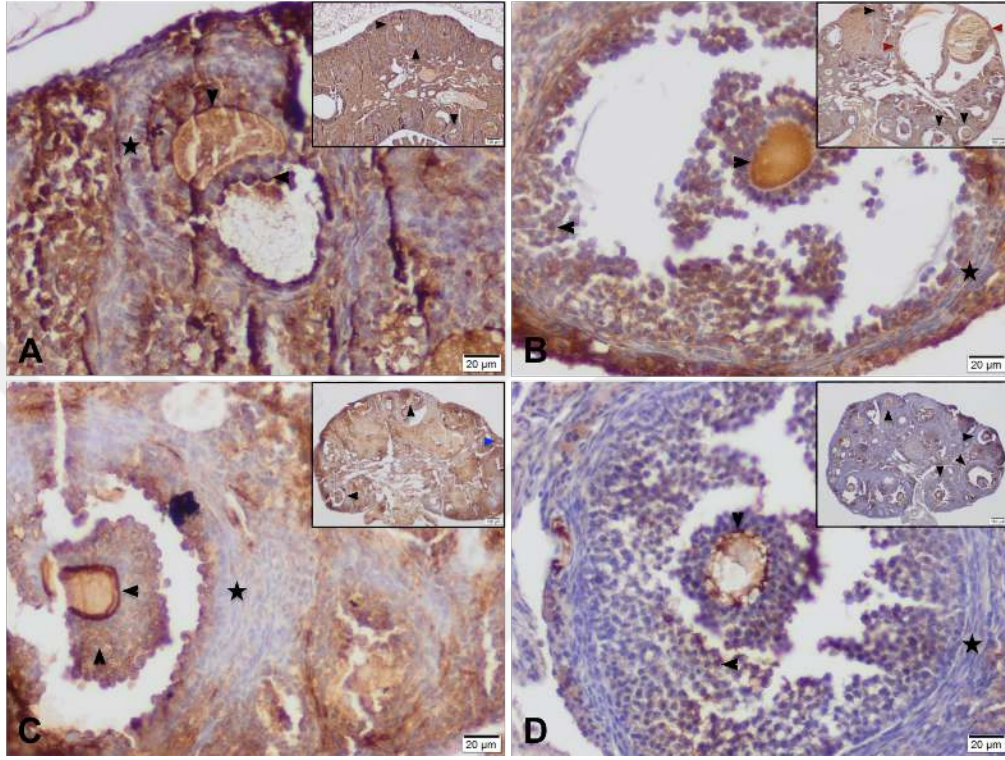


Resim 5. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Hsp27 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.4. Nobox immunoreaktivitesi

Nobox immunoreaktivitesi Grup 1'de farklılaşma sürecindeki tüm foliküllerde oosit ve granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) immunoreaktivite gözlenirken sekonder ve tersiyer foliküllerdeki teka eksternada immunoreaktivite negatif olarak belirlendi. Stromal hücreler de foliküller ile benzer immunoreaktivite tespit edildi (Resim 6A). Grup 2 kistik foliküllerinin granüloza hücrelerinde ve sekonder foliküllerin oosit ve granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlenirken, primer foliküllerdeki oositlerde zayıf (+) Nobox immunoreaktivitesi gözlemlendi. Primer foliküllerdeki granüloza hücreleri de orta şiddette (++) stromal hücrelerde zayıf (+) Nobox immunoreaktivitesi izlendi (Resim 6B). Grup 3'te sekonder ve tersiyer foliküllerdeki oositler ve granüloza hücrelerinde, primer foliküllerde, primordiyal foliküllerde ve stromal hücrelerde orta şiddette (++)

immunoreaktivite gözlemlendi. Teka eksternada immunoreaktivite gözlemlenmedi (Resim 6C). Grup 4'te sekonder ve tersiyer folikül içindeki oositlerde ve antral granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlemlenirken, sekonder folikülün diğer granüloza hücrelerinde ve stromal hücrelerde zayıf (+) immunoreaktivite gözlemlendi. Teka eksternada herhangi bir immunoreaktivite gözlemlenmedi (Resim 6D).

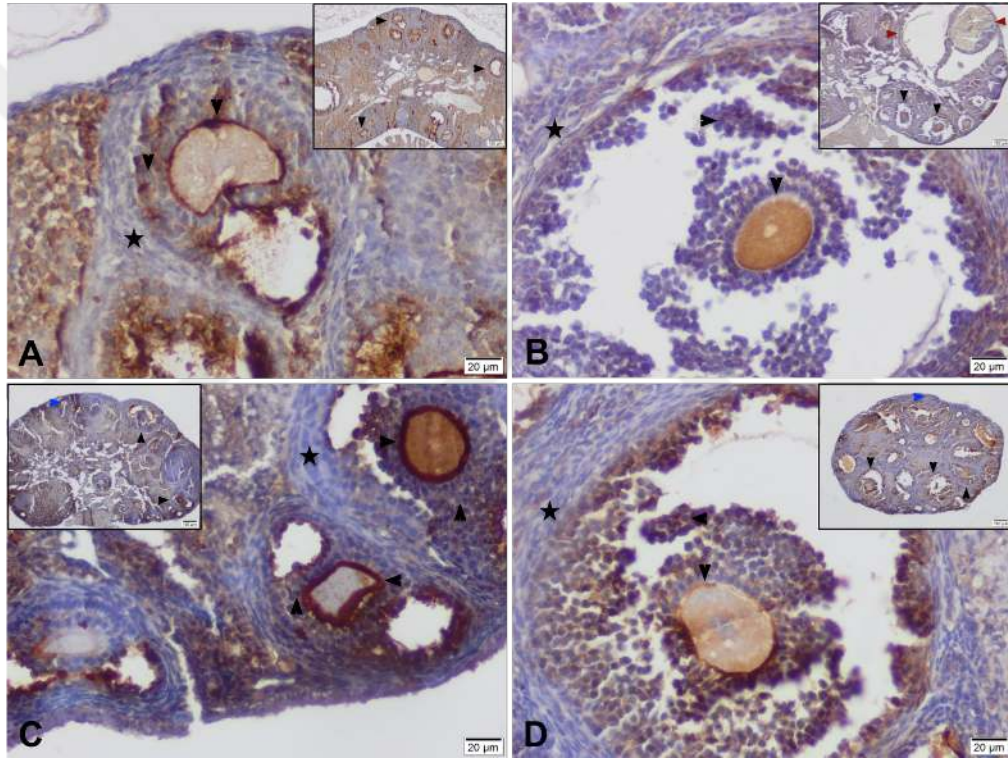


Resim 6. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Nobox immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.5. Foxl2 immunoreaktivitesi

Foxl2 immunoreaktivitesi Grup 1'de sekonder ve tersiyer foliküllerdeki oositlerde ve antral granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) iken, antrumu yeni oluşan sekonder foliküllerde ve diğer granüloza hücrelerinde orta (++) şiddette immunoreaktivite olduğu gözlemlendi (Resim 7A). Primer foliküllerde ve primordiyal foliküllerde orta şiddette (++) immunoreaktivite saptandı. Grup 2 'de kistik foliküllerin antral granüloza hücrelerinde, sekonder foliküllerin oosit ve antral granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite görüldü. Primer foliküllerde, primordiyal foliküllerde ve ovaryumun stromal hücrelerinde zayıf (+) immunoreaktivite gözlemlendi.

(Resim 7B). Teka eksternada immunoreaktivite negatif olarak tespit edildi. Grup 3'te sekonder ve tersiyer foliküllerdeki oositlerde Foxl2 kuvvetli (+++) immunoreaktivite gözlenirken, primer foliküllerde immunoreaktivite zayıf (+) tespit edildi. Sekonder ve tersiyer foliküllerde özellikle kumulus ooforus hücrelerinde immunoreaktivitenin orta şiddette (++) olduğu, diğer granüloza hücrelerinde orta (++) ve kuvvetli (+++) şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 7C). Grup 4'te ise sekonder ve tersiyer foliküldeki oositlerde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlenirken, granüloza hücrelerinde immunoreaktivitenin artarak kuvvetli şiddette (+++) olduğu belirlendi. Primer ve primordiyal foliküllerde immunoreaktivitenin orta şiddette (++) olduğu gözlemlendi (Resim 7D).

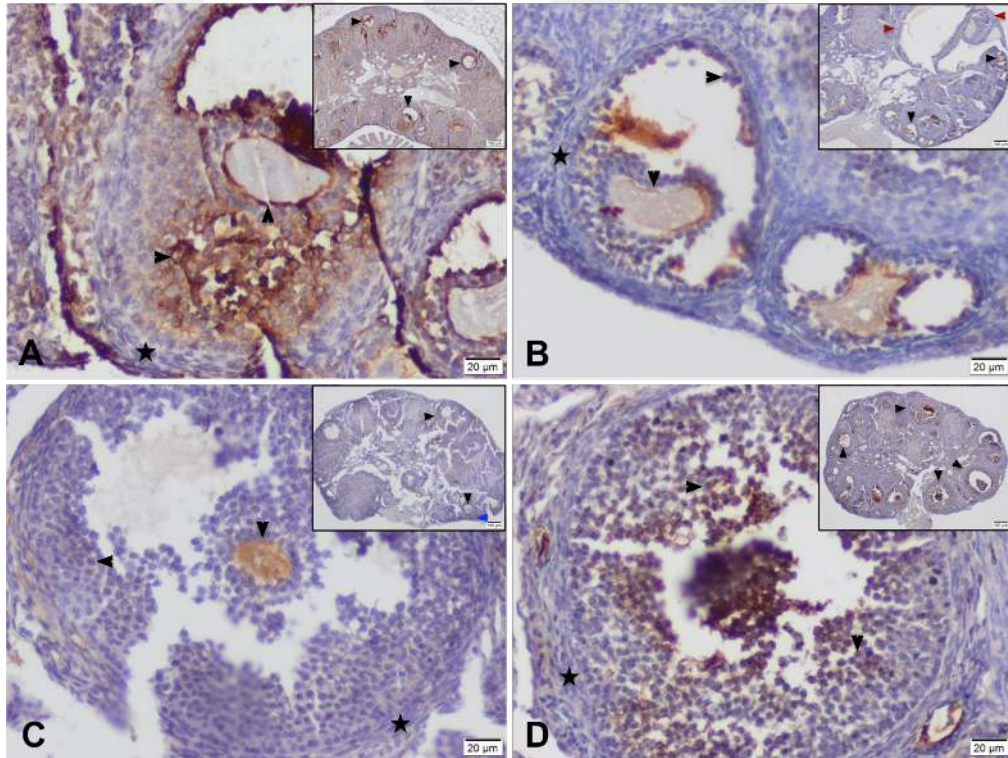


Resim 7. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Foxl2 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.6. Konneksin 37 immunoreaktivitesi

Oosit ve granüloza hücreleri arasında iletişimde rol oynayan Konneksin 37 immunoreaktivitesi, Grup 1'de sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde ve granüloza hücrelerinde orta/kuvvetli şiddette (++) immunoreaktivite olduğu,

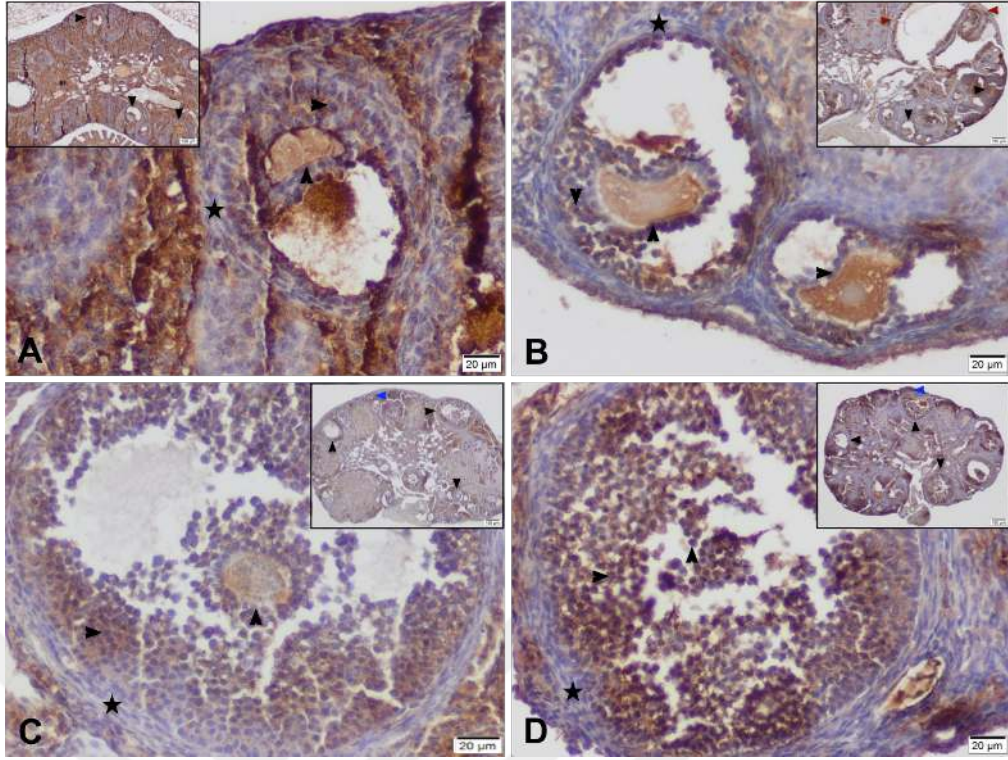
özellikle antral granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) konneksin 37 immunoreaktivitesinin pozitif olduğu belirlendi (Resim 8A). Grup 2’de kistik foliküllerin antral granüloza hücrelerinde ve primer foliküllerde zayıf (+) konneksin 37 immunoreaktivitesi gözlenirken, sekonder foliküllerdeki oositlerde ve sekonder foliküllerin antral granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite tespit edildi (Resim 8B). Grup 3’te sekonder ve tersiyer folikül oositlerinde orta şiddette (++) granüloza hücrelerinde zayıf şiddette (+) immunoreaktivite gözlenirken, primordiyal foliküllerde, primer foliküllerde ve tersiyer folikülünde teka eksternada ve stromal hücrelerde immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 8C). Grup 4’te primordiyal foliküllerde zayıf (+) immunoreaktivite gözlenirken, primer foliküllerdeki oositlerde ve granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 8D). Sekonder ve tersiyer folikül oosit ve antral granüloza hücreleri primer foliküllere benzer olarak orta şiddette (++) immunoreaktivite tespit edildi (Resim 8D). Stromal hücreler ve tüm foliküllerin teka eksternalarında immunoreaktivite gözlenmedi.



Resim 8. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4’e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Konneksin 37 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.7. Konneksin 43 immunoreaktivitesi

Granüloza hücreleri arasındaki iletişimde rol oynayan Konneksin 43, immunoreaktivitesi Grup 1’de sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde ve antral granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) iken, sekonder foliküllerin diğer granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlemlendi. Primer foliküllerin oositlerinde ve granüloza hücreleri ile stromal hücrelerde sekonder foliküllere benzer şekilde kuvvetli (+++) immuoreaktivite var iken teka eksterna da immunoreaktivite gözlemlenmedi (Resim 9A). Grup 2’de kistik foliküllerin granüloza hücreleri, sekonder foliküllerde ve primer foliküllerde kuvvetli (+++) immunoreaktivite gözlemlendi. Teka eksterna da immunoreaktivite gözlemlenmezken, stromal hücrelerde zayıf (+) konneksin 43 immunoreaktivitesi tespit edildi (Resim 9B). Grup 3’te primer folikül oositlerinde ve granüloza hücrelerinde zayıf (+) immunoreaktivite gözlemlenirken, sekonder ve tersiyer folikül oositlerinde ve granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) gözlemlendi (Resim 9C). Grup 4’te sekonder ve tersiyer foliküllerde oositler orta şiddette (++) , granüloza hücreleri kuvvetli şiddette (+++) immunoreaktivite gösterirken, primer foliküllerde oositler zayıf (+), granüloza hücreleri orta (++) ve kuvvetli şiddette (+++) immunoreaktivite gösterdi. Stromal hücreler zayıf ve orta şiddette (+/++) immunoreaktivite belirlendi. Teka eksternada immunoreaktivite gözlemlenmedi (Resim 9D).

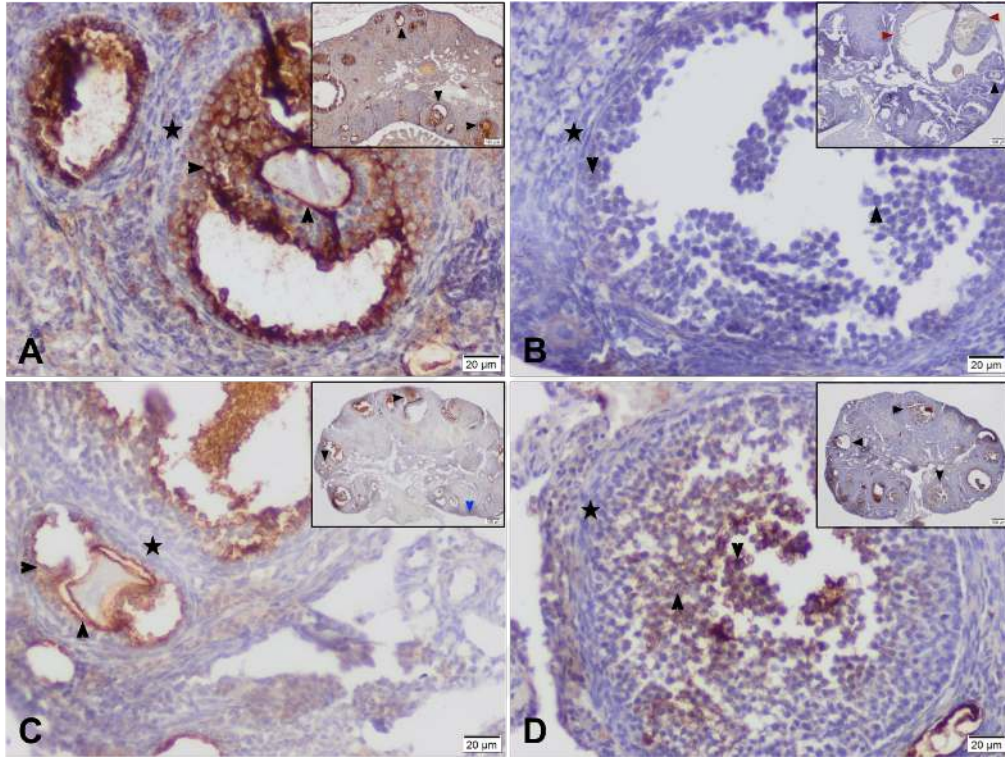


Resim 9. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Konneksin 43 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.8. Adamts-1 immunoreaktivitesi

Grup 1'de primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde ve granüloza hücrelerinde Adamts-1 kuvvetli (+++) immunoreaktivite tespit edildi. Stromal hücreler zayıf (+) immunoreaktivite gösterirken, teka eksternada herhangi bir immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 10A). Grup 2'de kistik foliküllerin antral granüloza hücrelerinde zayıf (+) immunoreaktivite gözlemlendi. Sekonder foliküllerin oositlerinin bazıları orta şiddette (++) immunoreaktivite gösterirken, bazıları zayıf (+) immunoreaktivite gösterdi. Sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde zayıf (+) immunoreaktivite belirlendi. Primer foliküller, primordiyal foliküller, stromal hücreler ve teka eksternada immunoreaktivite negatif olarak gözlemlendi (Resim 10B). Grup 3'te sekonder ve tersiyer foliküllerdeki oositlerde ve granüloza hücrelerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlenirken, primordiyal ve primer foliküllerde immunoreaktivite gözlenmedi. Primer foliküllerin antral granüloza hücrelerinde sekonder foliküllerin oositlerine benzer şekilde orta şiddette (++) immunoreaktivite

tespit edildi. Stromal hücrelerde ve teka eksternada immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 10C). Grup 4’te sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde ve granüloza hücrelerinde kuvvetli (+++) immunoreaktivite belirlendi. Primer foliküllerde, stromal hücrelerde ve teka eksternada immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 10D).

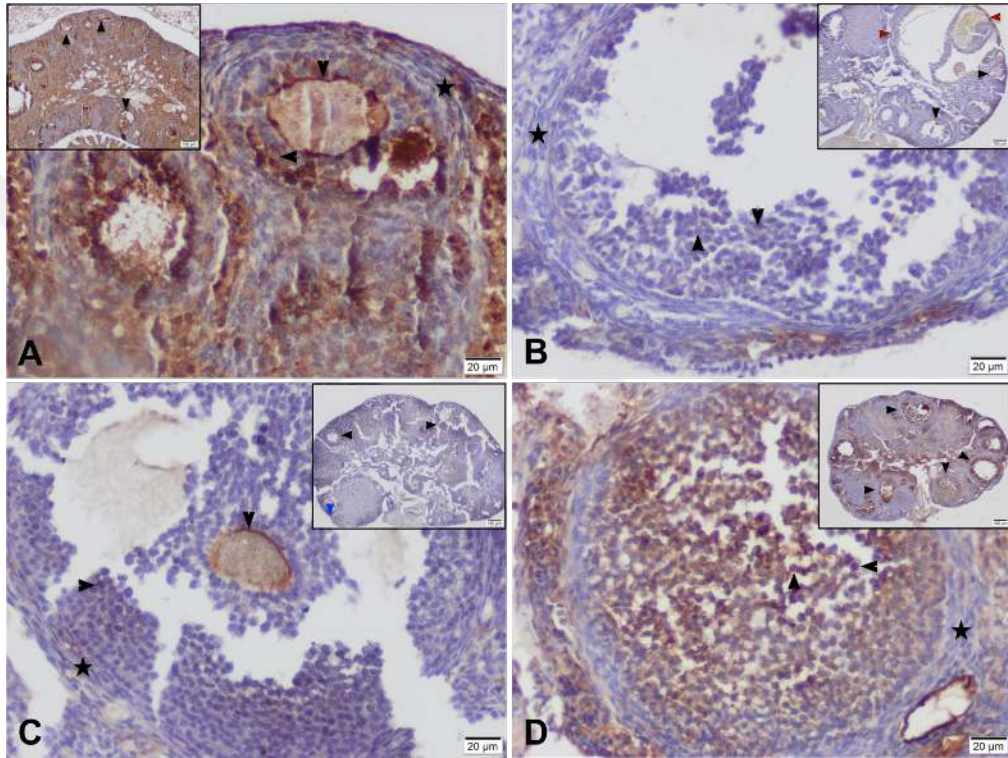


Resim 10. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4’e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Adamts-1 immunohistokimyasal analiz görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

6.4.9. Adamts-9 immunoreaktivitesi

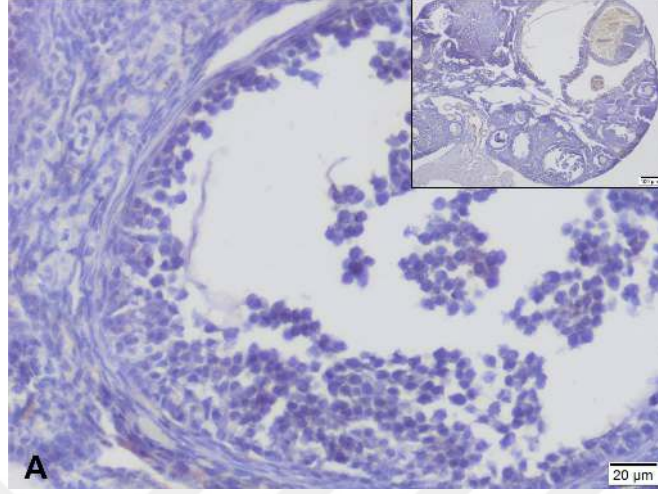
Adamts-9 immunoreaktivitesi Grup 1’de primer, sekonder, tersiyer foliküllerde ve stromal hücrelerde kuvvetli (+++) immunoreaktivite gözlemlendi. Teka eksternada immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 11A). Grup 2’de kistik foliküllerin granüloza hücrelerinde zayıf (+) immunoreaktivite gözlenirken, sekonder foliküllerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite, granüloza hücrelerinde ise zayıf (+) immunoreaktivite gözlemlendi. Primer ve primordiyal foliküllerde immunoreaktivite zayıf (+) olarak tespit edildi (Resim 11B). Stromal ve teka eksternada immunoreaktivite gözlenmedi. Grup 3’te sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde orta şiddette (++) immunoreaktivite gözlenirken antral granüloza

hücrelerinde zayıf (+) immunoreaktivite gözlemlendi. Primordiyal ve primer foliküller ile tersiyer foliküllerdeki teka eksternada immunoreaktivite gözlenmedi. Stromal hücrelerdeki immunoreaktivite zayıf (+) olarak tespit edildi (Resim 11C). Grup 4'te sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde ve granüloza hücrelerinde orta (++) ve kuvvetli şiddette (+++) immunoreaktivite gözlenirken (Resim 11D), primer foliküllerde zayıf (+), primordiyal foliküllerde orta (++) stromal hücrelerde zayıf (+) immunoreaktivite belirlendi ve teka eksternada ise immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 11D).



Resim 11. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4'e (D) ait ovaryum doku örneklerinde Adamts-9 immunohistokimyasal analiz görüntüleri görüntüleri. Mavi ok başı: Primordiyal folikül, Primer folikül, Siyah ok başı: Sekonder ve Tersiyer folikül, Kırmızı ok başı: Kistik folikül, Yıldız: Teka eksterna. Ölçek; A-D: 50 µm; küçük resimler: 100 µm.

Tüm gruplar ait ovaryum doku kesitlerine yapılan immunohistokimyasal boyamalarda negatif kontrollerde herhangi bir immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 12).



Resim 12. Grup 2'ye ait ovaryum kesitinde immunohistoperoksidaz yönteminin negatif kontrole ait görüntüleri. Ölçek; A: 50 µm; küçük resim: 100 µm.

6.4. OOSİTLERİN İMMUNOFLORESAN DEĞERLENDİRİLMESİ

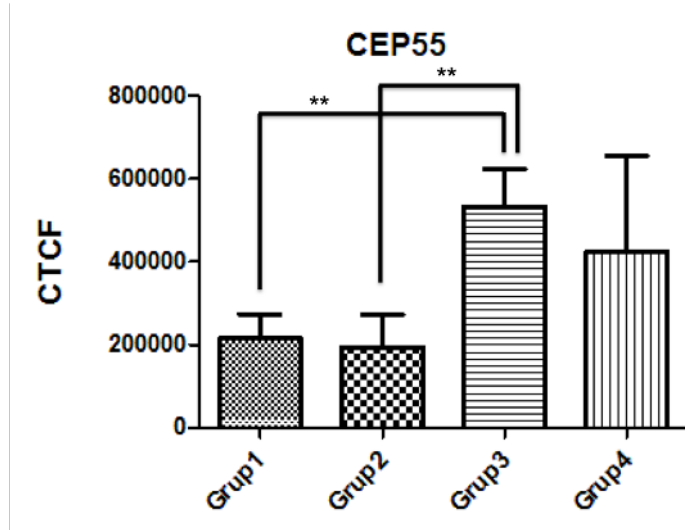
Tüm grupların immunofloresan boyamaları 100'lük büyütme ile görüntülenen 5 adet oositin Image J görüntü analiz programı kullanılarak elde edilen CTCF değerleri hesaplandı ve istatistiksel olarak analiz edildi. Cep 55, Cdk 4, Hsp27 antikorumları için boyama yapılırken, Nobox ve Foxl2, Konneksin 37 ve Konneksin 43, Adamts-1 ve Adamts-9 antikorumları için aynı örnek üzerinde ikili boyama yapıldı. Bundan dolayı sonuçlar verilir iken tekli boyamalar ayrı olarak, ikili boyamalar ise birlikte verilmiştir.

6.5.1. Cep55

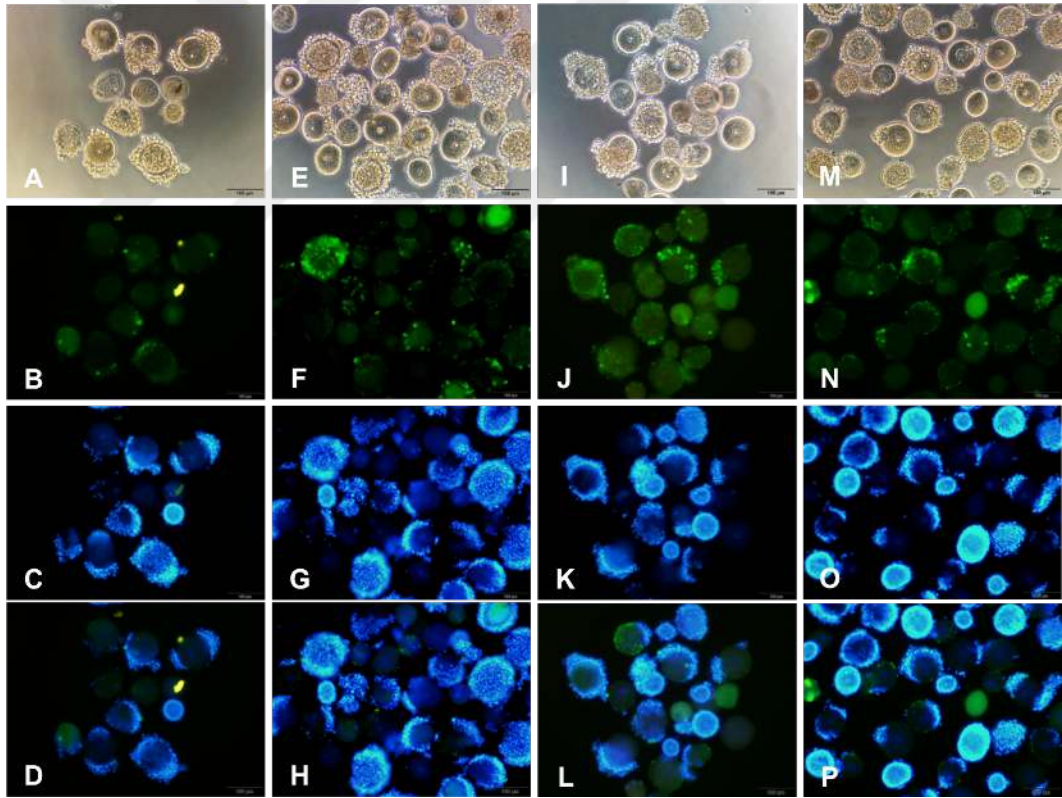
Cep55 immunoreaktivitesi Grup 1' de (Resim 13B, 14B) ve Grup 2'deki (Resim 13F, 14F) oositlerde zayıf (+) gözlenirken, Grup 3'te (Resim 13J, 14J) kuvvetli pozitif (++++) gözlemlendi. Grup 4'teki (Resim 13N, 14N) immunofloresan yoğunluğunun orta şiddette (++) olduğu belirlendi. Gruplar arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1'in (Resim 13-14; A-D) immunofloresan yoğunluğu Grup 2'ye göre (Resim 13-14; E-H) yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$, Tablo 11). Grup 2'de Cep55 immunofloresan yoğunluğu diğer gruplara göre düşük olduğu ve Grup 2 ile Grup 3 immunofloresan yoğunlukları karşılaştırıldığında Grup 3'ün (Resim 13-14; I-L) immunofloresan yoğunluğu ise anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0,01$, Tablo 11). Grup 2'ye göre, Grup 4'ün (Resim 13-14; M-P) immunofloresan yoğunluğu yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$, Tablo 11, Şekil 12).

Tablo 11. Tüm gruplara ait Cep55 antikorumunun CTCF değerleri.

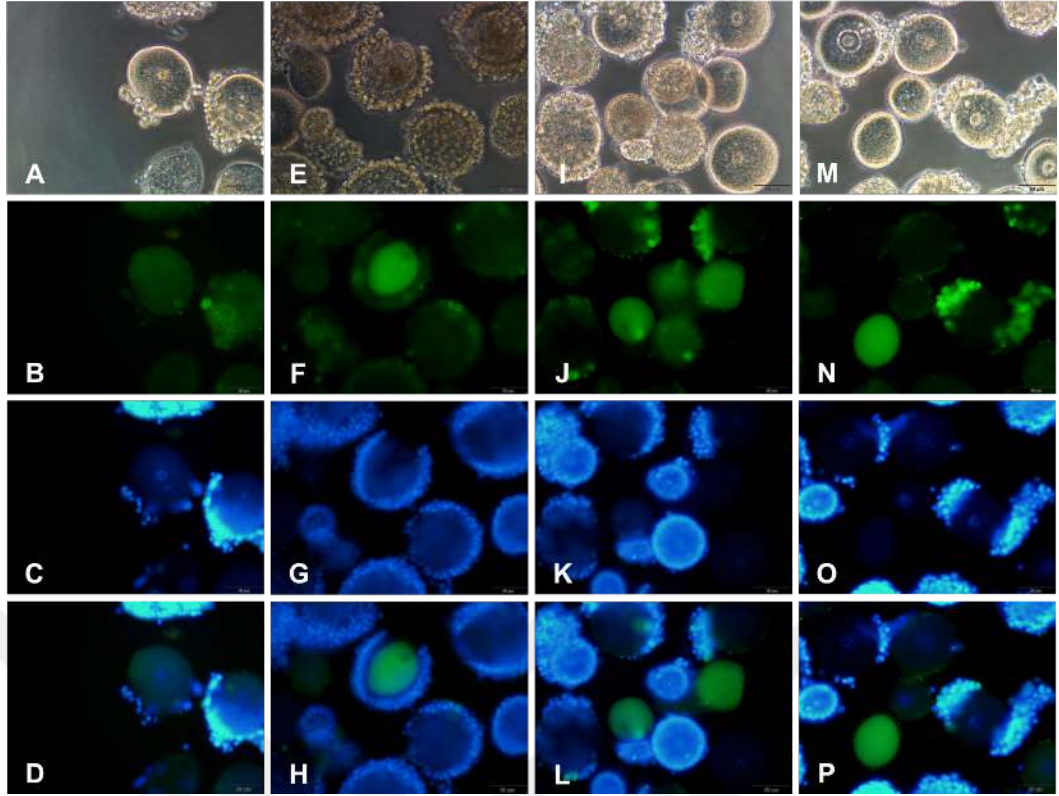
Deney Grupları	Cep55, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	215948,644±58198,64722
Grup 2 (PKOS grubu)	193561,724±80106,36398
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	532880,704±91389,84841
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	425039,118±230612,225



Şekil 12. Tüm gruplara ait oositlerdeki Cep55 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi (**p<0,01).



Resim 13. Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cep55 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cep55, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm.



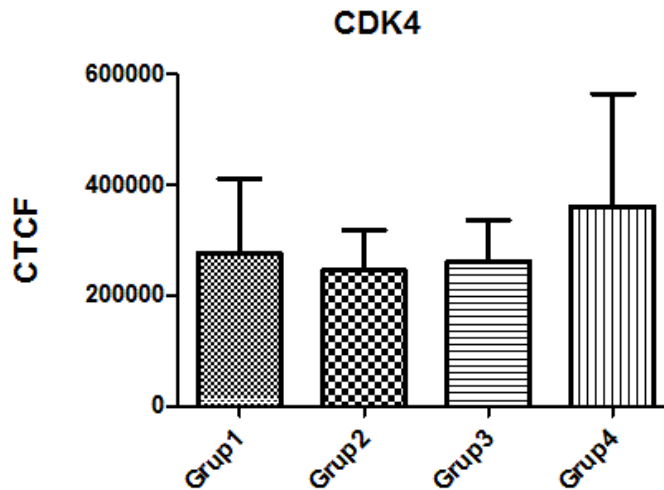
Resim 14. Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cep55 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cep55, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm.

6.5.2. Cdk4

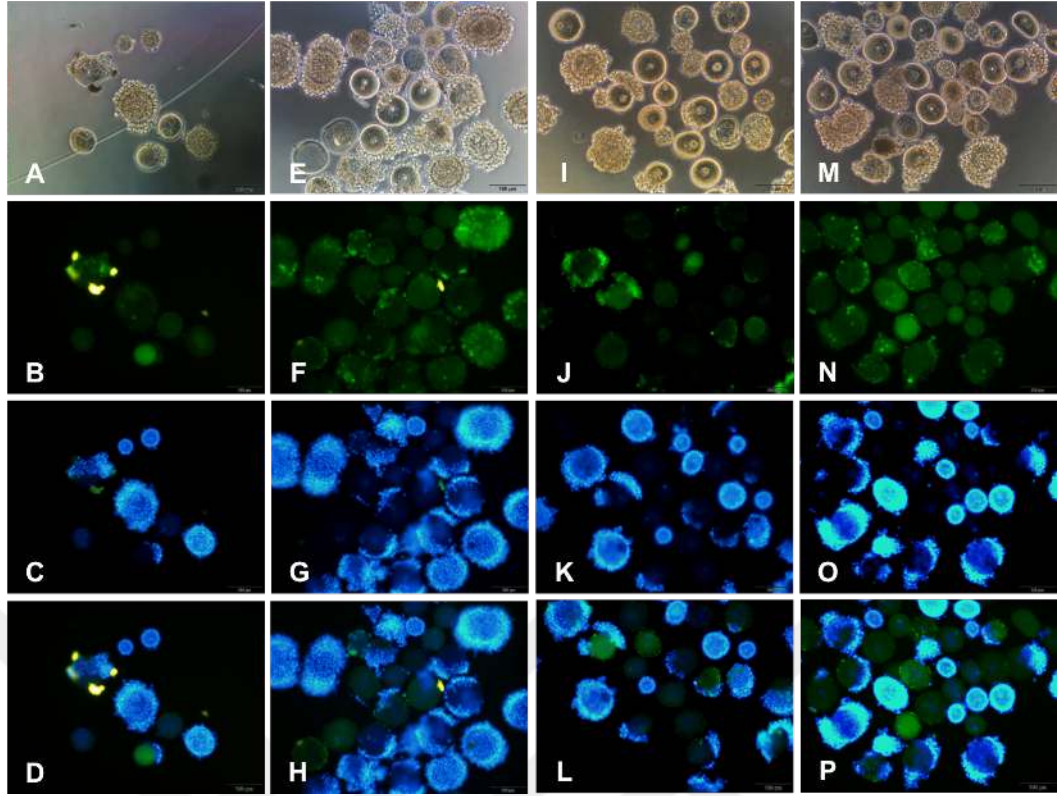
Cdk4 immunoreaktivitesi Grup 1’ de (Resim 15B, 16B), Grup 2’de (Resim 15F, 16F) ve Grup 3’te (Resim 15J, 16J) oositlerde orta şiddette (++) gözlenirken, Grup 4’te (Resim 15N, 16N) kuvvetli (+++) olduğu belirlendi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1’in (Resim 15-16; A-D) immunofloresan yoğunluğu Grup 2’ye göre (Resim 15-16; E-H) yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark bulunamadı. Grup 2 ile Grup 3 arasındaki immunofloresan yoğunluğu incelendiğinde, Grup 3’ün (Resim 15-16; I-L) immunofloresan yoğunluğu yüksek olmasına rağmen iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p>0,05$, Tablo 12). Grup 2 ile Grup 4’ün (Resim 15-16; M-P) immunofloresan yoğunluğu karşılaştırıldığında Grup 4’ün immunofloresan yoğunluğu yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$, Tablo 12, Şekil 13).

Tablo 12. Tüm gruplara ait Cdk4 antikorunun CTCF değerleri

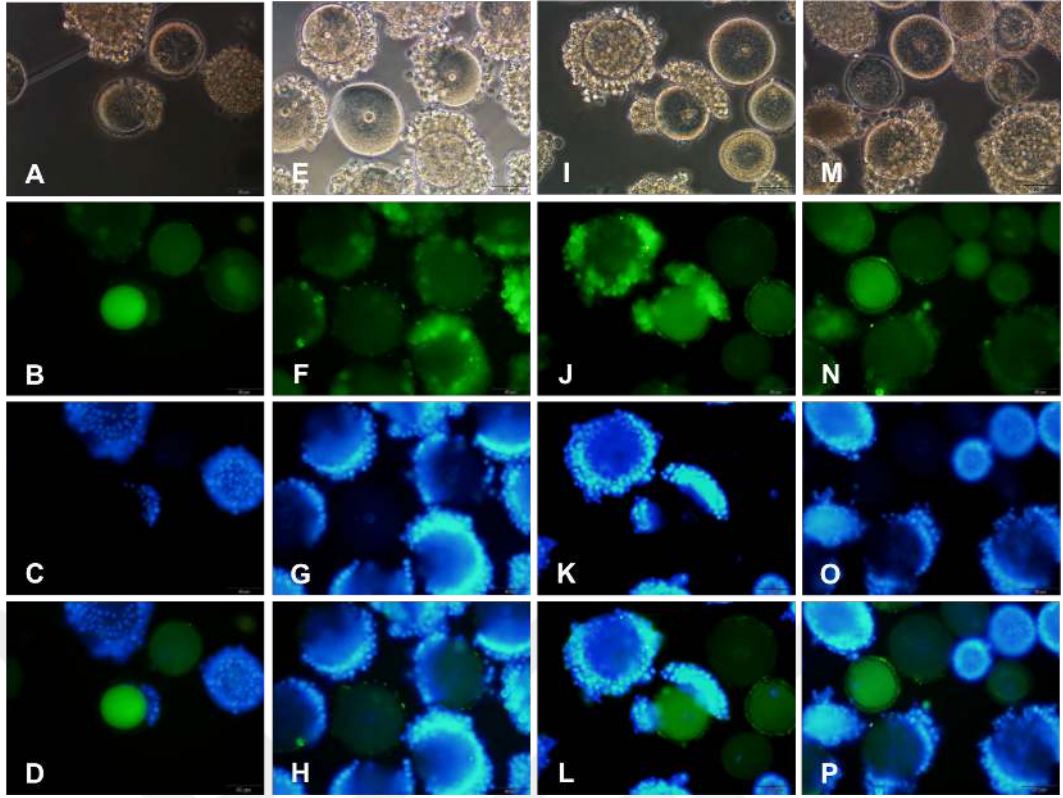
Deney Grupları	Cdk4, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	275572,874±136172,2955
Grup 2 (PKOS grubu)	246288,532±71950,91694
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	265289,23±81064,31269
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	361596,986±201999,3295



Şekil 13. Tüm gruplara ait oositlerdeki Cdk4 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi ($p>0,05$).



Resim 15. Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cdk4 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cdk4, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 μ m.



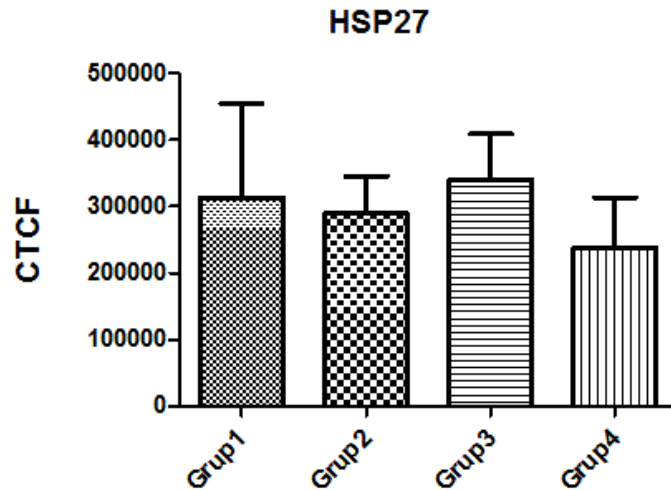
Resim 16. Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Cdk4 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Cdk4, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 μ m.

6.5.3. Hsp27

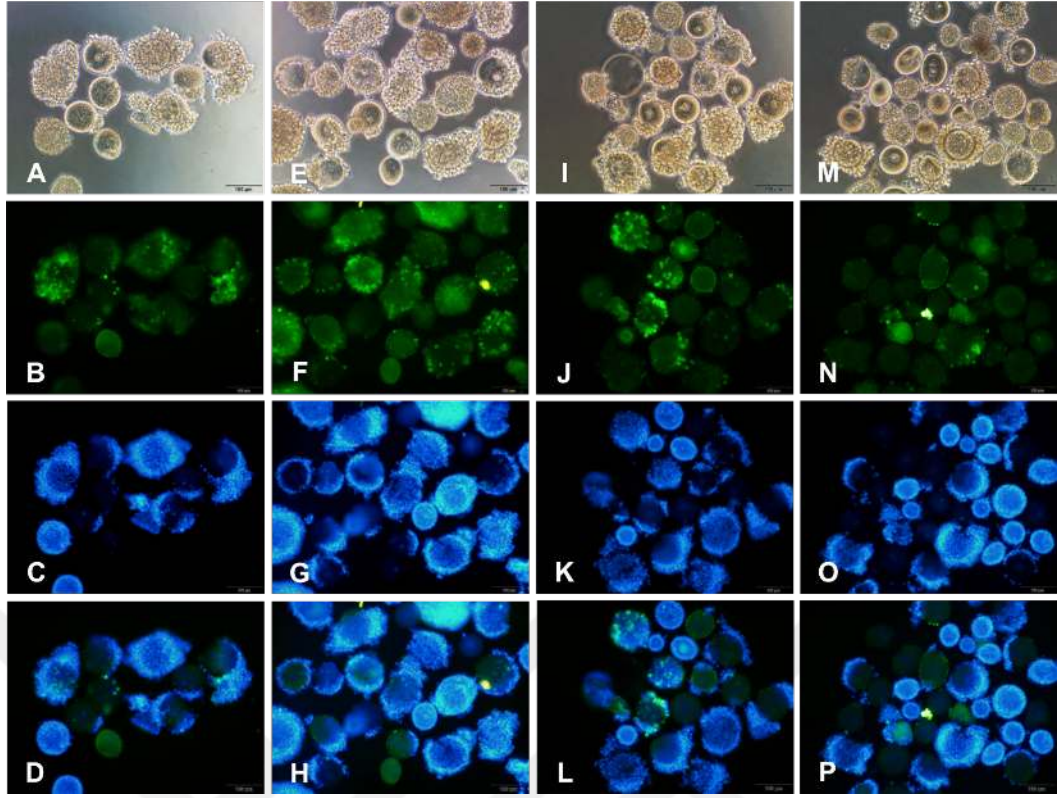
Hsp27 immunoreaktivitesi yoğunluğu Grup 1’de (Resim 17B, 18B) ve Grup 3’de (Resim 17J, 18J) kuvvetli (+++) izlenirken Grup 2’de (Resim 17F, 18F) ve Grup 4’te (Resim 17N, 18N) orta şiddette (++) izlendi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1’in (Resim 17-18; A-D) immunofloresan yoğunluğu Grup 2’ye göre (Resim 17-18; E-H) yüksek bulundu, ancak aralarında anlamlı bir fark belirlenemedi. Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğu Grup 3’e göre (Resim 17-18; I-L) düşük olmasına rağmen anlamlı bulunamadı. ($p>0,05$, Tablo 13). Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğunun Grup 4’e göre (Resim 17-18; M-P) daha yüksek olduğu belirlendi ve aralarında fark anlamlı gözlenmedi ($p>0,05$, Tablo 13, Şekil 14).

Tablo 13. Tüm gruplara ait Hsp27 antikorunun CTCF değerleri

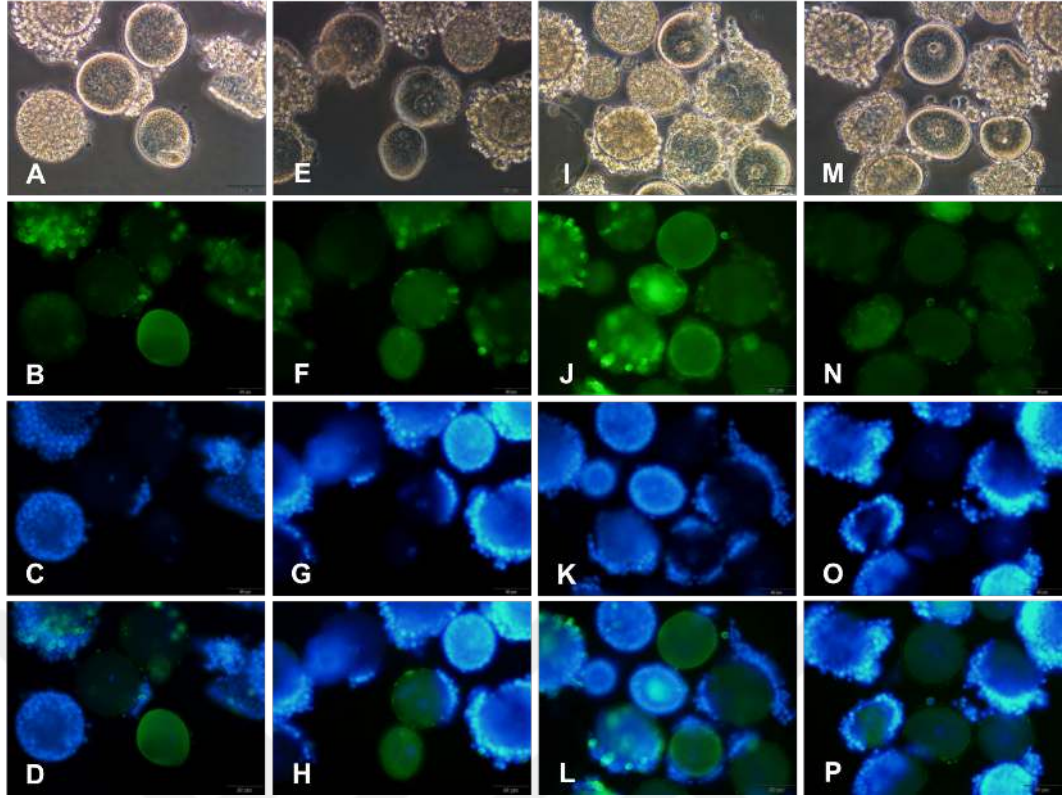
Deney Grupları	Hsp27, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	313449,118±157461,5368
Grup 2 (PKOS grubu)	288973,39±63727,90256
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	339610,05±68832,12642
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	237453,272±84566,93277



Şekil 14. Tüm gruplara ait oositlerdeki Hsp27 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi ($p>0,05$).



Resim 17. Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Hsp27 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Hsp27, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm.



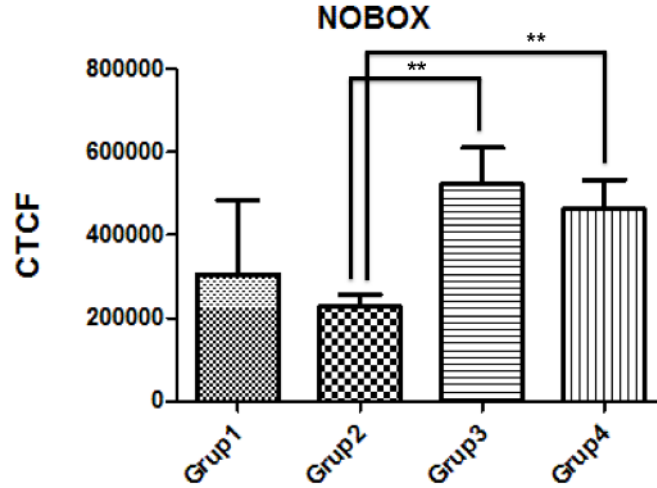
Resim 18. Grup 1 (A-D), Grup 2 (E-H), Grup 3 (I-L) ve Grup 4'e (M-P) ait oositlerin faz kontrast (A, E, I, M), Hsp27 (B, F, J, N), DAPI (C, G, K, O) ve merge (D, H, L, P) görüntüleri. Yeşil: Hsp27, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 μ m.

6.5.4. Nobox ve Foxl2

Nobox immunoreaktivitesi yoğunluğu Grup 1'de (Resim 19B, 20B) orta şiddette (++) gözlenirken, Grup 2'de (Resim 19F, 20F) zayıf (+) gözlemlendi. Grup 3'te (Resim 19J, 20J) ve Grup 4'te (Resim 19N, 20N) immunofloresan yoğunluğunun kuvvetli (+++) olduğu tespit edildi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1'in (Resim 19-20; A-E) immunofloresan yoğunluğu Grup 2'ye (Resim 19-20; F-J) göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$). Grup 2'nin immunofloresan yoğunluğunun ise Grup 3'e (Resim 19-20; K-O) göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu ($p<0,01$, Tablo 14). Grup 2'nin immunofloresan yoğunluğu Grup 4 ile (Resim 19-20; P-U) karşılaştırıldığında ise Grup 4'ün anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0,01$, Tablo 14, Şekil 15).

Tablo 14. Tüm gruplara ait Nobox antikoruyla CTCF değerleri

Deney Grupları	Nobox, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	306258,628±177956,4689
Grup 2 (PKOS grubu)	228297,04±27789,98009
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	522688,156±87644,9561
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	462510,008±69761,05941

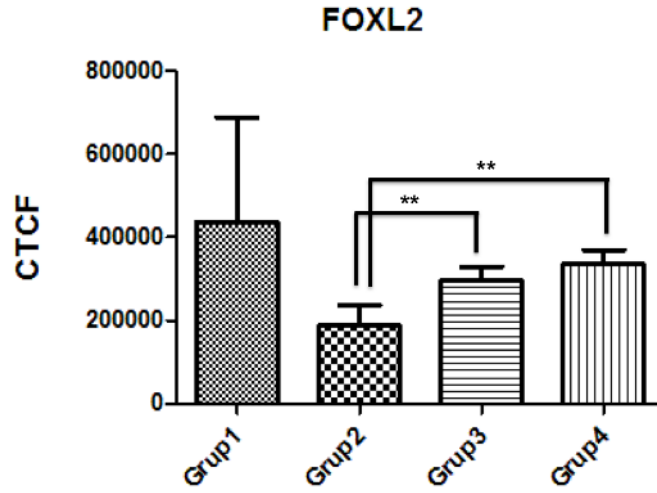


Şekil 15. Tüm gruplara ait oositlerdeki Nobox immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi (**p<0,01).

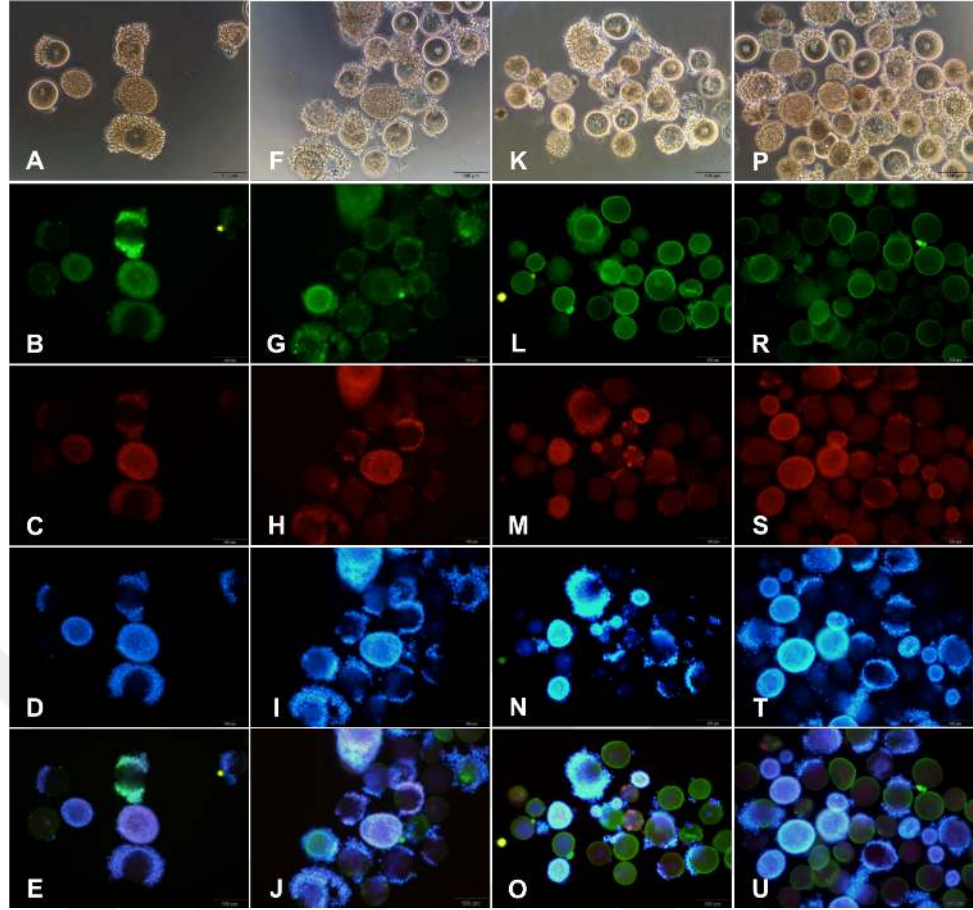
Foxl2 immunoreaktivitesi Grup 1’ de (Resim 19C, 20C) kuvvetli (++) olarak gözlenirken, Grup 2’ de (Resim 19H, 20H) zayıf (+) olarak gözlemlendi. Grup 3’te (Resim 19M, 20M) ve Grup 4’te (Resim 19S, 20S) immunofloresan yoğunluğunun orta şiddette (++) olduğu tespit edildi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1’in (Resim 19-20; A-E) immunofloresan yoğunluğunun Grup 2’ye göre (Resim 19-20; F-J) yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, Tablo 15, Şekil 16). Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğunun Grup 3’e göre (Resim 19-20; K-O) düşük olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,01$, Tablo 15, Şekil 16). Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğu Grup 4 (Resim 19-20; P-U) ile karşılaştırıldığında Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğunun düşük olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p<0,01$, Tablo 15, Şekil 16).

Tablo 15. Tüm gruplara ait Foxl2 antikorunun CTCF değerleri

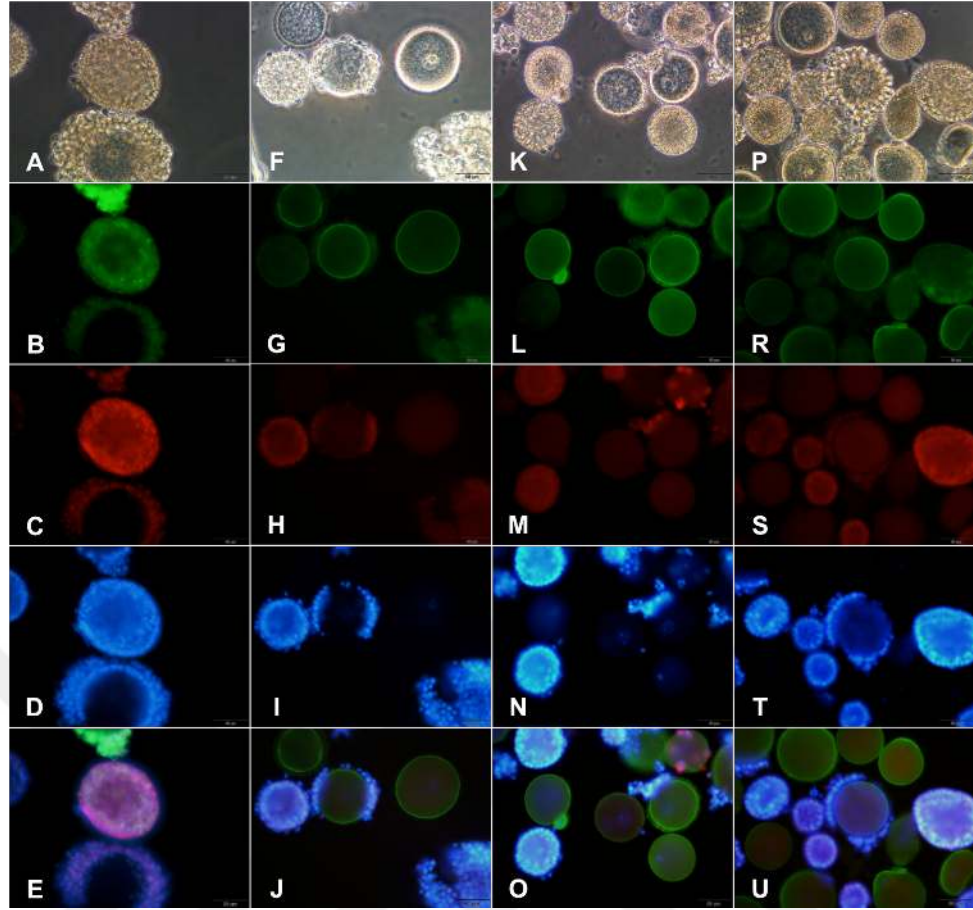
Deney Grupları	Foxl2, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	436696,033±356703,872
Grup 2 (PKOS grubu)	188506,628±59128,98169
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	296417,144±33067,63802
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	334875,31±41406,47374



Şekil 16. Tüm gruplara ait oositlerdeki Foxl2 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi (**p<0,01).



Resim 19. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Nobox (B, G, R, L), Foxl2 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Nobox, Kırmızı: Foxl2, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm.



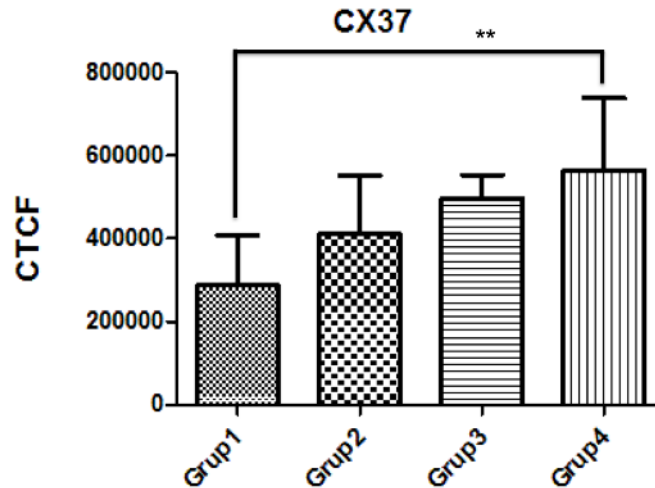
Resim 20. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Nobox (B, G, R, L), Foxl2 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Nobox, Kırmızı: Foxl2, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm.

6.5.5. Konneksin 37 ve Konneksin 43

Konneksin 37 immunoreaktivitesi yoğunluğu Grup 1’ de (Resim 21B, 22B) zayıf (+) gözlenirken, Grup 2’ de (Resim 21F, 22F) orta şiddette (++) gözlemlendi. Grup 3’te (Resim 21J, 22J) ve Grup 4’te (Resim 21N, 22N) immunofloresan yoğunluğunun kuvvetli (+++) olduğu tespit edildi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1’in (Resim 21-22; A-E) immunofloresan yoğunluğu Grup 2’ye (Resim 21-22; F-J) göre düşük bulundu ve aralarında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$, Tablo 16). Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğu Grup 3’e göre (Resim 21-22; K-O) düşük olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$). Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğu Grup 4 (Resim 21-22; P-U) ile karşılaştırıldığında Grup 4’ün immunofloresan yoğunluğunun Grup 2’den daha yüksek olduğu ancak aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Tablo 16, Şekil 17).

Tablo 16. Tüm gruplara ait Konneksin 37 antikorunun CTCF değerleri

Deney Grupları	Konneksin 37, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	287460,328±134651,2672
Grup 2 (PKOS grubu)	434777,828±156581,5953
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	496351,813±57033,71276
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	563572,797±175678,9663

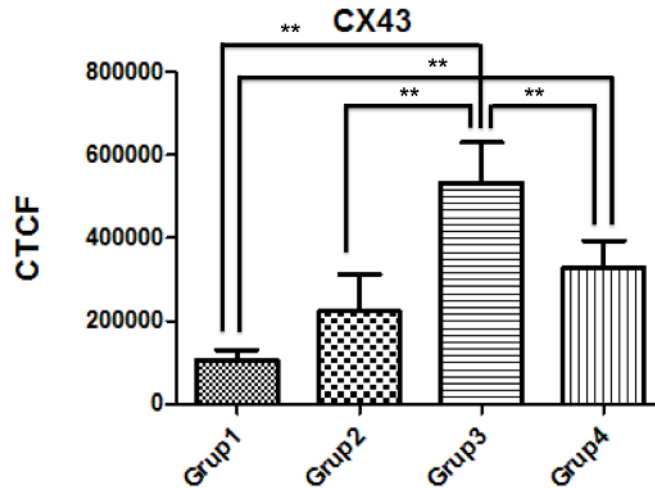


Şekil 17. Tüm gruplara ait oositlerdeki Konneksin 37 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi (** $p<0,01$).

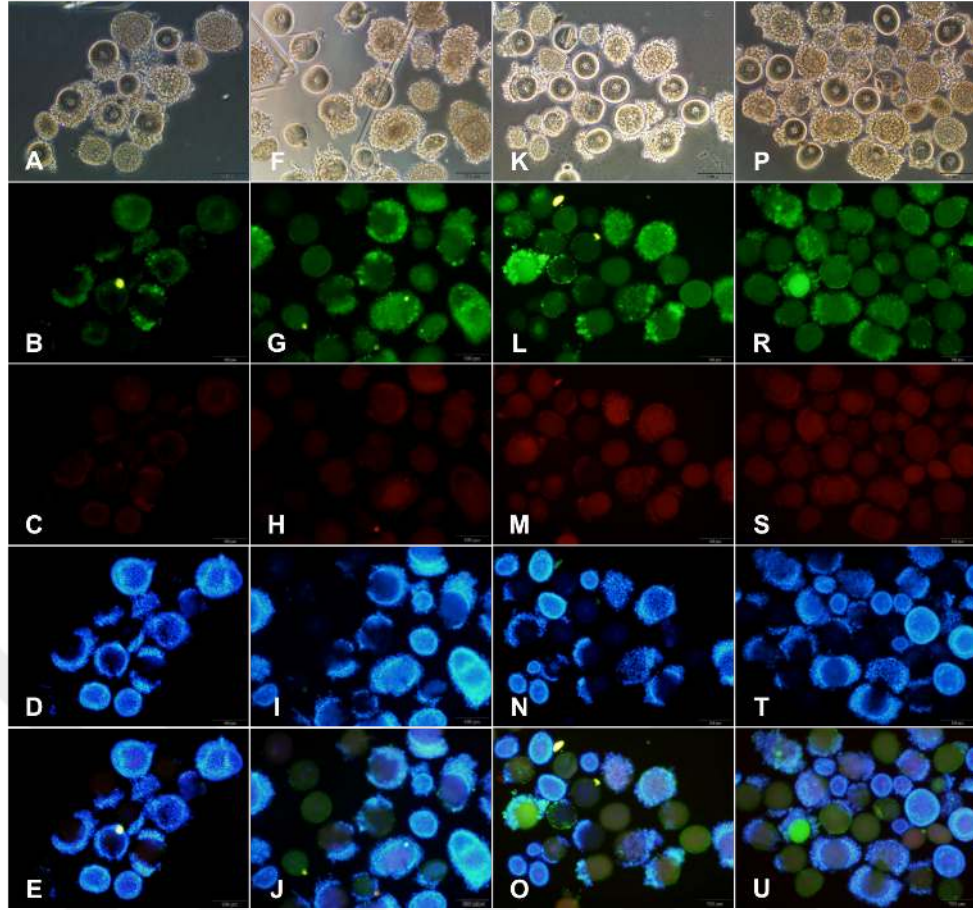
Konneksin 43 immunoreaktivitesi Grup 1' de (Resim 21C, 22C) zayıf (+) gözlenirken, Grup 2' de (Resim 21H, 22H) ve Grup 4'te (Resim 21S, 22S) orta şiddette (++) gözlemlendi. Grup 3'te (Resim 21M, 22M) immunofloresan yoğunluğunun kuvvetli (+++) olduğu tespit edildi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1'in (Resim 21-22; A-E) immunofloresan yoğunluğunun Grup 2'ye (Resim 21-22; F-J) göre düşük olduğu ve aralarında anlamlı fark bulunmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Grup 2'nin immunofloresan yoğunluğu Grup 3'e göre (Resim 21-22; K-O) düşük olarak bulundu ve aralarında anlamlı fark olduğu bulundu ($p<0,01$, Tablo 17). Grup 2'nin immunofloresan yoğunluğu Grup 4 (Resim 21-22; P-U) ile karşılaştırıldığında Grup 4'ün immunofloresan yoğunluğunun yüksek olduğu ancak aralarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$, Tablo 17, Şekil 18).

Tablo 17. Tüm gruplara ait Konneksin 43 antikorunun CTCF değerleri

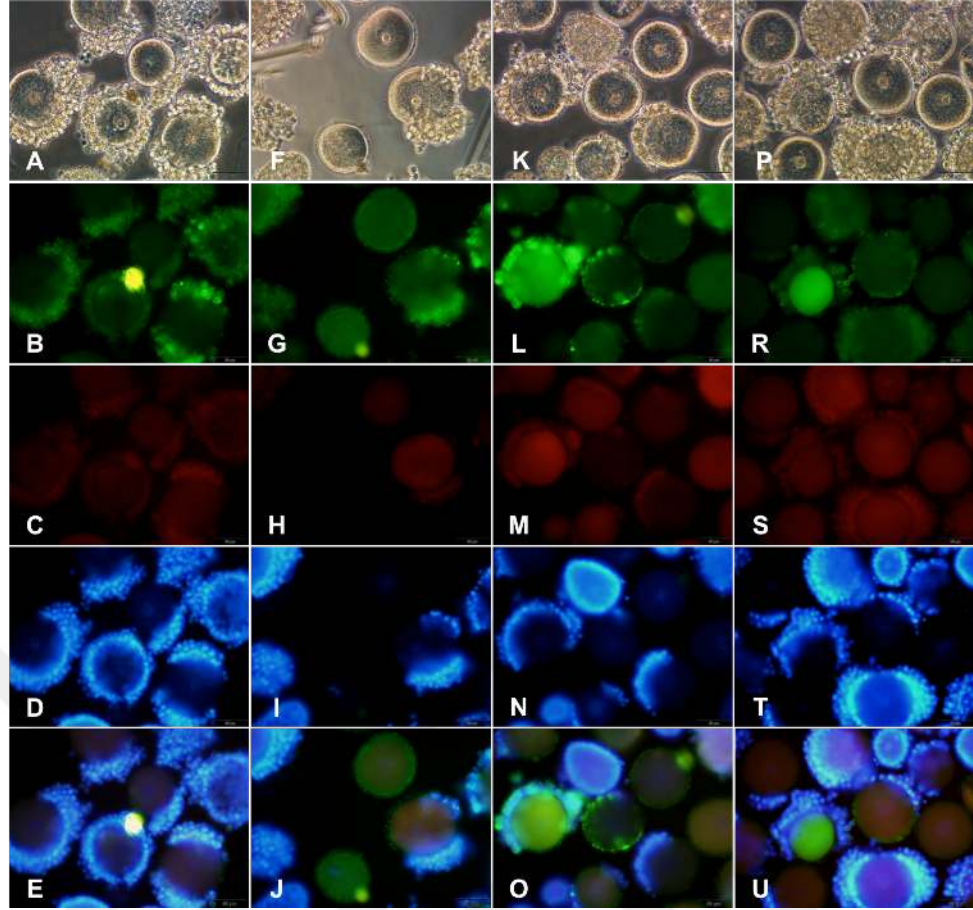
Deney Grupları	Konneksin 43, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	121936,036±52463,21979
Grup 2 (PKOS grubu)	222739,586±99258,26051
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	532836,446±96907,8482
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	329277,718±71289,90374



Şekil 18. Tüm gruplara ait oositlerdeki Konneksin 43 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi (** $p<0,01$).



Resim 21. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Konneksin 37 (B, G, R, L), Konneksin 43 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Konneksin 37, Kırmızı: Konneksin 43, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm.



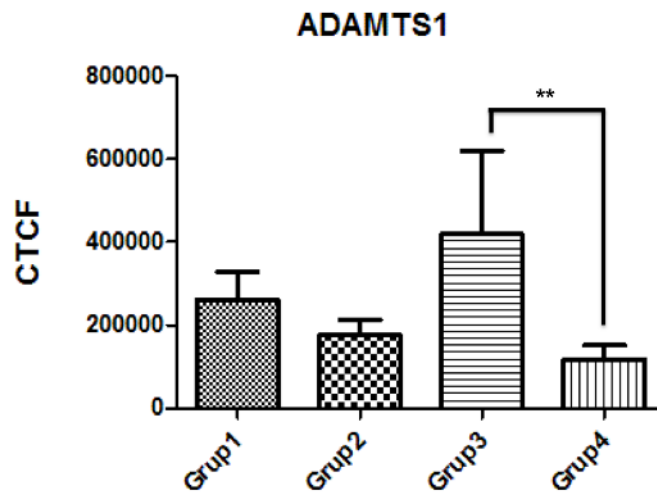
Resim 22. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Konneksin 37 (B, G, R, L), Konneksin 43 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Konneksin 37, Kırmızı: Konneksin 43, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm.

6.5.6. Adamts-1 ve Adamts-9

Adamts-1 immunoreaktivitesi Grup 1' de (Resim 23B, 24B) orta şiddette (++) gözlenirken, Grup 2' de (Resim 23F, 24F) ve Grup 4'te (Resim 23N, 24N) zayıf (+) olarak gözlemlendi. Grup 3'te (Resim 23J, 24J) immunofloresan yoğunluğunun kuvvetli (++++) olduğu tespit edildi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1'in (Resim 23, 24; A-E) immunofloresan yoğunluğu Grup 2'ye (Resim 23, 24; F-J) göre yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$, Tablo 18). Grup 2'nin immunofloresan yoğunluğu Grup 3'e göre (Resim 23-24; K-O) düşük olduğu ancak aralarında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Grup 2'nin immunofloresan yoğunluğu Grup 4'ün (Resim 23-24; P-U) immunofloresan yoğunluğu ile karşılaştırıldığında Grup 4'ün immunofloresan yoğunluğunun Grup 2'den daha yüksek olduğu ancak aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$, Tablo 18, Şekil 19).

Tablo 18. Tüm gruplara ait Adamts-1 antikörünün CTCF değerleri

Deney Grupları	Adamts-1, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	260813,438±77067,24037
Grup 2 (PKOS grubu)	175987,294±36776,85914
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	419128,146±199702,9362
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	116330,61±36285,96828

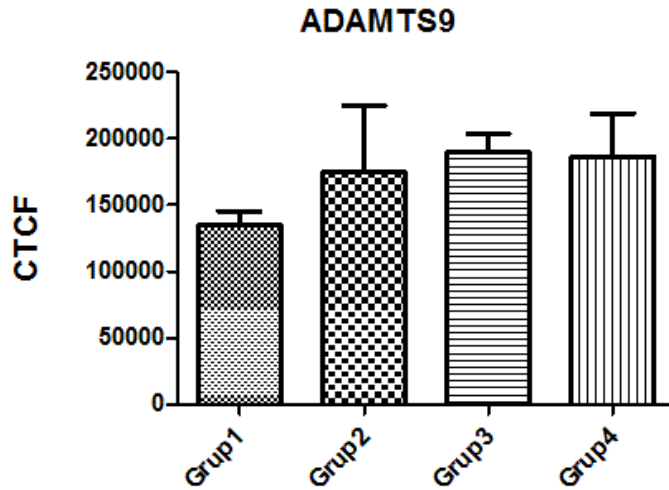


Şekil 19. Tüm gruplara ait oositlerdeki Adamts-1 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi (** $p<0,01$).

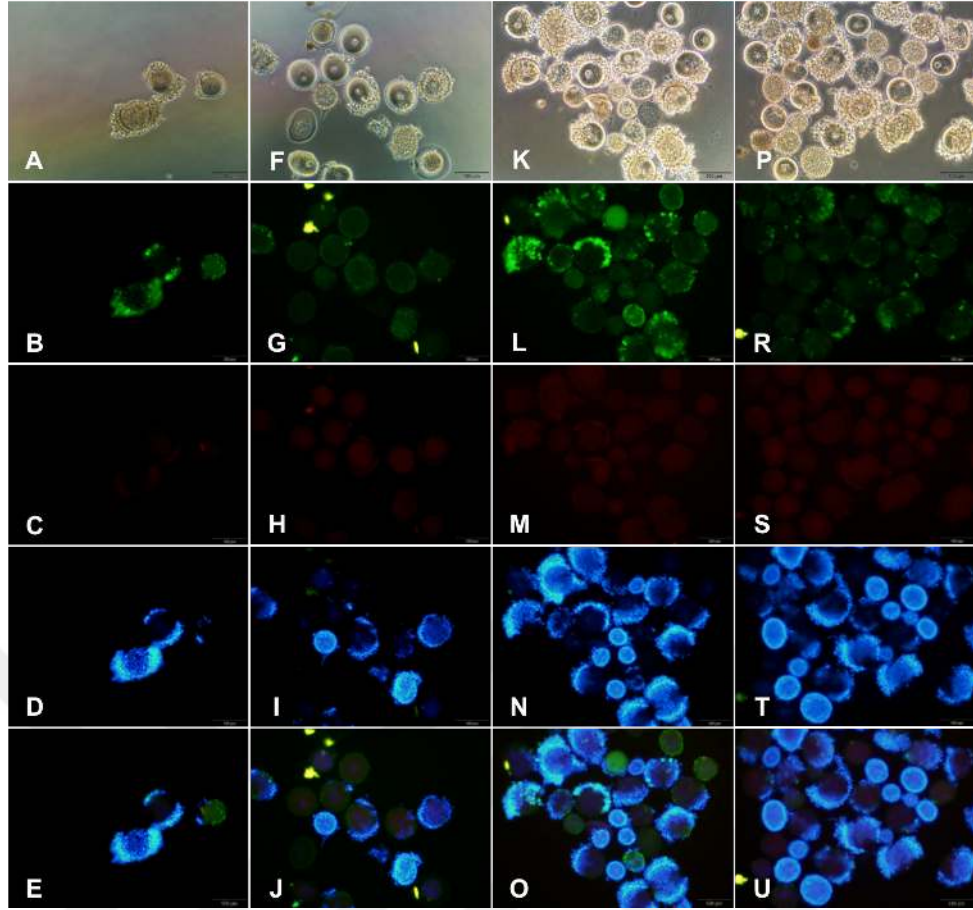
Adamts-9 immunoreaktivitesi Grup 1’ de (Resim 23C, 24C) zayıf olduğu (+) gözlenirken, Grup 2’ de (Resim 23H, 24H), Grup 3’te (Resim 23M, 24M) ve Grup 4’te (Resim 23S, 24S) orta şiddette (++) olduğu gözlemlendi. Tüm gruplarda oositler arasındaki immunofloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Grup 1’in (Resim 23-24; A-E) immunofloresan yoğunluğunun Grup 2’ye (Resim 23-24; F-J) göre düşük olduğu ve aralarında anlamlı fark olmadığı bulundu ($p>0,05$, Tablo 19). Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğu Grup 3’e göre (Resim 23-24; K-O) düşük olmasında rağmen aralarında anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Grup 2’nin immunofloresan yoğunluğu Grup 4 (Resim 23-24; P-U) ile karşılaştırıldığında Grup 4’ün immunofloresan yoğunluğunun Grup 2’den yüksek olduğu ancak aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($p>0,05$, Tablo 19, Şekil 20).

Tablo 19. Tüm gruplara ait Adamts-9 antikorunun CTCF değerleri

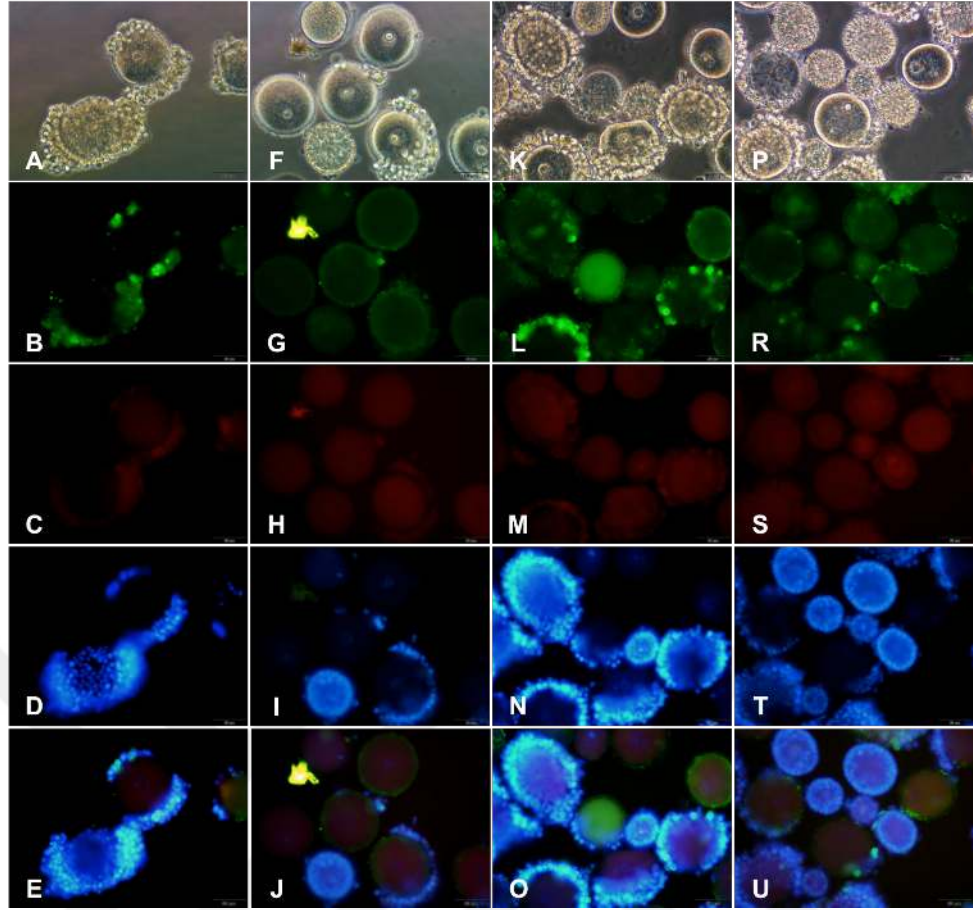
Deney Grupları	Adamts-9, CTCF değerleri
Grup 1 (Kontrol grubu)	134619,957±15341,72292
Grup 2 (PKOS grubu)	174470,088±50410,25473
Grup 3 (PKOS+KS grubu)	189431,486±14300,81772
Grup 4 (PKOS+ KS+Met+Pio grubu)	186465,632±32197,63471



Şekil 20. Tüm gruplara ait oositlerdeki Adamts-9 immunofloresan yoğunluk grafiği ve istatistiksel analizi ($p>0,05$).

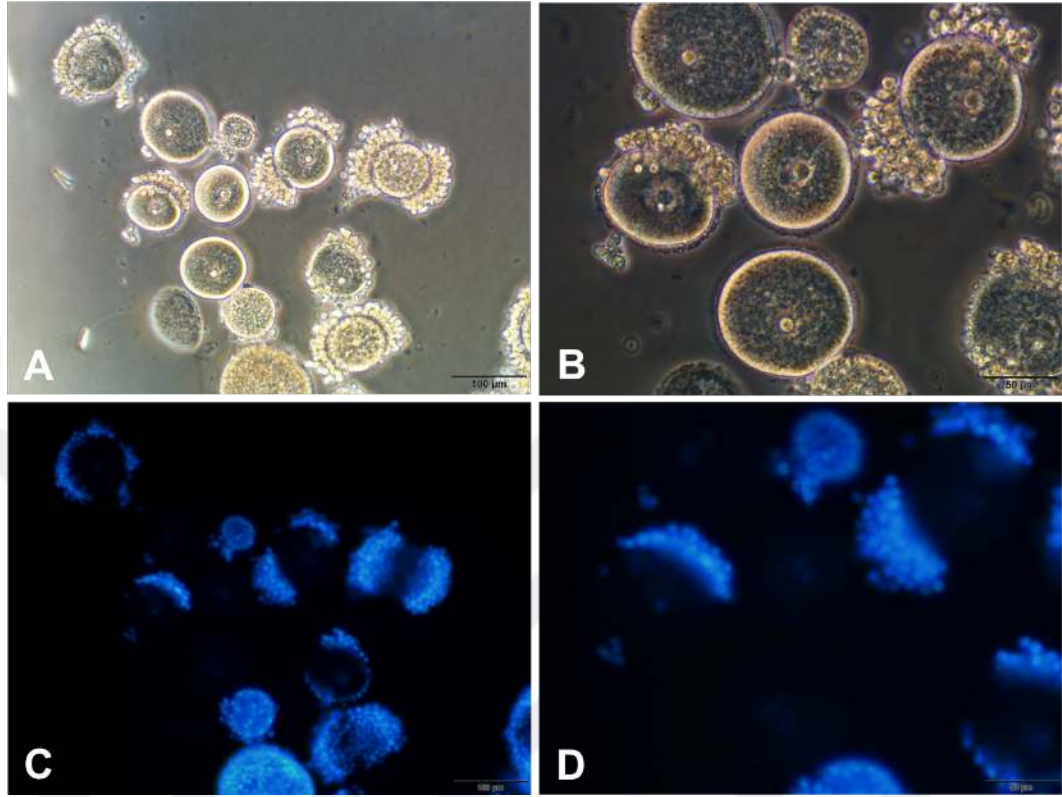


Resim 23. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Adamts-1 (B, G, R, L), Adamts-9 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Adamts-1, Kırmızı: Adamts-9, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 100 µm.



Resim 24. Grup 1 (A-E), Grup 2 (F-J), Grup 3 (K-O) ve Grup 4'e (P-U) ait oositlerin faz kontrast (A, F, K, P), Adamts-1 (B, G, R, L), Adamts-9 (C, H, M, S), DAPI (D, I, N, T) ve merge (E, J, O, U) görüntüleri. Yeşil: Adamts-1, Kırmızı: Adamts-9, Çekirdek: Mavi. Ölçek: 50 µm.

Tüm gruplara ait immunofloresan boyama sırasında negatif kontrol boyamalarında floresan ışına gözlenmedi. Tüm grupları temsil eden negatif görüntüler Resim 25’te verilmiştir.



Resim 25. Oositlere ait immunofloresan olarak negatif boyama görüntüleri. Çekirdek: Mavi. Ölçek: A-C: 100 µm, B-D: 50 µm.

Tablo 20. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4’ün oositlerinin immunofloresan analizine ait immunoreaktivite değerlendirmeleri.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Cep55	+	+	+++	++
Cdk4	++	++	++	+++
Hsp27	+++	++	+++	++
Nobox	++	+	+++	+++
Foxl2	++	+	++	++
Cx37	+	++	+++	+++
Cx43	+	++	+++	++
Adamts-1	++	+	+++	+
Adamts-9	+	++	++	++

7. TARTIŞMA

İnfertil olguların %5-10'u oranında görülen PKOS'ta oosit kalitesindeki eksiklikler ve anovulatuvar siklus problemlerinden dolayı deneysel olarak oluşturulan PKOS modeli ile oositlerin maturasyonunun sebeplerinin anlaşılması ve bu olgularda infertilite tedavisinin düzenlenmesi adına önemlidir. Bu çalışmada deneysel PKOS fare modelinde farklı ilaç uygulamalarından sonra oosit maturasyonunu etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda çalışmada PKOS modeli dişi Balb/C farelerde DHEA uygulanarak oluşturulmuştur. PKOS modeli DHEA dışında testosteron (T), Dihidrotestosteron (DHT), östrojen (E2) gibi androjenlerle veya Letrozol gibi aromataz inhibitörleri kullanılarak oluşturulabilmektedir (Yaba ve Demir 2012; Keefe ve ark. 2014; Kelly ve ark. 2016; Bakhshalizadeh ve ark. 2017). Yapılan çalışmalarda PKOS modelinin oluşması, ovaryum morfolojisinin incelenmesi, farelerin ağırlığının ölçülmesi, östrus siklusunun değerlendirilmesi, glukoz tolerans testi, kanda östrojen, progesteron, testosteron gibi hormonların değerlendirilmesi ile yapılır (Yaba ve Demir 2012; Kaufmann ve ark. 2015; Kelly ve ark. 2016).

Çalışmamızda deneysel PKOS fare modelinde ovaryumların morfolojik olarak folikül sayılarının fazla olması, ovaryum yüzeyinin düzgünlüğünün yer yer kaybedilmiş olması ile birlikte, histolojik olarak da hemorajik foliküllerin saptanması deneysel modelin DHEA ile oluşturulduğunu ispat etmektedir. Ayrıca Glukoz Tolerans testi ile kan bazal glukoz seviyesinin beklenen düzeyde olması deneysel modelin oluştuğunu desteklemektedir.

Yaptığımız çalışmada oosit maturasyonunda rol oynayan belirteçlerin ekspresyonlarında klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon tedavisinin tek başına klomifen sitrat tedavisi uygulanan gruba göre daha az artış göstermesine rağmen

metforminin klomifen sitrat ile birlikte kullanılması klomifen sitrat direnci olan PKOS'lu hastalarda faydalı olabileceğini düşündürdü.

PKOS modeli oluşturulan farelerde ovulasyon indüksiyonu ve oosit kalitesini arttıran klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon ilaçlarının uygulanmasını takiben toplanan over dokularında oosit maturasyonunu etkileyen Cep55, Cdk4, Hsp27, Foxl2, Nobox, Konneksin 37, Konneksin 43, Adamts-1 ve Adamts-9 proteinlerinin seviyesi, ovaryumlarda immunohistokimyasal olarak, oositlerde immunofloresan olarak değerlendirildi.

Yaptığımız çalışma sonucunda sadece klomifen sitrat ile tedavi yapılan grubun diğer tedavi grubu olan klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon uygulanan gruba göre tedavide daha etkili olduğu bulundu. Sadece Cdk4, Foxl2, Konneksin 37 antikörünün ekspresyon seviyesi klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon uygulanan grupta daha yüksek bulundu. Klomifen sitratın tek başına daha etkili olması farelerde geliştirilen PKOS'un klomifen sitrata direnci olmayan tipte olduğunu, farklı alt tipleri geliştiği bilinen PKOS'un anovulatuvar tipinin gelişmiş olabileceğini düşündürdü. Klomifen sitratın anovulatuvar PKOS'ta birinci basamak tedavi olarak kullanılması 2008 yılından beri önerilmektedir (The Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2008). Günümüzde de klomifen sitratın PKOS için birinci basamak tıbbi tedavide kullanılması devam etmektedir (Balen 2013).

Bununla birlikte PKOS tedavisinde oosit maturasyonu göz önüne alınmadan sadece tedavi amaçlı klomifen sitrata direnci olan hastalarda letrozol ile birlikte metformin ve pioglitazonun kombine olarak kullanılmasının daha etkili olduğu bildirilmiştir (El-khayat ve ark. 2016). Ayrıca 2019 yılında yapılan bir çalışma ile PKOS'lu kadınlarda infertilite tedavisinde ovulasyonu indüklemek için letrozol ve klomifen sitrat kombinasyonunun tek başına letrozolden daha etkin olduğu gösterilmiştir (Mejia ve ark. 2019). Tüm bu çalışmalar sonucunda klomifen sitratın tek başına tedavisinin yeterli olmadığı durumlarda letrozol gibi ajanlarında kullanılmaya başlamasıyla anovulatuvar PKOS'un tedavisine katkı sağlayabileceği ancak hem klomifen sitratın hem de letrozolün tek başına veya kombine kullanılmasının etkilerinin daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Yaptığımız çalışmada oosit maturasyonunu etkileyen belirteçlerin ekspresyon seviyesinde, klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon tedavisi uygulanan grupta, klomifen sitrat tedavisi uygulanan gruba göre daha az artış görülmesine rağmen, metforminin klomifen sitrat ile birlikte kullanılmasının PKOS'lu hastalarda faydalı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda metforminin tek başına kullanımının farklı PKOS hasta gruplarında faydalı olmadığını ancak kombine kullanıldığında daha faydalı olabileceğini göstermektedir. Başka bir çalışmada metforminin tek başına kullanılması avantajının az olmasından dolayı birinci basamak ajan olarak önerilmemiştir (Kovacs 2017). Tang ve arkadaşları yaptıkları derlemede, metforminin klinik gebelik oranında iyileşme ile ilişkili olduğunu, ancak metforminin tek başına mı yoksa klomifen sitrat ile kombinasyon halinde mi kullanıldığında canlı doğum oranlarını arttırdığına dair kanıt olmadığından dolayı hala tartışmalı olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle, PKOS'lu kadınlarda metforminin üreme sonuçlarını iyileştirmedeki rolünün sınırlı olduğunu bildirmişlerdir (Tang ve ark. 2012). Bununla birlikte obez, infertil, anovulatuvar, ovulasyon problemi olan olgularda ve in vitro fertilizasyon uygulanan, over hiperstimülasyon sendromu riskini azaltmak için metformin verilmesinin uygunluğu da önerilmektedir (Johnson 2014). Transgenik fare modelleri kullanılarak, leptin reseptörleri homozigot mutant farelerde metformin kullanımının in vivo üremede önemli olduğunu gösterilmesi, PKOS özellikleri gösteren ve PKOS üreme fenotipine sahip leptin reseptörü mutant olan farelerde, metforminin süperovulasyon sürecinde ovulatuvar performansa fayda sağlayabileceği, ancak bu sendromun PKOS fenotipi gösteren diğer alt gruplara fayda sağlayamayacağı da bildirilmiştir (Sabatini ve ark. 2011).

PKOS olgularında rutin tedavinin yanı sıra oosit kalitesi ve maturasyonu içinde uygulanan tedavi seçeneklerinin düşünülmesi, kullanılan her bir ilacın ve tedavi seçeneklerinin oosit maturasyonu üzerine etkilerinin bilinmesi de önemlidir. Metformin ile oosit kalitesi ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, farelerde PKOS modelinde bozulan oosit kalitesinde metforminin kısmen etkili olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark. 2015). Yapılan bir başka çalışma da in vitro oosit maturasyonun ilk 6 saatinde mayozun yeniden başlaması için metforminin kumulus oosit komplekslerini etkilediği ancak oositin MII'yi tamamlayamamasının PKOS'u tetikleyen östradiyol eksikliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Mesbah ve ark. 2015). Bununla beraber

metformin kullanılan PKOS'lu olgularda ovulasyonun indüklenmesindeki rolünün büyük olasılıkla over üzerinde doğrudan bir etkiden kaynaklandığını ve ilaca ovulatuvar yanıtın lokal duyarlılık veya ilaca direnç ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Palomba ve ark. 2010). Yapılan çalışmalar ile metforminin kombine tedavide daha fazla etkili olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre oosit maturasyonunda rol oynayan proteinlerin ekspresyonları klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon tedavisi uygulanan grupta, klomifen sitrat tedavisi uygulanan gruba göre daha az artış gözlenmiştir. Pioglitazonun metformin ve klomifen sitrat ile birlikte kullanılması PKOS'lu hastalarda gelişen insülin direncinin azalması, hiperandrojenizm ve ovulasyonun düzenlenmesi için, metformin, klomifen sitratın ya da pioglitazonun tek başına kullanılmasındansa kombine kullanılmasının daha faydalı olacağını düşündürmektedir. Pioglitazonun, insülin reseptörüne bağlandıktan sonra etkisini göstererek, insülinin etkisini arttıran ve diğer hormonların inhibe edici etkilerini ve hepatik glukoz sentezini azaltan bir ilaç olduğu bilinmektedir (Hwang ve ark. 2013). Ayrıca pioglitazon insülin direnci, hiperandrojenizm ve anovulasyon dahil olmak üzere PKOS'un çeşitli yönlerini tedavi etmek için kullanılmıştır. Aynı çalışmada ilk kez pioglitazonun insülin direncini, ovulasyon fonksiyon bozukluğunu ve hiperandrojenizmi iyileştirdiği gösterilmiştir (Brettenthaler ve ark. 2004). Yapılan bir başka çalışmada insülin düşürücü ajanlar olan metformin, pioglitazon ve troglitazonun, in vivo testosteron biyosentezini inhibe ederek ovaryum dokusunu etkilediğini göstermiştir (Misugi ve ark. 2006). Brannian ve arkadaşları erişkin transgenik fare modelinde pioglitazon uygulamasının insülin ile doğrudan ilişkili olmayan durumlar dışında ovaryan gen ekspresyonunu olumlu yönde değiştirdiğini bildirmiştir (Brannian ve ark. 2008). Kim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada pioglitazonun ovaryan stromada kan akışını azalttığını, ovaryan stimülasyonuna yanıtı arttırdığını ve klomifen sitrat tedavisine dirençli PKOS hastalarında artmış IVF sonuçlarının olduğunu bildirmiştir (Kim ve ark. 2010). Li ve arkadaşları PKOS'un klinik, hormonal ve metabolik özelliklerinin tedavisinde metformin ve tiyazolidindionları karşılaştıran bir meta-analiz'de, metformin ve tiyazolidindionların PKOS tedavisinde birbirlerinden üstün olmadıklarını, çalışmalar arasında, heterojenliğin kafa karıştırıcı olduğunu ve bu konuyu daha fazla

ele almak için büyük ölçekli, iyi tasarlanmış, randomize, kontrollü bir deneye ihtiyaç olduğu sonucuna varmıştır (Li ve ark. 2011).

Du ve arkadaşları pioglitazonu ve rosaglitazonu kapsayan ilaç grubu olan tiyazolidindiyonların PKOS'lu hastaların tedavisinde oynadığı rolü açıklayan bir meta-analizde, tiyazolidindiyonların hastalarda insülini ve açlık kan şekerini etkili bir biçimde azalttığını ancak androjen seviyelerini etkili bir şekilde azaltamayabileceğini ve vücut ağırlığını artırabileceği sonucuna varmıştır (Du ve ark. 2012). Shah yaptığı çalışma da PKOS hastalarında pioglitazonun menstrüel siklusu eski haline getirebileceğini, daha iyi bir ovulasyon oranı sağlayabileceğini, hiperandrojenizmin klinik belirtilerini iyileştirebileceğini ve Tip 2 diyabetin başlangıcını önleyebileceğini veya geciktirebileceğini bildirmiştir (Sangeeta 2012). Hara ve arkadaşları pioglitazonun FSH ile indüklenen foliküler gelişim ve steroidogeneizde, TNF- α tarafından inhibe edilmesini önlediğini ve PKOS'lu hastalarda peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör- γ (PPAR- γ) aktivasyonu ile doğrudan ovaryan fonksiyonlarına etki edebileceğini göstermiştir (Hara ve ark. 2013). Stabile ve arkadaşları PKOS'lu genç kadınlarda, pioglitazon ile yapılan tedavinin, menstrüel ritmin düzensizliklerini ve hiperandrojenizmin klinik belirtilerini iyileştirdiğini göstermiştir (Stabile ve ark. 2014). El-khayat ve arkadaşları, letrozol, metformin ve pioglitazon kombine tedavisinin, tek başına kullanıldığında klomifen sitrata dirençli bir grup PKOS'lu kadın arasında ovulasyon koşullarında ve gebelik oranlarında, klomifen sitrat, metformin ve pioglitazon kombine tedavisi kadar etkili olduğunu bildirmiştir (El-khayat ve ark. 2016). Indran ve arkadaşları yaptıkları çalışmada androjen biyosentezini modüle eden yolları ve PKOS'ta prelinik araştırmanın temelini oluşturan hücresel ve hayvan modelleri hakkındaki mevcut anlayışı gözden geçirmiş, klinik araştırmalar için iyileştirilmiş terapötik stratejilerin geliştirilmesini sağlayacakları sonucuna varmıştır (Indran ve ark. 2016). Xu ve arkadaşları yaptıkları meta-analizde PKOS'lu hastaların tedavisinde pioglitazon ile metformin arasındaki etkiyi karşılaştırmış ve sonuç olarak, pioglitazonun PKOS hastalarının menstrüel sikluslarını ve ovulasyonunu metforminden daha iyi iyileştirdiğini öne sürmüştür (Xu ve ark. 2017).

Sonuç olarak tekli veya kombine tedavi uygulamaları sonrasında PKOS'lu olgularda yapılan çalışmalarda PKOS'un klinik yönünü tedavi edecek yaklaşımların daha çok olduğu, ovulasyonu tetikleyen ilaçların kullanılmasının gerekliliği

vurgulanmakla birlikte oosit kalitesi konusunda çalışmalar yetersizdir. Çalışmamızda deneysel PKOS modelinde hem ovaryumda gelişen foliküllerde hem de oositlerde oosit maturasyonunda rol oynayan belirteçler ile klomifen sitrat, metformin ve pioglitazonun etkinliği bu açıdan ilk kez incelenmiştir. Ovaryumlarda Cep55 immunoreaktivitesinin kontrol ve tedavi gruplarında PKOS grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi. Oositlerde immunofloresan boyamasının sonucunun da immunohistokimyasal sonuçlar ile uyumlu olduğu, PKOS oluşturulan grupta, diğer gruplara göre düşük olduğunu belirlendi. Bu sonuçlar tedavi ile oosit maturasyonunda rol oynayan Cep55'in folikül gelişimini tetiklediğini buna bağlı olarak oosit maturasyonunu etkilediğini düşündürdü. Yapılan bir çalışmada Cep55'in GV ve MII fare oositlerinde eksprese edildiğini ve mikrotübül organize edici merkezde (MTOC) iç iplikçiklerinin organizasyonunda rol oynadığından dolayı fare oosit mayotik olgunlaşması sırasında hücre döngüsü ilerlemesini sağlayabileceğini bildirilmiştir (Xu ve ark. 2015). Bir başka çalışmada, kontrollü over stimülasyon döngüsünde granüloza hücrelerinin transkriptomunu ovulasyonun tetiklenmesinden önce ve sonra karşılaştırarak insanlarda ovulasyonla ilişkili yeni genleri belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda hCG uygulamasından 36 saat sonra aralarında Cep55'inde bulunduğu bazı genlerin downregüle olduğu bildirilmiştir (Wissing ve ark. 2014). Sonuç olarak PKOS olgularında Cep55 düşüşüne bağlı olarak oosit maturasyonunda meydana gelen bozulma sonucunda oosit kalitesinin azalacağı ve tedavi sonucunda Cep55 artışına bağlı olarak maturasyonun yeniden tetiklenebileceği düşünüldü.

Ovaryumlarda Cdk4 immunoreaktivitesinin PKOS grubunda kontrol ve tedavi gruplarına göre düşük olduğu gözlemlendi. Oosit immunofloresan boyaması sonucunun immunohistokimya sonuçları ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar oosit maturasyonunda ekspresyonu artan Cdk4'ün, farelerde PKOS modeli oluşturularak oositlerin mayotik maturasyonunu bozduğunu düşündürdü. Cdkların memeli mitotik G1-S fazına geçişte önemli rol oynadığı bilinmektedir (Ashley ve ark. 2001). Ashley ve arkadaşları Cdk2 ve Cdk4'ün fare spermatositlerin ve oositlerin mayotik profazları üzerindeki lokalizasyonunu ve fare testis kesitlerinde mayozdan önceki mitotik spermatogonial bölünmedeki ekspresyon paternlerindeki değişiklikler immunohistokimyasal olarak incelemiştir ve sonuç olarak Cdk4'ün memeli mayozunda sinaptonemal kompleks üzerinde replikasyon protein A ile birlikte

lokalize olduğu gösterilmiştir (Ashley ve ark. 2001). Kohoutek ve arkadaşları aralarında Cdk4'ünde dahil olduğu hücre siklus düzenleyicilerini, farelerde oosit gelişiminde, büyümesinde ve fertilizasyon sonrası birkaç saat içindeki embriyolarda miktarlarını ve lokalizasyonlarını belirleyerek potansiyel rollerini incelemiştir. Sonuç olarak hücre siklus düzenleyicilerinin, miktar, yapı ve lokalizasyonunun farklı dinamiklerle birleştiğinde, oosit gelişiminin düzenlenmesinde rol oynadığını ancak bu proteinleri gerektiren süreçlerin ve fonksiyonların ne olduğunu tespit edememiştir (Kohoutek ve ark. 2004). Brüssow ve arkadaşları Cdk4'ün domuz oositlerinde zona pellusida ve sitoplazmada eksprese olduğunu ilk kez bildirilmiştir (Brüssow ve ark. 2011). Ayrıca spesifik Cdk4 lokalizasyonunun, oositlerin gelişimsel yeterliliğini etkileyen ekzojen faktörlerle birlikte fertilizasyon kabiliyeti ve embriyo büyümesinden sorumlu birkaç genin farklı ekspresyonuyla ilişkili olduğunu öne sürmüştür. Folikülün çapı büyüdükçe Cdk4 ekspresyonun arttığını küçük ve orta foliküllerde ekspresyonun fazla olmadığını bildirmiştir (Brüssow ve ark. 2011). Kempisty ve arkadaşları domuz kumulus hücrelerinin kısa süreli kültüre edilmesinin Cdk4 ve Cx43 proteinlerinin ekspresyonunun ve dağılımının ilk 12 saat arttığını ve 44. saatte ekspresyon farklılığı olmadığını bildirilmiştir (Kempisty ve ark. 2013). Aynı grubun 2014 yılında yaptıkları çalışmada, Cdk4'ün domuz oositlerinde mRNA ekspresyonunun arttığını göstermiş ve oosit maturasyonunda kontrol noktası olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Kempisty ve ark. 2014). Oqani ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Cdk1'in oositleri düzenlemeye katkısı olmasına rağmen, Cdk2 ve Cdk4'ün memeli oositlerinde önemli olduğunu ve fare ve domuz oositlerinin uygun şekilde olgunlaşması için Cdk7 ve Cdk9 aktivitesinin de gerekli olduğunu göstermiştir (Oqani ve ark. 2017). Zhao ve arkadaşları aşırı florür alımı ile indüklenen foliküler gelişimsel displazide florür dozuna bağlı olarak Cdk4 ekspresyonunun arttığını bildirmiştir. Cdk4'ün Cdk2 ile artışının JNK sinyal yolağında rol oynayan STAT3, STAT5 artışından kaynaklandığını ve bunun da ovaryumda folikül ve foliküler displazide granüloza hücrelerinin apoptozuna neden olacağını bildirmiştir (Zhao ve ark. 2018). Cdk4'ün çalışmamızda özellikle ileri foliküler evrede (tersiyer folikül) ve granüloza hücrelerinde tekli veya kombine tedavi uygulanan gruplarda artmış olması, PKOS'lu olgularda folikül gelişiminin etkilenmesinde Cdk4'ün rolünün önemli olduğunu düşündürdü.

Hsp27'nin ovaryumlarda PKOS grubu, tedavi grupları ile karşılaştırıldığında Kломifen sitrat tedavisi uygulanan gruba göre düşük immunoreaktiviteye sahip olduğu saptandı. Oositlerdeki immunofloresan yoğunluğunun ovaryumlardaki immunoreaktiviteye benzer olduğu gözlemlendi. Oositlerde kломifen sitrat tedavisi uygulanan grupta kombine tedavi uygulanan gruba göre daha yüksek immunoreaktivite gözlenmesi, uygulanan tedavinin ovaryumda iyileşme sağladığını ancak oosit maturasyonunu durduğunu, kombine grupta immnuoreaktivitenin azalmasının oosit maturasyonuna katkı sağladığını düşündürdü. Ma ve arkadaşları Hsp27'nin insan oositinde eksprese edildiğini ve Hsp27 ekspresyonunun, PKOS'lu kadınlardan elde edilen ovaryumlarda azaldığını göstermiştir (Ma ve ark. 2007). Velazquez ve arkadaşları ineklerde, kistik ovaryan hastalığında gelişen foliküller ve kistik foliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde Hsp27 ekspresyonlarının arttığını, atretik foliküllerde azaldığını bildirmiştir. Hsp genlerinin değişmiş ekspresyonunun foliküler duvardaki apoptozu azalttığını ve kistik foliküllerin gecikmeli regresyonuna yol açtığını, kistik ovaryan hastalık patogenezinin over içi bileşeni ile ilişkili olduğunu öne süren daha önceki gözlemleri desteklediğini bildirmiştir (Velazquez ve ark. 2010). Başka bir çalışmada, Hsp27'nin down-regülasyonunun farelerde oosit maturasyonunu geliştirirken, kaspaz 8 aracılı apoptotik yolağın aktivasyonunu tetikleyerek oositlerde erken evre apoptozunu arttırdığı bildirilmiştir (Liu ve ark. 2010). Cai ve arkadaşları, PKOS'lu hastalarda Hsp27'nin upregülasyonun oosit maturasyonunu inhibe ettiğini ve embriyonik gelişim potansiyelini iyileştirdiğini göstermiştir (Cai ve ark. 2013). Hsp27'nin down-regülasyonu, PKOS'lu kadınların ovaryumlarının küçük antral foliküllerinde oosit apoptozuna katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Ma ve ark. 2007). Farelerde erken embriyonik gelişme üzerine yapılan bir çalışmada, embriyolarda Hsp27'nin aşırı ekspresyonu veya down-regülasyonunun, embriyonik gelişimi tek başına bir faktör olarak önemli ölçüde etkilediğini bildirmiştir (Liu ve ark. 2013).

Foxl2 immunoreaktivitesinin, PKOS grubunda ekspresyonu azalmış iken, tekli ve kombine tedavi uygulanmasından sonra özellikle kломifen sitrat uygulaması sonrasında arttığı, kломifen sitratın Foxl2 ekspresyonunu tetiklediğini düşündürdü. Benayoun ve arkadaşları yaptıkları çalışmanın sonucunda Foxl2'yi granüloza hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesi ve homeostazının yeni bir düzenleyicisi olduğunu ayrıca bir tümör baskılayıcı aday olduğunu bildirmiştir (Benayoun ve ark.

2011). Mutant farelerin ovaryumlarında, Foxl2'nin granüloza hücrelerinde ve düşük seviyede eksprese edildiği ve bu granüloza hücreleri ile çevrili olan büyümeyen oositleri içeren çok az primordial veya primer folikül oluşturduğu bildirilmiştir (Kim ve ark. 2011). Balıklarda yapılan bir çalışmada genç ve erişkin ovaryumlarında ekspresyon seviyeleri farklı olan genler arasında, aralarında Foxl2'nin de bulunduğu oosit fizyolojik fonksiyonuyla ilişkili genlerin yetişkin ovaryumlarında upregüle olduğu bulunmuştur (Jia ve ark. 2018). Tavuklarla yapılan bir çalışma da tavukların folikül gelişiminde Foxl2'nin, otokrin düzenleyici mekanizma yoluyla hücre içi FSHR transkripsiyonunda ve granüloza hücre proliferasyonunda rol oynayan çift yönlü modüle edici bir rol oynadığı bildirilmiştir (Qin ve ark. 2015). Lipskind ve arkadaşları embriyonik cisimcik ve indüklenmiş pluripotent kök hücre kullanarak ovaryum granüloza hücrelerinin gelişimi ve steroidogenezi için oluşturdukları modelde aralarında Foxl2'ninde bulunduğu granüloza hücre belirteçlerinin hem fare hem de insan embriyonik cisimciklerinde eksprese edildiğini göstermiştir (Lipskind ve ark. 2018). Pannetier ve arkadaşları, ovaryan farklılaşma sırasında transkripsiyon faktörü Foxl2'nin ve R-spondin1 tarafından düzenlenen WNT sinyal yolağının rolünü fare, keçi ve insanda incelemiştir. Sonuç olarak kadın cinsiyet farklılaşmasında Foxl2 ve Wnt'in 2 ana genetik kaskat olarak rol oynadığını bildirmiştir (Pannetier ve ark. 2016).

Çalışmada Nobox immunoreaktivitesinin hem tekli hemde kombine tedavi uygulaması sonrasında ekspresyonun arttığı, özellikle erken dönem foliküllerde ekspresyonun daha fazla arttığı görülmesi üzerine, tedavilerin folikülogenezi destekleme adına Nobox ekspresyonunu tetiklediğini düşündürdü. Memelilerde folikülogenez, hem ekstraovaryan hem de intraovaryan faktörlere bağlı karmaşık bir süreçtir. Memeli ovaryumu içerisindeki oositler, folikülogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Transkripsiyon faktörü olan Nobox'un primordial foliküllerden olgun foliküllere kadar farklı foliküllerde seçici olarak eksprese edildikleri keşfedilmiş ve Nobox'un oogeneze ve ovaryum gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Suzumori ve ark. 2002). Nobox^{-/-} yenidoğanların ovaryumlarında genel olarak germ hücre kaybının olmadığı ve Nobox ekspresyonunun primordial folikül havuzunun önemli bir düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (Rajkovic ve ark. 2004). Lechowska ve arkadaşları Nobox^{-/-} farelerin gelişmekte olan embriyonik ovaryumlarının ultrastrüktürel analizi ile Nobox^{-/-} farelerdeki primordial folikül

eksikliğinin, embriyonik gelişim sırasında ortaya çıktığını göstermiştir (Lechowska ve ark. 2011). Bayne ve arkadaşları primordiyal folikül formasyonu sırasında Nobox ile GDF9'un karşılıklı olarak etkileşimde oldukları ve birbirlerini düzenledikleri gösterilmiştir (Bayne ve ark. 2015). Yapılan başka bir çalışmada ise, sığır modelinde Nobox'un erken embriyogenez sırasında embriyonik genom aktivasyonu, pluripotent genlerin ekspresyonu ve blastokist hücrelerinin oluşumunun düzenlenmesinde işlev gören temel bir maternal kökenli transkripsiyon faktörü olduğu gösterilmiştir (Tripuraini ve ark. 2011). Ferrari ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, idiyopatik POF'a sahip 107 Avrupalı kadının genetik taramasını sonucunda hastaların 7'sinde heterozigot Nobox mutasyonunun (%6.5) olduğu rapor edilmiştir (Ferrari ve ark. 2016).

Konneksin 37 ve 43'ün gelişmekte olan foliküllerde özellikle primer folikülde tedavi uygulamaları sonrasında arttığı, özellikle klomifen sitrat uygulaması ile konneksin 43 artışının hem primer folikülde hemde oositte daha fazla olduğunu görülmesi üzerine klomifen sitratın folikülogenez ve granüloza hücrelerinde devamlılığı sağladığını düşündürdü. Güney Hintli kadınlarda Cx37 / GJA4 geninin C1019T tek nükleotid polimorfizminin PKOS'a duyarlılıkla ilişkili olabileceğini gösterilmiştir (Guruvaiah ve ark. 2016). Yapılan başka bir çalışmada konneksin 37'yi kodlayan genin delesyonunun preantral aşamada foliküler gelişimi durdurduğu ve mayotik yeterliliğin kazanılmasını engellediği bildirilmiştir (Carabatsos ve ark. 2000). Konneksin-37 ve konneksin-43'ün oogenezdeki rollerini tanımlamak için, kimerik ovaryumlar, immün yetmezliği olan dişi farelerin böbrek kapsüllerine nakledilmiştir. Sonuçlar, konneksin-43'ün granüloza hücrelerinde veya konneksin 37'nin oositlerde yokluğunun, oosit ve folikül gelişimini etkilemesi için yeterli olduğunu bildirmiş ve konneksin 37 ile 43'ün önemini vurgulamıştır (Gittens ve Kidder 2005). Bununla birlikte, başka çalışmalar, konneksin 37'nin oosit-granüloza hücreleri arasındaki rolünün çok farklı biyofiziksel ve geçirgenlik özelliklerine sahip olduğu bilinen konneksin 43 ile de gerçekleşebileceğini bildirmiştir (Li ve ark. 2007). Liu ve arkadaşları Rps26 geni knockout farelerin ovaryum ve oositlerinde konneksin 37 mRNA seviyesinin ve protein ekspresyonunun önemli derece azaldığını göstermiştir. Bu azalmanın oosit ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimin azalmasına ve folikül kaybına neden olduğunu, bunda prematür ovaryan yetmezliğin oluşmasına katkı sağladığını öne sürmüştür (Liu ve ark. 2018). Zhang ve

arkadaşları zayıf over yanıtın tedavisinde farklı testosteron konsantrasyonlarında kumulus oosit komplekslerinde konneksin 37 ekspresyon seviyesinin folikül içindeki konneksin ekspresyonunu arttırarak over yanıtını destekleyebileceğini bildirmiştir (Zhang ve ark. 2016). Donfack ve arkadaşları keçi ovaryum korteksleri ile ilgili yaptıkları çalışmada konneksin 43'ün tüm folikül tiplerinde granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve zona pellusida'da eksprese edildiğini ayrıca uyguladıkları tedavilerin hepsinde aynı paterni gösterdiğini bildirmiştir (Donfack ve ark. 2018). Michalovic ve arkadaşları sığırların granüloza hücrelerinde Cx43 ve bazı genlerin yoğunluğunun yaşla arttığını ve bu genlerin, granüloza hücrelerinin fonksiyonu, proliferasyonu ve sağ kalımında kilit rol oynayan düzenleyicileri kodladığını bildirmiştir (Michalovic ve ark. 2018). Zhang ve arkadaşları kumulus oosit komplekslerinde GPR30'a etki eden 17 β -estradiolün ERK1 / 2'nin aktivitesini düzenlediğini ve hücrelerarası gap junction iletişimi aracılığıyla mayozun yeniden başlatılması için önemli olan Cx43 fosforilasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir (Zhang ve ark. 2019).

Adamts-1 ve Adamts-9 immunoreaktivitelerinin PKOS modelinde tedavi sonrasında kontrol grubuna nazaran primodial ve primer foliküllerde görülmez iken, sekonder folikül ve sonrasında kontrol grubuna benzer şekilde immunoreaktiviteler olduğu saptandı. Oositte ise özellikle klomifen sitrat uygulaması sonrasında Adamts-1 ve -9'daki artışın gözlenmesinden dolayı, özellikle PKOS'lu olgularda Adamts-1 ve -9'un ekspresyonun geç dönemde foliküllerde olduğunu ve mayoz II aşamasında olan oosit için gerekli olduğunu düşündürdü. Adamts1 null farelerin, kadın infertilitesi ve bozulmuş foliküler gelişim gösterdiği öne sürülmüştür (Shindo ve ark. 2000). Rosewell ve arkadaşları Adamts-1 ve Adamts-9'un mRNA seviyelerinin, hCG uygulamasından sonra granüloza hücrelerinde arttığını, ancak ADAMTS1 ekspresyonunun granüloza hücrelerinde azaldığını, Adamts-9 ekspresyonunun değişmediğini bildirmiştir (Rosewell ve ark. 2015). GohariTaban ve arkadaşları progesteron reseptörleri ile birlikte Adamts-1 ve Adamts-9'un PKOS hastalarının kumulus hücrelerinin azalmasının, düşük fertilizasyon oranı ve oosit maturasyon oranlarına yol açabileceğini göstermiştir (GohariTaban ve ark. 2019). Meng ve arkadaşları erken sekonder foliküllerin gelişimsel olarak durmasının, furinin oosit spesifik delesyonu ile Adamts-1'in (85-kDa prodomaini kesilmiş) olgunlaşmış formunun kaybıyla ortaya çıkabileceğini ve mutant farelerde granüloza hücrelerinin

çoğalmasının bozulduğu sonucuna varmıştır (Meng ve ark. 2017). Pan ve arkadaşları Adamts-1'in Versikan ile birlikte kumulus oosit kompleksinin in vitro oosit maturasyonunda artmış olduğunu göstermiştir (Pan ve Li 2018). Folikül uyarıcı hormon veya epidermal büyüme faktörü benzeri peptitler ile in vitro uyarılmış domuz kumulus-oosit komplekslerinin gen ekspresyon analizinde Adamts-1 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Blaha ve ark. 2015). Russell ve arkadaşları Adamts-1'in sitoplazmik salgılayıcı veziküllerde lokalize olduğunu ve ekstraselüler matrikste biriktiğini göstermiştir (Russell ve ark. 2003). Ayrıca Adamts-1'in, over foliküler gelişimi ve hücre dışı matriks (ECM) için yeniden şekillenmesi için gerekli olduğu (Brown ve ark. 2010), farklı bir grubun yaptığı çalışmada da sığırlarda teka hücrelerinin ürettiği Adamts-1 ve Adamts-9'un dokunun yeniden şekillenmesinde ve folikül bozulmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Willis ve ark. 2017). PKOS'lu kadınlar ile yapılan bir çalışmada, polikistik over sendromlu ergenlerde ve genç yaştaki kadınlarda Adamts-1'in arttığı bildirilmiştir. Artmış Adamts-1 düzeylerinin, ergenlerde ve genç yaştaki kadınlarda PKOS'un etiyopatogenezi için potansiyel bir belirteç olabileceği bildirilmiştir (Tola ve ark. 2018). Aynı grup 2017'de foliküler sıvıda Adamts-1 ve agrekan seviyesini inceledikleri çalışmada PKOS'lu hastalarda Adamts-1'in arttığını ve PKOS etiyopatogenezinde öncü belirteç olarak önerilmiştir (Tola ve ark. 2017). Bir başka çalışmada PKOS hastalarında serum versikan ve Adamts-1 düzeylerinin birbirleriyle anlamlı ve pozitif olarak korele olduğu gösterilmiştir (Özler ve ark. 2017). Karaköse ve arkadaşları da PKOS'lu hastaların serumlarında Adamts-1 ve Adamts-9'un önemli bir farklılık bulunmadığını bildirmiştir (Karaköse ve ark. 2016). Li ve arkadaşları PKOS oluşturdukları sıçanlarda ovulasyonu etkileyen temel transkripsiyonel regülatörlerden biri olan CCAAT / arttırıcı bağlayıcı protein β (C / EBP β) üzerinden Adamts-1 ve ovulasyon ile ilişkili bir kaç proteinin azaldığını bulmuştur (Li ve ark. 2018). Jansch Carter ve arkadaşları CRISPR / Cas9 kullanarak Adamts-9^{-/-} knockout zebra balığı fenotipini oluşturarak Adamts-9'un ovaryum gelişiminde gerekli olduğunu bildirmiştir (Carter ve ark. 2019). C. elegans'ta Adams-9 knockout edildiğinde ortoloğu olan GON-1'in germ hücrelerinin göçünde ve gonad gelişiminde rol oynadığı, Drosophila'da ise Adamts-9 knockout edildiğinde ortoloğu olan Adamts-A'nın, germ hücrelerinin yanlış göçüne neden olduğu gösterilmiştir (Ismat ve ark. 2013). Tsubota ve arkadaşları foliküler bozukluğu engellediği bilinen RU486'nın

ekstraselüler matriks için proteolitik etkisi olan Adamts-1 ve Adamts-9'un downregüle olduğunu bildirmiştir (Tsubota ve ark. 2015).



8.SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma farelerde PKOS modelinde ovulasyon indüksiyon tedavisinde ve insülin direncinin düşürülmesi ile tip 2 diyabette etkin olarak kullanılan ilaçların tekli ya da kombine halde kullanılarak oosit maturasyonuna etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Tedavi gruplarında oosit maturasyonunu etkileyen Cep55, Cdk4, Hsp27, Nobox, Foxl2, Konneksin 37 ve 43, Adamts-1 ve Adamts-9 ifadesinin artmış olduğu bulundu. PKOS fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamış endokrinolojik bir bozukluk olmakla birlikte, hastalığın ortaya çıkmasında birçok moleküler yolağın etkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın sonuçları tedavi gruplarında Cep55, Cdk4, Hsp27, Nobox, Foxl2, Konneksin 37 ve 43, Adamts-1 ve Adamts-9 ifadelerinin artmış olması PKOS ile bozulan ve oosit maturasyonunu etkileyen faktörlerin uygulanan tedaviler ile kısmen iyileştirildiğini düşündürdü. Aynı belirteçlerin daha ileri moleküler teknikler ile incelenmesi ile gelecekte bu belirteçlerin PKOS’lu olgularda oosit maturasyonunda kullanılabilecek yeni moleküllerden olacağına inanılmaktadır.

9.KAYNAKLAR

Abbott DH, Nicol LE, Levine JE, Xu N, Goodarzi MO, Dumesic DA. Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013; 373(1-2): 21-8.

Abbott DH, Rayome BH, Dumesic DA, Lewis KC, Edwards AK, Wallen K, Wilson ME, Appt SE, Levine JE. Clustering of PCOS-like traits in naturally hyperandrogenic female rhesus monkeys. *Human Reproduction*. 2017; 32(4): 923-936.

Abbott DH. Neuronal androgen receptor: Molecular gateway to polycystic ovary syndrome? *PNAS*. 2017; 114(16): 4045-4047.

Abu Hashim H, Shokeir T, Badawy A. Letrozole versus combined metformin and clomiphene citrate for ovulation induction in clomiphene-resistant women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Fertility & Sterility*. 2010; 94(4): 1405–9.

Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Developmental Biology*. 2001; 233(2): 258-70.

Adams J, Polson D, Frank S. Prevalance of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *BMJ*, 1986;293:355-359.

Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Ning Y, Halet G, Kaldis P, Liu K. Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(11):2476-84.

Almahbobi G, Anderiesz C, Hutchinson P, McFarlane JR, Wood C, Trounson AO. Functional integrity of granulosa cells from polycystic ovaries. *Clinical Endocrinology (Oxf).* 1996; 44(5) s:571-80.

Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of Cell Biology.* 1976; 71(2): 680–6.

Ashley T, Walpita D, de Rooij DG. Localization of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *J Cell Sci.* 2001 Feb;114(Pt 4):685-93.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril.* 2009;91(2):456–88.

Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963; 158: 417–33.

Bakhshalizadeh S, Amidi F, Alleyassin A, Soleimani M, Shirazi R, Shabani Nashtaei M. Modulation of steroidogenesis by vitamin D3 in granulosa cells of the mouse model of polycystic ovarian syndrome. *Syst Biol Reprod Med.* 2017 Jun;63(3):150-161.

Balen AH. Ovulation induction in the management of anovulatory polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Jul 5;373(1-2):77-82.

Banerjee S, Lin CF, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, Hicks DG, Redmond EM, Morrow D, Huston A, Shayne M, Langstein HN, Miller-Graziano CL, Strickland J, O'Donoghue L, De AK. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic

macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res.* 2011 Jan 15;71(2):318-27.

Barbieri RL. Female Infertility. İçinde, Strauss JF, Barbieri RL, Gargiulo AR, (eds). *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. 8th Edition. Elsevier: Philadelphia; 2019, s:556-581

Barnes RB, Namnoum AB, Rosenfield RL, Layman LC. The role of LH and FSH in ovarian androgen secretion and ovarian follicular development: clinical studies in a patient with isolated FSH deficiency and multicystic ovaries. *Hum Reprod.* 2002; 17(1): 88-91.

Bayne RA, Kinnell HL, Coutts SM, He J, Childs AJ, Anderson RA. GDF9 is transiently expressed in oocytes before follicle formation in the human fetal ovary and is regulated by a novel NOBOX transcript. *Plos One* 2015; 10:e0119819.

Belli M, Cimadomo D, Merico V, Redi CA, Garagna S, Zuccotti M. The NOBOX protein becomes undetectable in developmentally competent antral and ovulated oocytes. *The International Journal of Develoepmental Biology.* 2013; 57(1):35-9.

Benayoun BA, Georges AB, L'Hôte D, Andersson N, Dipietromaria A, Todeschini AL, Caburet S, Bazin C, Anttonen M, Veitia RA. Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Hum Mol Genet.* 2011 May 1;20(9):1673-86.

Blaha M, Nemcova L, Kepkova KV, Vodicka P, Prochazka R. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Oct 6;13:113.

Bo Pan, Julang Li. MicroRNA-21 up-regulates metalloprotease by down-regulating TIMP3 during cumulus cell-oocyte complex in vitro maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Dec 5;477:29-38.

Boomsma CM, Fauser BCJM, Macklon NS. Pregnancy complications in women with Polycystic ovary syndrome. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2008; 26: 72–84.

Boyle JA, Cunningham J, O'Dea K, Dunbar T, Norman RJ. Prevalence of polycystic ovary syndrome in a sample of Indigenous women in Darwin, Australia. *Med J Aust*. 2012 Jan 16;196(1):62-6.

Brannian JD, Eyster KM, Weber M, Diggins M. Pioglitazone administration alters ovarian gene expression in aging obese lethal yellow mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008 Mar 18;6:10.

Brettenthaler N, De Geyter C, Huber PR, Keller U. Effect of the insulin sensitizer pioglitazone on insulin resistance, hyperandrogenism, and ovulatory dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Aug;89(8):3835-40.

Brevini, TA, Lonergan P, Cillo F, Francisci C, Favetta LA, Fair T, Gandolfi F. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*. 2002; 63:510-517.

Brissette JL, Li J, Kamimura J, Lee D, Dotto GP. 1996 The product of the mouse nude locus, Whn, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev* 10:2212–2221.

Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE, Woodruff TK. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developmental Biology*. 2006; 298(1): 132-48.

Brown HM, Dunning KR, Robker RL, Boerboom D, Pritchard M, Lane M, et al. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the

ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice. *Biol Reprod.* 2010;83:549–57.

Bruzzone R, White TW and Paul, DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry.* 1996; 238: 1-27.

Brüssow KP, Kempisty B, Antosik P, Lianeri M, Wozna M, Bryja A, J Jackowski J, Bukowska D, Piotrowska H, Jackowska H. Are the levels of Cdk4 and Cx43 proteins of porcine oocytes associated with follicular size? *Animal Biology.* 2011; 61:211–24.

Bulius G, Kretchmar C: *Angiodystrophia Ovarii*, Stuttgart, 1897, F. Enke.

Cai L, Ma X, Liu S, Liu J, Wang W, Cui Y, Ding W, Mao Y, Chen H, Huang J, Zhou Z, Liu J. Effects of upregulation of Hsp27 expression on oocyte development and maturation derived from polycystic ovary syndrome. *PLoS One.* 2013; 8(12):e83402.

Caldwell AS, Eid S, Kay CR, Jimenez M, McMahon AC, Desai R, Allan CM, Smith JT, Handelsman DJ, Walters KA. Haplosufficient genomic androgen receptor signaling is adequate to protect female mice from induction of polycystic ovary syndrome features by prenatal hyperandrogenization. *Endocrinology.* 2015; 156(4): 1441-52.

Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini, DF. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Developmental Biology.* 2000; 226:167-179.

Carlton JG, Agromayor M, Martin-Serrano J. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *PNAS.* 2008; 105: 10541–10546.

Carlton JG, Martin-Serrano J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science.* 2007; 316: 1908–1912.

Carmina E, Chu MC, Longo RA, Rini GB, Lobo RA. Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005; 90(5): 2545-9 .

Carter NJ, Roach ZA, Byrnes MM, Zhu Y. Adamts9 is necessary for ovarian development in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*. 2019 Apr 2. pii: S0016-6480(19)30041-3.

Chang PL, Lindheim SR, Lowre C, Ferin M, Gonzalez F, Berlund L, Carmina E, Sauer MV, Lobo RA. Normal ovulatory women with polycystic ovaries have hyperandrogenic pituitary-ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone-agonist testing. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000; 85(3): 995-1000.

Chang RJ , Dumesic DA. Polycystic Ovary Syndrome and Hyperandrogenic States. İçinde, Strauss JF, Barbieri RL, Gargiulo AR, (eds). Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 8th Edition. Elsevier: Philadelphia; 2019, s:520-555

Chang WY, Knochelhauer ES, Bartolucci AA, Azziz R. Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. *Fertility & Sterility*. 2005; 83(6): 1717-23.

Chereau A: Mem. Pour Servir a l'Etude des Malades des Ovaires, Paris, 1844, Fortin, Masson & Cie

Choi Y, Rajkovic A. Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 35747–35756.

Clairmont A, Tessman D, Stock A, Nicolai S, Stahl W, Sies H: Induction of gap junctional intercellular communication by vitamin D in human skin fibroblasts is dependent on the nuclear Induction of gap junctional intercellular communication by

vitamin D in human skin fibroblasts is dependent on the nuclear vitamin D receptor. *Carcinogenesis*. 1996; 17:1389–1391.

Collins JA: Unexplained infertility, içinde: Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, et al, (eds). *Infertility: evaluation and treatment*. 1st Edition. WB Saunders: Philadelphia; 1995, s: 249–262.

Concannon CG, Gorman AM, Samali A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*. 2003; 8(1):61-70.

Conti M, Hormones and growth factors in the regulation of oocyte maturation. İçinde: Eds: Trounson A, Gosden R, Eichenlaub-Ritter U. *Biology and Pathology of the Oocyte*. 2nd edition. Camdridge: 2013 Cambridge university press s :109-118.

Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, Raveendran M, Storey A. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008; 93(3): 881-7.

De Falco M, Fedele V, Cobellis L, Mastrogiacomo A, Giraldi D, Leone S, De Luca L, Laforgia V, De Luca A. Pattern of expression of cyclin D1/CDK4 complex in human placenta during gestation. *Cell and Tissue Research*. 2004; 317: 187–194.

De Felici M. Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. In: Coticchio G et al (eds) *Oogenesis*. Springer, London, 2013. pp 19–37.

Delilbaşı L. İn vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni Uygulamalar ve Güncel Yaklaşımlar). Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti: Ankara; 2008, s: 85-104.

Demircan K, Cömertoğlu İ, Akyol S, Yiğitoğlu BN, Sarıkaya E (2014) A new biological marker candidate in female reproductive system diseases: Matrix metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS). *Journal of The Turkish-German Gynecological Association*. 2014; 15(4):250

Donfack NJ, Alves KA, Alves BG, Rocha RMP, Bruno JB, Bertolini M, Dos Santos RR, Domingues SFS, De Figueiredo JR, Smitz J, Rodrigues APR. Stroma cell-derived factor 1 and connexins (37 and 43) are preserved after vitrification and in vitro culture of goat ovarian cortex. *Theriogenology*. 2018 Aug;116:83-88.

Dottori M, Gross MK, Labosky P, Goulding M 2001 The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development* 128:4127– 4138.

Du Q, Yang S, Wang YJ, Wu B, Zhao YY, Fan B. Effects of thiazolidinediones on polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Adv Ther*. 2012 Sep;29(9):763-74.

Dudek RW. Embriyoloji. Çeviren: İrez T, Erkan M. 1. Baskı, İstanbul İstanbul Tıp Kitapevi: İstanbul; 2016.

Dumesic DA, Abbott DH. Implications of polycystic ovary syndrome on oocyte development. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2008; 26: 53–61.

Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstetrical & Gynecological Survey* 2007; 63: 39–48.

Dumesic DA, Richards JS: Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertility & Sterility*. 2013; 100: 23.

Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208(5008): 349–51.

El Hayek S, Bitar L, Hamdar LH, Mirza FG, Daoud G. Poly Cystic Ovarian Syndrome: An Updated Overview. *Frontiers in Physiology*. 2016; 7: 124.

El-Hayek S., Clarke H.J. Control of Oocyte Growth and Development by Intercellular Communication Within the Follicular Niche. İçinde: Piprek R. (eds) Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. Results and Problems in Cell Differentiation, vol 58. Springer: Cham; 2016, s:191-224.

El-khayat W, Abdel Moety G, Al Mohammady M, Hamed D. A randomized controlled trial of clomifene citrate, metformin, and pioglitazone versus letrozole, metformin, and pioglitazone for clomifene-citrate-resistant polycystic ovary syndrome. International of Journal Gynaecology & Obstetrics. 2016; 132(2): 206-9.

Eniola WO, Adebayo Adetola A, Taiwo Abayomi T. Areview of Female Infertility; important etiological factors and management. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2012; 2(3): 379-385.

Erickson GF. Folliculogenesis in polycystic ovary syndrome. İçinde: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR (Eds): Current Issues in Endocrinology and Metabolism: Polycystic Ovary Syndrome, Cambridge, 1992, Blackwell Scientific Publishers, s:111.

Eroschenko VP. diFiore's Atlas of Histology-with Functional Correlations. Çeviren: Demir R. diFiore'nin Histoloji Atlası. 10. Basım, Palme Yayıncılık; Ankara; 2013; s:375-418.

Fabbro M, Zhou BB, Takahashi M, Sarcevic B, Lal P, Graham ME, Gabrielli BG, Robinson PJ, Nigg EA, Ono Y, Khanna KK. Cdk1/Erk2 and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. Developmental Cell. 2005; 9(4): 477-88.

Ferrari I, Bouilly J, Beau I, Guizzardi F, Ferlin A, Pollazzon M, Salerno M, Binart N, Persani L, Rossetti R. Impaired protein stability and nuclear localization of NOBOX variants associated with premature ovarian insufficiency. Hum Mol Genet. 2016 Dec 1;25(23):5223-5233.

Findlay J. K, Dunning K.R, Gikchrist R.B, Hutt K.J, Russell D.L, Walters K.A
Memeli Overlerinde Folikül Seçimi. İçinde: Leung P, Adashi E, (eds.). The Ovary. 3.
Academic Press: Cambridge&Oxford; 2018, s: 3-5.

Franks S, Robberts R, Hardy K. Gonadotrophin regimens and oocyte quality in
women with polycystic ovaries. Reproductive Biomedicine Online. 2002; 6: 181-184

Franks S: Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. Clin Endocrinol
31:87, 1989.

Franks S. Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. Best Pract Res
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2002; 16(2): 263–72.

Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R et al. The biology of
cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential.
Molecular Oncology. 2011; 5: 164–182

Freimann S, Ben-Ami I, Dantes A, Armon L, Ben Ya'cov-Klein A, Ron-El R,
Amsterdam A. Differential expression of genes coding for EGF-like factors and
ADAMTS1 following gonadotropin stimulation in normal and transformed human
granulosa cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;
333(3):935-43.

Freundl G, Godehardt E, Kern PA, Frank-Herrmann P, Koubenec HJ, Gnoth Ch.
Estimated maximum failure rates of cycle monitors using daily conception
probabilities in the menstrual cycle. Hum Reprod. 2003 Dec;18(12):2628-33.

Gao S, De Geyter C, Kossowska K, Zhang H. FSH stimulates the expression of
the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles. Molecular Human
Reproduction. 2007; 13: 465-71.

García-Ulloa AC, Arrieta O. Tubal occlusion causing infertility due to an
excessive inflammatory response in patients with predisposition for keloid formation.
Med Hypotheses. 2005;65(5):908-14.

Garrido C, Schmitt E, Candé C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle*. 2003; 2(6):579-84.

Gartner LP, Hiatt JL *Hücre Biyolojisi ve Histoloji*. Çeviren: Hürdağ C. 1. baskı, İstanbul Tıp Kitabevi: İstanbul; 2016, s:330-350.

Ge H, Zhang F, Duan P, Zhu N, Zhang J, Ye F, Shan D, Chen H, Lu X, Zhu C, Ge R, Lin Z. Mitochondrial Uncoupling Protein 2 in human cumulus cells is associated with regulating autophagy and apoptosis, maintaining gap junction integrity and progesterone synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017; 443:128-137.

Gershon E, Plaks V, Aharon I, Galiani D, Reizel Y, Sela-Abramovich S, Granot I, Winter-hager E, Dekel N. Oocyte-directed depletion of connexin43 using the Cre-LoxP system leads to subfertility in female mice. *Developmental Biology*. 2008; 313:1-12.

Gittens JEI, Kidder GM. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J Cell Sci* 2005; 118:5071 – 5078.

GohariTaban S, Amiri I, Soleimani Asl S, Saidijam M, Yavangi M, Khanlarzadeh E, Mohammadpour N, Shabab N, Artimani T. Abnormal expressions of ADAMTS-1, ADAMTS-9 and progesterone receptors are associated with lower oocyte maturation in women with polycystic ovary syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2019; 299(1):277-286.

Gosden R, Lee B. Portrait of an oocyte: our obscure origin. *Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120(4): 973-83.

Guruvaiah P, Govatati S, Reddy TV, Beeram H, Deenadayal M, Shivaji S, Bhanoori M. Analysis of Connexin37 gene C1019T polymorphism and PCOS susceptibility in South Indian population: case-control study. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproduction Biology*. 2016; 196:17-20.

Guven MA, Dilek U, Pata O, Dilek S, Ciragil P. Prevalance of Chlamydia trochomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in the unexplained infertile women. Arch Gynecol Obstet. 2007 Sep;276(3):219-23.

Haas J, Ophir L, Barzilay E, Machtinger R, Yung Y, Orvieto R, Hourvitz A. Standard human chorionic gonadotropin versus double trigger for final oocyte maturation results in different granulosa cells gene expressions: a pilot study. Fertility & Sterility. 2016; 106(3):653-659.

Hague WM, Adams J, Rodda C, Brook CG, de Bruyn R, Grant DB, Jacobs HS. The prevalence of polycystic ovaries in patients with congenital adrenal hyperplasia and their close relatives. Clinical Endocrinology (Oxf). 1990; 33(4): 501-10.

Han Y, Xi S, Zhang X, Yan C, Yang Y, Kang J. Association of connexin 37 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in northern Han Chinese. Cardiology. 2008; 110(4):260–5.

Hara S, Takahashi T, Amita M, Matsuo K, Igarashi H, Kurachi H. Pioglitazone counteracts the tumor necrosis factor- α inhibition of follicle-stimulating hormone-induced follicular development and estradiol production in an in vitro mouse preantral follicle culture system. J Ovarian Res. 2013 Sep 30;6(1):69.

Hart R, Doherty DA. The potential implications of a PCOS diagnosis on a woman's long-term health using data linkage. J Clin Endocrinol Metab. 2015; 100(3): 911-9.

Hasegawa J, Yanaihara A, Iwasaki S, Mitsukawa K, Negishi M, Okai T. Reduction of connexin 43 in human cumulus cells yields good embryo competence during ICSI. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2007; 24:463–6.

Heller DT, Cahill DM, Schultz RM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. Developmental Biology. 1981; 84(2):455–64.

Hruska KS, Furth PA, Seifer DB, Sharara FI, Flaws JA. Environmental factors in infertility. *Clin Obstet Gynecol*. 2000 Dec;43(4):821-9.

Huang X, Hao C, Shen X, Liu X, Shan Y, Zhang Y, Chen L. Differences in the transcriptional profiles of human cumulus cells isolated from MI and MII oocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2013; 145(6):597-608.

Huang Y, Yu Y, Gao J, Li R, Zhang C, Zhao H, Zhao Y, Qiao J. Impaired oocyte quality induced by dehydroepiandrosterone is partially rescued by metformin treatment. *PLoS One*. 2015 Mar 26;10(3):e0122370.

Huntriss J, Hinkins M, Picton HM. cDNA cloning and expression of the human NOBOX gene in oocytes and ovarian follicles. *Molecular Human Reproduction*. 2006; 12:283–289.

Hwang KR, Choi YM, Kim JJ, Chae SJ, Park KE, Jeon HW, Ku SY, Kim SH, Kim JG, Moon SY. Effects of insulin-sensitizing agents and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Exp Reprod Med*. 2013 Jun;40(2):100-5.

Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(7):2361-5.

Indran IR, Lee BH, Yong EL. Cellular and Animal Studies: Insights into Pathophysiology and Therapy of PCOS. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016 Nov;37:12-24.

Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Morita R, Takahashi A, Asanuma H et al. Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *The American Journal of Pathology*. 2011a; 178: 1805–1813.

Inoda S, Morita R, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Nakazawa E et al. The feasibility of Cep55/c10orf3 derived peptide vaccine therapy for colorectal carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*. 2011b; 90: 55–60.

Ismat A, Cheshire AM, Andrew DJ. The secreted AdamTS-A metalloprotease is required for collective cell migration. *Development*. 2013; 140:1981–1993.

Jeffery J, Sinha D, Srihari S, Kalimutho M, Khanna KK. Beyond cytokinesis: the emerging roles of CEP55 in tumorigenesis. *Oncogene*. 2015; 35(6): 683-90.

Jia Y, Nan P, Zhang W, Wang F, Zhang R, Liang T, Ji X, Du Q, Chang Z. Transcriptome analysis of three critical periods of ovarian development in Yellow River carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*. 2018 Jan 1;105:15-26.

Jones RL, Pepling ME. KIT signaling regulates primordial follicle formation in the neonatal mouse ovary. *Developmental Biology*. 2013; 382: 186–197.

Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S. 9. basım, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.: Ankara; 2006; s:435-455.

Kalma Y, Granot I, Galiani D, Barash A, Dekel N. Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation. *Endocrinology*. 2004; 145(4):1617–24.

Karaköse M, Demircan K, Tural E, Demirci T, Arslan MS, Sahin M, Celik HT, Kazanci F, Karakaya J, Cakal E, Delibasi T. Clinical significance of ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS9 aggrecanases and IL-17A, IL-23, IL-33 cytokines in polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2016; 39(11):1269–1275.

Kauffman AS, Thackray VG, Ryan GE, Tolson KP, Glidewell-Kenney CA, Semaan SJ, Poling MC, Iwata N, Breen KM, Duleba AJ, Stener-Victorin E, Shimasaki S, Webster NJ, Mellon PL. A Novel Letrozole Model Recapitulates Both

the Reproductive and Metabolic Phenotypes of Polycystic Ovary Syndrome in Female Mice. *Biology of Reproduction*. 2015; 93(3): 69.

Keefe CC, Goldman MM, Zhang K, Clarke N, Reitz RE, Welt CK. Simultaneous measurement of thirteen steroid hormones in women with polycystic ovary syndrome and control women using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *PLoS One*. 2014; 9(4): e93805.

Kelley ST, Skarra DV, Rivera AJ, Thackray VG. The Gut Microbiome Is Altered in a Letrozole-Induced Mouse Model of Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0146509.

Kempisty B, Ziółkowska A, Piotrowska H, Antosik P, Bukowska D, Zawierucha P, Jaśkowski JM, Brüssow KP, Nowicki M, Zabel M. Expression and cellular distribution of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) and connexin 43 (Cx43) in porcine oocytes before and after in vitro maturation. *Acta Vet Hung*. 2014; 62(1):84-95.

Kempisty B, Ziółkowska A, Piotrowska H, Zawierucha P, Antosik P, Bukowska D, Ciesiółka S, Jaśkowski JM, Brüssow KP, Nowicki M, Zabel M. Real-time proliferation of porcine cumulus cells is related to the protein levels and cellular distribution of Cdk4 and Cx43. *Theriogenology*. 2013; 80(4):411-20.

Kerr B, Garcia-Rudaz C, Dorfman M, Paredes A, Ojeda SR. NTRK1 and NTRK2 receptors facilitate follicle assembly and early follicular development in the mouse ovary. *Reproduction*. 2009; 138(1): 131-40.

Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2002; 123(5):613–20.

Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:399 – 413.

Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. Çeviren: Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık; Ankara; 2006; s:565-607.

Kim B, Kim Y, Cooke PS, Rüther U, Jorgensen JS. The fused toes locus is essential for somatic-germ cell interactions that foster germ cell maturation in developing gonads in mice. Biol Reprod. 2011 May;84(5):1024-32.

Kim CH, Jeon GH, Kim SR, Kim SH, Chae HD, Kang BM. Effects of pioglitazone on ovarian stromal blood flow, ovarian stimulation, and in vitro fertilization outcome in patients with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2010 Jun;94(1):236-41.

Knight PG, Satchell L, Glister C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. Mol Cell Endocrinol. 2012; 359(1-2): 53-65.

Kohoutek J, Dvůrák P, Hampl A. Temporal distribution of CDK4, CDK6, D-type cyclins, and p27 in developing mouse oocytes. Biol Reprod. 2004; 70(1):139-45.

Kovacs The Role of Metformin in PCOS-Related Infertility. 2017

Kumari SS, Varadaraj K, Valiunas V, Ramanan SV, Christensen EA, Beyer EC, Brink PR. Functional expression and biophysical properties of polymorphic variants of the human gap junction protein connexin37. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000; 274(1):216-24.

Kuno K, Terashima Y, Matsushima K. ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. Journal of Biological Chemistry. 1999; 274(26):18821–18826.

Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. Journal of Cellular Molecular Medicine. 2008; 12(3):743-61.

Laufer MR, Floor AE, Parsons KE, Kuntz KM, Barbieri RL. Hormone testing in women with adult-onset amenorrhea. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(3):200-3.

Lechowska A, Bilinski S, Choi Y, Shin Y, Kloc M, Rajkovic A. Premature ovarian failure in nobox-deficient mice is caused by defects in somatic cell invasion and germ cell cyst breakdown. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2011; 28(7):583-9.

Lee HH, Elia N, Ghirlando R, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science.* 2008; 322: 576–580

Lee RK, Li SH, Lu CH, Ho HY, Chen YJ, Yeh HI. Abnormally low expression of connexin 37 and connexin 43 in subcutaneously transplanted cryopreserved mouse ovarian tissue. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2008; 25(9-10):489–97.

Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS: Fox's in development and disease. *Trends in Genetics.* 2003; 19:339–344.

Leon Speroff, RH Class, NG Kase. Anovulation and The Polycystic Ovary *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* 2005;465-491.

Leu HB, Chung CM, Chuang SY, Bai CH, Chen JR, Chen JW, Pan WH. Genetic variants of connexin37 are associated with carotid intima-medial thickness and future onset of ischemic stroke. *Atherosclerosis.* 2011; 214(1):101-6.

Leung DTH, Fuller PJ, Chu S. Impact of FOXL2 mutations on signaling in ovarian granulosa cell tumors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2016; 72:51-54.

Li L, Wang B, Zhang W, Chen B, Luo M, Wang J, Wang X, Cao Y, Kee K. A homozygous NOBOX truncating variant causes defective transcriptional activation

and leads to primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*. 2017; 32(1):248-255.

Li S, Zhai J, Liu J, Di F, Sun Y, Li W, Chen ZJ, Du Y. Erythropoietin-producing hepatocellular A7 triggering ovulation indicates a potential beneficial role for polycystic ovary syndrome. *EBioMedicine*. 2018 Oct;36:539-552.

Li TY, Colley D, Barr KJ, Yee SP, Kidder, GM. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *Journal of Cell Science*. 2007; 120:4117-4125.

Li XJ, Yu YX, Liu CQ, Zhang W, Zhang HJ, Yan B, Wang LY, Yang SY, Zhang SH. Metformin vs thiazolidinediones for treatment of clinical, hormonal and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Mar;74(3):332-9.

Liew SH, Vaithyanathan K, Cook M, Bouillet P, Scott CL, Kerr JB, et al. Loss of the proapoptotic BH3-only protein BCL-2 modifying factor prolongs the fertile life span in female mice. *Biol Reprod* 2014; 90: 77.

Lipskind S, Lindsey JS, Gerami-Naini B, Eaton JL, O'Connell D, Kiezun A, Ho JWK, Ng N, Parasar P, Ng M, Nickerson M, Demirci U, Maas R, Anchan RM. An Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Model for Ovarian Granulosa Cell Development and Steroidogenesis. *Reprod Sci*. 2018 May;25(5):712-726.

Listi F, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Incalcaterra E, Hoffmann E, Lio D, Caruso C. Connexin37 1019 gene polymorphism in myocardial infarction patients and centenarians. *Atherosclerosis*. 2007; 191(2):460-1.

Listi F, Candore G, Lio D, Russo M, Colonna-Romano G, Caruso M, Hoffmann E, Caruso C. Association between C1019T polymorphism of connexin37 and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily. *International Journal of Cardiology*. 2005; 102(2):269-71

Liu JJ, Ma X, Cai LB, Cui YG, Liu JY. Downregulation of both gene expression and activity of Hsp27 improved maturation of mouse oocyte in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010; 8:47.

Liu S, Dai X, Cai L, Ma X, Liu J, Jiang S, Liu J, Cui Y. Effect of Hsp27 on early embryonic development in the mouse. *Reproductive Biomedicine Online*. 2013; 26(5):491-9.

Liu XM, Yan MQ, Sha QQ, Huang T, Zhao H, Liu HB, Fan HY, Chen ZJ. Loss of oocyte Rps26 in mice arrests oocyte growth and causes premature ovarian failure *Cell Death and Disease* .2018; 9; 1144.

Lucis OJ, Hobkirk R, Hollenberg CH, Macdonald SA, Blahey P. Polycystic ovaries associated with congenital adrenal hyperplasia. *Canadian Medical Association Journal*. 1966; 94(1): 1-7.

Ma X, Fan L, Meng Y, Hou Z, Mao YD, Wang W, Ding W, Liu JY. Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome. *Molecular Human Reproduction*. 2007; 13(8):527-35.

Ma X, Fan L, Meng Y, Hou Z, Mao YD, Wang W, Ding W, Liu JY. Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2007 Aug;13(8):527-35.

Magos A. Hysteroscopic treatment of Asherman's syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2002;4 Suppl 3:46-51.

Mahlapuu M, Ormestad M, Enerback S, Carlsson P 2001 The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development* 128: 155–166.

March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction*. 2010; 25(2): 544-51.

Marin R, Tanguay RM. Stage-specific localization of the small heat shock protein Hsp27 during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. 1996 Sep;105(3):142-9.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*. 2002; 296:2178–2180.

McGovern PG, Legro RS, Myers ER, Barnhart HX, Carson SA, Diamond MP, Carr BR, Schlaff WD, Coutifaris C, Steinkampf MP, Nestler JE, Gosman G, Leppert PC, Giudice LC; National Institutes for Child Health and Human Development-Reproductive Medicine Network. Utility of screening for other causes of infertility in women with "known" polycystic ovary syndrome. *Fertility & Sterility*. 2007; 87(2): 442-4.

Mejia RB, Summers KM, Kresowik JD, Van Voorhis BJ. A randomized controlled trial of combination letrozole and clomiphene citrate or letrozole alone for ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2019 Mar;111(3):571- 578.

Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S, Bernabeu R. Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reprod Biomed Online*. 2008 Jun;16(6):842-50.

Meng TG, Hu MW, Ma XS, Huang L, Liang QX, Yuan Y, Hou Y, Wang H, Schatten H, Wang ZB, Sun QY. Oocyte-specific deletion of furin leads to female infertility by causing early secondary follicle arrest in mice. *Cell Death Dis*. 2017 Jun 1;8(6):e2846.

Mesbah F, Moslem M, Vojdani Z, Mirkhani H. Does metformin improve in vitro maturation and ultrastructure of oocytes retrieved from estradiol valerate polycystic ovary syndrome-induced rats. *J Ovarian Res*. 2015 Nov 14;8:74.

Mescher AL. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13th Edition. McGraw-Hill Education: USA; 2016, s:460-489.

Michalovic L, Currin L, Gutierrez K, Bellefleur AM, Glanzner WG, Schuermann Y, de Macedo MP, Bohrer RC, Dicks N, Lopez R, Taibi M, Madogwe E, St-Yves A, Mondadori RG, Gourdon J, Vigneault C, Baldassarre H, Bordignon V. Granulosa cells of prepubertal cattle respond to gonadotropin signaling and upregulate genes that promote follicular growth and prevent cell apoptosis. *Mol Reprod Dev*. 2018 Dec;85(12):909-920.

Mishra B, Koshi K, Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K. Expression of ADAMTS1 mRNA in bovine endometrium and placenta during gestation. *Domestic Animal Endocrinology*. 2013; 45(1):43–48

Misugi T, Ozaki K, El Beltagy K, Tokuyama O, Honda K, Ishiko O. Insulin-lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-induced PCOS rats. *Gynecol Obstet Invest*. 2006;61(4):208-15.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 9th edition, Elsevier Saunder Inc. United States of America, 2013.

Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Developmental Cell*. 2003; 4(1):119-29.

Neil P Johnson Metformin use in women with polycystic ovary syndrome

Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Sep;45(3 Suppl):S116-24.

Nilsson EE, Schindler R, Savenkova MI, Skinner MK. Inhibitory actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20087.

Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. Annual New York Academic Science. 2008; 1127: 1-9.

Oqani RK, Lin T, Lee JE, Kim SY, Kang JW, Jin DI. Effects of CDK inhibitors on the maturation, transcription, and MPF activity of porcine oocytes. Reprod Biol. 2017 Dec;17(4):320-326.

Özler S, Öztaş E, Tokmak A, Ergin M, Kuru Pekcan M, Gümüş Güler B, Yakut Hİ, Yılmaz N. Role of Versican and ADAMTS-1 in Polycystic Ovary Syndrome. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2017 Mar 1;9(1):24-30.

Pache TD, Fauser BC. Polycystic ovaries in female-to-male transsexuals. Clinical Endocrinology (Oxf). 1993; 39(6): 702-3.

Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype. Molecular and Cellular Endocrinology. 2013; 373(1-2): 8-20.

Palomba S, de Wilde MA, Falbo A, Koster MP, La Sala GB, Fauser BC. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. Human Reproduction Update. 2015; 21(5): 575-92.

Palomba S, Falbo A, Russo T, Orio F, Tolino A, Zullo F. Systemic and local effects of metformin administration in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): relationship to the ovulatory response. Hum Reprod. 2010 Apr;25(4):1005-13.

Pannetier M, Chassot AA, Chaboissier MC, Pailhoux E. Involvement of FOXL2 and RSPO1 in Ovarian Determination, Development, and Maintenance in Mammals. Sex Dev. 2016;10(4):167-184.

Paradisi R, Fabbri R, Battaglia C, Venturoli S. Ovulatory effects of flutamide in the polycystic ovary syndrome. Gynecological Endocrinology. 2013 Apr;29(4):391-5.

Parry P, Wei Y, Evans G 1994 Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer* 11:79–84.

Peluso MC, Murphy MJ, Talcott Baughman S, Stouffer RL, Hennebold JD. Systematic analysis of protease gene expression in the rhesus macaque ovulatory follicle: metalloproteinase involvement in follicle rupture. *Endocrinology*. 2011; 152(10):3963–3974

Pisarska MD, Barlow G, Kuo FT. Minireview: roles of the forkhead transcription factor FOXL2 in granulosa cell biology and pathology. *Endocrinology*. 2011; 152(4):1199-208.

Potapova TA, Sivakumar S, Flynn JN, Li R, Gorbsky GJ. Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. *Mol Biol Cell*. 2011; 22(8): 1191–206.

Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Human Reproduction Update*. 2011; 17(1): 17-33.

Qin N, Fan XC, Xu XX, Tyasi TL, Li SJ, Zhang YY, Wei ML, Xu RF. Cooperative Effects of FOXL2 with the Members of TGF- β Superfamily on FSH Receptor mRNA Expression and Granulosa Cell Proliferation from Preantral Follicles. *PLoS One*. 2015 Oct 23;10(10):e0141062.

Radisavljevic Z. Nitric oxide suppression triggers apoptosis through the FKHRL1 (FOXO3A)/ROCK kinase pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer*. 2003;97(5):1358-63. Erratum in: *Cancer*. 2003; 97(12):3130.

Raga F, Bauset C, Remohi J, Bonilla-Musoles F, Simón C, Pellicer A. Reproductive impact of congenital Müllerian anomalies. *Hum Reprod*. 1997 Oct;12(10):2277-81.

Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. Nobox deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*. 2004; 305:1157–1159.

Reindollar RH, Novak M, Tho SP, McDonough PG. Adult-onset amenorrhea: a study of 262 patients. *Am J Obstet Gynecol*. 1986 Sep;155(3):531-43.

Rinaldi VD, Bloom JC, Schimenti JC. Whole Mount Immunofluorescence and Follicle Quantification of Cultured Mouse Ovaries. *J Vis Exp*. 2018; 2(135).

Rittmaster RS. Antiandrogen treatment of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*. 1999; 28(2): 409-21.

Roberts PJ, Bisi JE, Strum JC, Combest AJ, Darr DB, Usary JE, Zamboni WC, Wong KK, Perou CM, Sharpless NE. Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2012; 104(6):476-87.

Rosewell KL, Al-Alem L, Zakerkish F, McCord L, Akin JW, Chaffin CL, Brännström M, Curry TE Jr. Induction of proteinases in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*. 2015 Mar;103(3):826-33.

Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. Çeviri Editörü: Baykal B. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile*. 6.basım, Palme Yayıncılık, Ankara; 2014.

Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 7th Edition. Wolters Kluwer Health: Philadelphia; 2016, s:834-899.

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(1):19–25.

Russell DL, Brown HM, Dunning KR. ADAMTS proteases in fertility. *Matrix Biology*. 2015; 44:54–63.

Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem* 2003; 278: 42330–42339.

Sabatini ME, Guo L, Lynch MP, Doyle JO, Lee H, Rueda BR, Styer AK. Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation. *J Ovarian Res*. 2011 May 23;4(1):8.

Sadler TW. *Langman’s Medikal Embriyoloji*. Çeviren: Başaklar AC., 10.basım, Palme Yayıncılık: Ankara; 2011, s:313-355.

Sahu B, Ozturk O, Ranierrri M, Serhal P. Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2008; 277: 239-44.

Sangeeta S. Metformin and pioglitazone in polycystic ovarian syndrome: a comparative study. *J Obstet Gynaecol India*. 2012 Oct;62(5):551-6.

Santiquet N, Robert C ve Richard FJ. The dynamics of connexin expression, degradation and localisation are regulated by gonadotropins during the early stages of in vitro maturation of swine oocytes. *PLoS One*. 2013; 8:e68456.

Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*. 2004;131(4):933-42.

Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor 4 years later. *Endocrine Reviews*. 1993s;14(3):324-47.

Shi D, Vine DF. Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility & Sterility*. 2012; 98(1): 185-93.

Shimada M, Terada T. Phosphatidylinositol 3- kinase in cumulus cells and oocytes is responsible for activation of oocyte mitogen-activated protein kinase during meiotic progression beyond the meiosis I stage in pigs. *Biology of Reproduction*. 2001; 64:1106–14.

Shimada, M, Maeda T, Terada, T. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 2001; 64:1255–63.

Shimada, M., Yamashita, Y., Ito, J., Okazaki, T., Kawahata, K. & Nishibori, M. (2004) Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. *J. Mol. Endocrinol.*, 33, 209-225.

Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* 2000;105:1345–52.

Shinohara T, Ohta Y, Kawate N, Takahashi M, Sakagami N, Inaba T, Tamada H. Treatment with the MAPK kinase inhibitor U0126 during the first two hours of in vitro maturation improves bovine oocyte developmental competence. *Reproduction in Domestic Animals*. 2018; 53(1):270-273.

Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *PNAS*. 2015; 112(17): 5527–5532.

Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin37. *Nature* 1997;385:525–529.

Simon, AM, Chen H ve Jackson CL. Cx37 and Cx43 localize to zona pellusida in mouse ovarian follicles. *Cell Communication & Adhesion*. 2006; 13:61–77.

Sloboda DM, Hickey M, Hart R. Reproduction in females: the role of the early life environment. *Hum Reprod Update*. 2011 Mar-Apr;17(2):210-27.

Smith S, Pfeifer SM, Collins JA: Diagnosis and management of female infertility. *JAMA*. 2003; 290:1767.

Somerville RP, Longpre JM, Jungers KA, Engle JM, Ross M, Evanko S, Wight TN, Leduc R, Apte SS. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:9503–9513.

Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 2000; 127:4645–4654.

Spinder T, Spijkstra JJ, van den Tweel JG, Burger CW, van Kessel H, Hompes PG, Gooren LJ. The effects of long term testosterone administration on pulsatile luteinizing hormone secretion and on ovarian histology in eugonadal female to male transsexual subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1989; 69(1): 151-7.

Stabile G, Borrielli I, Artenisio AC, Bruno LM, Benvenga S, Giunta L, La Marca A, Volpe A, Pizzo A. Effects of the insulin sensitizer pioglitazone on menstrual irregularity, insulin resistance and hyperandrogenism in young women with polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2014 Jun;27(3):177-82.

Stein ve Levental 1935 Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *AJOG*. 1935; 29:2, s: 181–191.

Suzumori N, Yan C, Matzuk MM, Rajkovic A. Nobox is a homeobox- encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mechanisms of Development*. 2002; 111:137–141.

Talhok R, Tarraf C, Kobrossy L, Shaito A, Bazzi S, Bazzoun D, El-Sabban M. Modulation of Cx43 and Gap Junctional Intercellular Communication by Androstenedione in Rat Polycystic Ovary and Granulosa Cells in vitro. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2012; 13(1):21-32.

Tang H, Liu Y, Li J, Yin Y, Li G, Chen Y, Li S, Zhang Y, Lin H, Liu X, Cheng CH. Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Scientific Reports*. 2016; 6:28545.

Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 May 16;(5):CD003053.

Teilmann SC: Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Molecular Cell Endocrinology*. 2005; 234:27–35.

The MT,Wong ST, Neill GW,Ghali LR, Philpott MP, Quinn AG 2002 FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 62:4773– 4780.

The Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2008; 23: 462-477.

Tingen CM Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK. Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod* 2009; 81: 16–25.

Tola EN, Karatopuk DU, Koroglu N, Ergin M, Oral HB. Follicular ADAMTS-1 and aggrecan levels in polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2017 Jun;34(6):811-816.

Tola EN, Koroglu ND, Yalcin SE, Oral HB. The role of serum ADAMTS-1 and aggrecan on polycystic ovary syndrome in adolescents and younger-aged females. *Arch Gynecol Obstet.* 2018 Feb;297(2):487-493.

Tomassetti C, Meuleman C, Pexsters A, Mihalyi A, Kyama C, Simsa P, D'Hooghe TM. Endometriosis, recurrent miscarriage and implantation failure: is there an immunological link? *Reprod Biomed Online.* 2006 Jul;13(1):58-64.

Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis *in vivo*, *Genes & Development.* 1998; 12:1691–1704.

Tripurani SK, Lee KB, Wang L, Wee G, Smith GW, Lee YS, Latham KE, Yao J. A novel functional role for the oocyte-specific transcription factor newborn ovary homeobox (Nobox) during early embryonic development in cattle. *Endocrinology.* 2011 Mar;152(3):1013-23.

Tsubota K, Kanki M, Noto T, Nakatsuji S, Oishi Y, Matsumoto M, Nakayama H. Altered gene expression profile in ovarian follicle in rats treated with indomethacin and RU486. *J Toxicol Sci.* 2015 Jun;40(3):413-25.

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(11): 1171-81.

Uhlenhaut NH, Treier M. Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction.* 2011; 142(4):489-95.

van Houten EL, Visser JA. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: a possible link between metabolism and ovarian function? *Reproductive Biology.* 2014;14(1): 32-43.

Veitch GI, Gittens JE, Shao Q, Laird DW, Kidder GM. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *Journal of Cell Science*. 2004; 117(Pt 13):2699-707.

Velazquez MM, Alfaro NS, Dupuy CR, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci*. 2010 Apr;118(2-4):201-9.

Veltman-Verhulst SM, Fauser BC, Eijkemans MJ. High singleton live birth rate confirmed after ovulation induction in women with anovulatory polycystic ovary syndrome: validation of a prediction model for clinical practice. *Fertility & Sterility*. 2012; 98(3): 761-768.

Verdin H, De Baere E. FOXL2 impairment in human disease. *Hormon Research in Paediatrics*. 2012; 77(1):2-11.

Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012; 5(1):7.

Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One* 2010; 5: 8772.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of Reproduction*. 2012; 86(5): 1-12.

Walters KA, Bertoldo MJ, Handelsman DJ. Evidence from animal models on the pathogenesis of PCOS. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018; 32(3): 271-281.

Walters KA. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction*. 2015; 149: R193e218.

Wang HX, Tong D, El-Gehani F, Tekpetey FR, Kidder GM. Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: contribution to embryo quality. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009; 13:972–84.

Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*. 2003; 362(9389): 1017-21.

Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*. 1989; 57:645– 658.

Welt CK, Gudmundsson JA, Arason G, Adaams J, Palsdottir H, Gudlaugsdottir G, Ingadottir G, Crowley WF. Characterizing discrete subsets of polycystic ovary syndrome as defined by the Rotterdam criteria: the impact of weight on phenotype and metabolic features. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91(12): 4842-8.

White TW, Paul DL, Goodenough DA, Bruzzone R. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Molecular Biology of the Cell*. 1995; 6(4):459-70.

White YAR, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature Medicine*. 2012; 18(3): 413–421.

Whitlock NA, Lindsey K, Agarwal N, Crosson CE, Ma JX. Heat shock protein 27 delays Ca²⁺-induced cell death in a caspase-dependent and -independent manner in rat retinal ganglion cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005; 46(3):1085-91.

Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *PNAS*. 2013; 110(39):E3723–29.

Willis EL, Bridges PJ, Fortune JE. Progesterone receptor and prostaglandins mediate luteinizing hormone-induced changes in messenger RNAs for ADAMTS

proteases in theca cells of bovine periovulatory follicles. *Mol Reprod Dev.* 2017 Jan;84(1):55-66.

Winterhager E, Kidder GM. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum Reprod Update.* 2015 May-Jun;21(3):340-52.

Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Høst T, Borup R, Grøndahl ML. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Hum Reprod.* 2014 May;29(5):997-1010.

Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF III. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2007; 92: 705–713.

Wu CH, Yang JG, Yang JJ, Lin YM, Tsai HD, Lin CY, Kuo PL: Androgen excess down-regulates connexin43 in a human granulosa cell line. *Fertility & Sterility.* 2010; 94:2938–2941.

Xiao S, Li Y, Li T, Chen M, Xu Y, Wen Y, Zhou C. Evidence for decreased expression of ADAMTS-1 associated with impaired oocyte quality in PCOS patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2014; 99(6):E1015-21.

Xu Y, Wu Y, Huang Q. Comparison of the effect between pioglitazone and metformin in treating patients with PCOS:a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2017 Oct;296(4):661-677.

Xu ZY, Ma XS, Qi ST, Wang ZB, Guo L, Schatten H, Sun QY, Sun YP. Cep55 regulates spindle organization and cell cycle progression in meiotic oocyte. *Scientific Reports.* 2015 Nov 19; 5: 16978.

Yaba A, Demir N. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Journal of Ovarian Research*. 2012; 5(1): 38.

Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *The New England Journal of Medicine*. 2002; 347(24):1916-23.

Yang M, Li J, An Y, Zhang S. Effects of androgen on immunohistochemical localization of androgen receptor and Connexin 43 in mouse ovary. *Tissue and Cell*. 2015; 47(5):526-32.

Yildiz BO, Bozdogan G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2012;27(10):3067–73).

Yildiz M, Sandikci M. Changes in rat ovary with experimentally induced diabetes and the effects of lycopene on those changes. *Romania Journal of Morphology and Embryology*. 2016; 57(2 Suppl):703-713.

Yu L, Yang H, Xiang Y, Guo X, Liu Z, Guo R. Association between Cx37 rs1764390 polymorphism and susceptibility to sepsis in Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 48:64-70.

Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, editors. *Polycystic ovary syndrome*. Boston, MA: Blackwell Scientific Publications; 1992.

Zhang H, Wei Q, Gao Z, Ma C, Yang Z, Zhao H, Liu C, Liu J, Zhao X, Ma B. G protein-coupled receptor 30 mediates meiosis resumption and gap junction communications downregulation in goat cumulus-oocyte complexes by 17 β -estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Mar;187:58-67.

Zhang Y, Xu Y, Kuai Y, Wang S, Xue Q, Shang J. Effect of testosterone on the Connexin37 of sexual mature mouse cumulus oocyte complex. J Ovarian Res. 2016 Nov 23;9(1):82.

Zhao WP, Wang HW, Liu J, Tan PP, Lin L, Zhou BH. JNK/STAT signalling pathway is involved in fluoride-induced follicular developmental dysplasia in female mice. Chemosphere. 2018 Oct;209:88-95.

Zlotogora J, Sagi M, Cohen T. The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. The American Journal of Human Genetics. 1983; 35(5):1020-7.

Zondek B, Ascheim S: Experimentale Untersuchungen uber die Funktion und das Hormon des Ovariums. Arch Gynaekol. 1926; 127:250, 1926

10. EKLER

EK-1



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

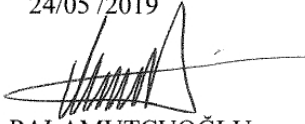
YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
29.06.2016	14	31

Karar 31- Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencileri Tuna ÖNAL'ın “Deneyisel PCOS Modelinde Oosit Matürasyonunun Değerlendirilmesi” başlıklı tez konularının Etik Kurul Onayı almak kaydı ile kabulüne **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

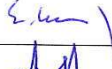
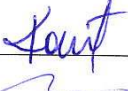
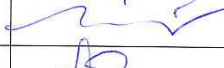
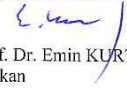
imza Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü		
imza Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	imza Doç. Dr. Özge YILMAZ Müdür Yardımcısı	(İzinli) Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
imza Doç. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye		imza Doç. Dr. Mehmet GÖRAL Üye
imza Özcan GERÇEKER Enstitü Sekreteri		

Aslı Gibidir
24/05 /2019


Aynur PALAMUTÇUOĞLU
Enstitü Sekreteri

EK-2

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	22 / 08 / 2017 / 77.637.435 -		
ARAŞTIRMANIN ADI	Deneysel Polikistik Over Sendromunda Semaforinlerin Potansiyel Rolü		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER - MCBÜ Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Arş. Gör. Tuna Önal,- Doç. Dr. Yıldız Uyar		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☐	Akademik ☒
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	10 / 08 / 2017 / Tarih ve 35195 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları AD		☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☐
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD		☐	☒
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM MD		☐	☒
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji AD		☐	☐
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		☐	☐
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		☐	☐
Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		☐	☐
Etik Kurulumuzun kararı yukarda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.  Prof. Dr. Emin KURT Başkan			

EK-3

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı

"Deneyisel PCOS Modelinde Oosit Matürasyonunun Değerlendirilmesi"

Tezime ilişkin 15/05/2019 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 8'dir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
15/05/2019



Adı Soyadı : Tuna ÖNAL
Öğrenci No : 131348003
Anabilim Dalı : Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Programı : Doktora


DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER)

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın sürecekleme sürecinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdellik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Tuna	Soyadı	Önal
Doğum Yeri	Edirne	Doğum Tarihi	27.03.1988
Uyruğu	T.C	Tel	5393295882
E-mail	tunaonal_17@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2019
Yüksek Lisans	Celal Bayar Üniversitesi	2013
Lisans	Balıkesir Üniversitesi	2010
Lise	Lüleburgaz Lisesi	2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Araştırma Görevlisi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2012-Devam Ediyor

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL	TOEFL	TOEFL	FCE	CAE
				IBT	PBT	CBT		

70

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	İyi
Os X iWork	İyi