



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

**DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE KLOMİFEN
SİTRAT VE ANTİOKSİDAN UYGULAMASININ ENDOMETRİUMDAKİ
OKSİDATİF DURUM VE ÖSTROJEN RESEPTÖRÜ ÜZERİNE ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ŞERİFE DİKAYAK

Danışman
Prof. Dr. NACİ KEMAL KUŞCU

MANİSA – 2013



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

**DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE KLOMİFEN
SİTRAT VE ANTİOKSİDAN UYGULAMASININ ENDOMETRİUMDAKİ
OKSİDATİF DURUM VE ÖSTROJEN RESEPTÖRÜ ÜZERİNE ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ŞERİFE DİKAYAK

Danışman
Prof. Dr. NACİ KEMAL KUŞCU

MANİSA – 2013

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	I
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	II
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Polikistik Over Sendromu	2
2.1.1 Tarihçe	2
2.1.2 Tanı Ölçütleri	3
2.1.3 Fیزیopatoloji	5
2.1.4 Klinik Bulgular	10
2.1.5 Uzun Dönem Sağlık Riskleri	11
2.2 Oksidatif Stres, Serbest Radikaller ve Anti-oksidanlar	13
2.2.1 Reaktif Oksijen Türleri	15
2.2.2 Reaktif Azot-Oksijen Türleri	16
2.2.3 Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Bileşenlerine Etkisi	17
2.2.4 Anti-Oksidan Savunma Sistemi	17
2.2.5 Oksidatif Stres-PKOS-Over ve Endometriyuma Etkileri	18
2.2.6 Polikistik Over Sendromu ve Klomifen Sitrat	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	57
7. KAYNAKLAR	58

KISALTMALAR

OS	Oksidatif Stres
KS	Klomifen Sitrat
Oİ	Ovulasyon İndüksyonu
GH	Granüloza Hücresi
E1	Östron
E2	Östradiol
LH	Lüteinizan Hormon
FSH	Folikül Stümüle Edici Hormon
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
EV	Estradiol Valerat
PKOS	Polikistik Over Sendromu
İD	İnsülin Direnci
USG	Ultrasonografi
A	Androstenedion
T	Testosteron
TAS	Total Antioksidan Seviyesi
TOS	Total Oksidan Seviyesi
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
IUI	İntrauterin İnseminasyon
SOD	Süperoksid Dismutaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1	Androjen Metabolizması Ve Periferik Etkileri
Şekil 2	Grup IV'e Ait Over Dokusu
Şekil 3	Grup I,Grup II, Grup III'de Over Dokusu
Şekil 4	Grup IV'e Ait Uterus Dokusu
Şekil 5	Grup I,Grup II, Grup III'de Uterus Dokusu(Hiperplazili)
Şekil 6	Grup I,Grup II, Grup III'de Uterus Dokusu (Atrofiye Olmuş Endometriyum)
Şekil 7	Grup IV ER α
Şekil 8	Grup I ER α
Şekil 9	Grup II ER α
Şekil 10	Grup III ER α
Şekil 11	Grup IV ER β
Şekil 12	Grup I ER β
Şekil 13	Grup II ER β
Şekil 14	Grup III ER β
Şekil 15	Grup IV SOD
Şekil 16	Grup I SOD
Şekil 17	Grup II SOD
Şekil 18	Grup III SOD
Şekil 19	Grup IV İNOS

Şekil 20	Grup I İNOS
Şekil 21	Grup II İNOS
Şekil 22	Grup III İNOS
Şekil 23	Grup IV eNOS
Şekil 24	Grup I eNOS
Şekil 25	Grup II eNOS
Şekil 26	Grup III eNOS
Tablo 1	PKOS Belirti Ve Bulguları
Tablo 2	Polikistik Over Sendromu Sonuçları
Tablo 3	Bazı Reaktif Oksijen Türleri
Tablo 4	Anti-oksidanlar
Tablo 5	Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü
Tablo 6	Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü
Tablo 7	İmmunohistokimyasal Yöntem
Tablo 8	Gruplara Ait İmmunhistokimyasal Semikantitatif Skorlama (Ort ± SS)
Tablo 9	Gruplar Arası İmmunohistokimyasal İstatistik Değerleri (P)

TEŞEKKÜR

Meslek hayatımın en önemli dönüm noktalarından uzmanlık eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, eski Anabilim Dalı Başkanı, Hocam Sayın Prof. Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU'ya teşekkür ederim.

Göreve başladığı günden itibaren kliniğimize kattığı yeniliklerle, bizlere sağladığı imkanlarla eğitime büyük katkısı olan ve birlikte tez yapma fırsatı yakaladığım; tezimin her aşamasında beni yönlendirip, tecrübelerini aktaran, ufkumu açan ve büyük bir sabırla ilgilenen, çok kıymetli tez danışman Hocam yeni Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Naci Kemal KUŞÇU'ya, teşekkürlerimi sunarım.

Tecrübe ve bilgileri ile uzmanlık eğitimime büyük destek ve katkıları olan sayın hocalarım Prof. Dr. Semra Oruç KOLTAN, Prof. Dr. Tevfik GÜVENAL, Prof. Dr. Hasan Tayfun ÖZÇAKIR, Prof. Dr. Yeşim BAYTUR, Prof. Dr. Yıldız UYAR ve tüm diğer değerli hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin yapım sürecindeki katkıları için Sayın Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR'e, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım Sayın Dr. Serap CİLAKER MICİLİ'ye ve özveriyle tezimin her aşamasında yanımda olan Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER'e teşekkür ederim.

Asistanlığa başladığım günden itibaren her zaman bana neşe ve huzur veren, yaşadığımız her mutlulukta birlikte gülebildiğimiz gibi tüm zorluk ve sıkıntılarında da en büyük destekçim olan, sıcacık, sevgi dolu kalbi için dostum Dr. Nagehan İKİZ'e, tanıdığım için kendimi çok şanslı hissettiğim, mesleki her sıkıntıyla alakadar olan, iyi ve kötü günümde sevgi dolu kalbi ve yol göstericiliği ile hayatımda bir köşe taşı olarak her zaman yer alacak olan Dr. Hasan Ulaş BAŞYURT'a, hemşiremiz Züleyha GÖÇMEN başta olmak üzere, tüm değerli hemşirelerimize, sağlık personelimize ve diğer çalışma arkadaşarıma bu zorlu süreçteki desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Tıp fakültesine başladığım ilk günden itibaren sonsuz sabır ve özverisi ile en büyük destekçim olan birtanecik eşim Av. Melih DİKAYAK'a, yaşamım boyunca olduğu gibi bu süreçte de hiçbir fedakarlıktan kaçınmaksızın beni daima destekleyen, yaptığım her işte bana güvenen aileme, her sıkıntımı sayelerinde aştığım, emeğini asla ödeyemeyeceğim canım anneme ve babama, uzakta olsalar da desteklerini ve iyi dileklerini hep hissettiğim dostlarım Arş. Gör. Meltem CAN ve Dr. Ayfer OKUMUŞ'a, hayatımıza girişiyle dünyamızı değiştiren, sevgisini kalbime sığdıramadığım, hayata daha güçlü bakmamı sağlayan birtanecik meleğim, kızım Elif'ime sonsuz teşekkür ederim.

DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE KLOMİFEN SİTRAT VE ANTİOKSİDAN UYGULAMASININ ENDOMETRİUMDAKİ OKSİDATİF DURUM VE ÖSTROJEN RESEPTÖRÜ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmamızın amacı polikistik over sendromunda görülen oksidatif stresin (OS) ovulasyon indüksiyonu (Oİ) amacı ile kullanılan klomifen sitrat (KS) tedavisi ile artıp artmadığını ve olası artış üzerine anti-oksidan E vitamini uygulamasının etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada her grupta 7 adet olmak üzere toplam 4 grup, 28 tane, genç, erişkin, ortalama 200-250 gr ağırlığında hiç gebe kalmamış Wistar Albino sıçan kullanılacaktır. Gruplar deneysel polikistik over sendromu (grup I), deneysel polikistik over sendromu KS ile ovulasyon indüksiyonu yapılan grup (grup II), deneysel polikistik over sendromu ve KS ile ovulasyon indüksiyonu yapılan ve E vitamini verilen grup (grup III) ve herhangi bir ilaç verilmeyecek olan kontrol grubu (grup IV) olacak şekilde planlanmıştır. Sıçanlar 12 saat aydınlık ve karanlık ortamda serbest su ve hazır kuru gıda erişiminde barındırılacaktır. Deneysel polikistik over sendromu oluşturmak için grup I, II ve III'teki her sıçana bir defa yağda çözünmüş 4 mg estradiol valerat (EV) intramüsküler olarak uygulanacak ve injeksiyondan 30 gün sonra deneysel polikistik over sendromu oluşmuş kabul edilecektir. Grup II ve III'teki her sıçana klomifen sitrat injeksiyon ile 10 mg/kg tek doz verilecektir. Grup III'e KS ile birlikte, 21 gün süre ile E vitamini 100 mg/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyon şeklinde verilecektir. Sıçanlar 52.gün anestezi altında (Ketamin HCl 80 mg/kg ve Xylazine 5 mg/kg) servikal dislokasyon yoluyla feda edilecek ve histolojik doku takibi için uterin boynuzlar alınacaktır.

Bulgular: İmmünohistokimyasal değerlendirmede grup I ve grup II'de grup IV'e göre, ER α ve ER β reseptör konsantrasyonları düşük, SOD ve iNOS seviyesi yüksek, eNOS seviyesi azalmış tespit edildi. Grup III'de ise E vitamini desteği ile

ER α ve ER β reseptör konsantrasyonları arttı, SOD ve iNOS seviyeleri azaldı, eNOS seviyesinde anlamlı olmayan bir artış görüldü.

Sonuç: Gerek deneysel PKOS modelinde gerekse KS tedavisinde oluşan OS, implantasyonda rol oynayan reseptörleri ve endometriyal kan akımını olumsuz etkiler ve bu olumsuz süreç anti-oksidan E vitamini ile geri dönebilir. Özellikle PKOS olgularında KS ile yapılan ovulasyon indüksiyonunda elde edilen düşük gebelik oranları, anti-oksidan tedavi ile düzelebilir.

Anahtar Kelimeler: PKOS, oksidatif stres, implantasyon, anti-oksidan, E vitamini, eNOS, iNOS

THE EFFECT ON OXIDATIVE STATE AND ESTROGEN RESEPTORES AT ENDOMETRIUM BY ADMISITRATION OF CLOMIPHENE CITRATE AND ANTIOXIDANTS ON EXPERIMENTAL POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME MODEL

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective of this study is to search the oxidative stress (OS) which occurs in polycystic ovarian syndome whether increase or not with the treatment of clomiphene citrate (CC) that using to induce ovulation(OI) and the effect of admisitration of anti-oxidant vitamin E on possible increase.

MATERIAL AND METHODS: There will be used totaly 28 rats in 4 groups of which containing 7 nuliparous young, adult, average 200-250 gr of weighted Wistar albino rats in this study. The groups are planned as: experimentally polycystic ovarian syndrommed (group I), Induced ovulation by CC with experimentally polycystic ovarian syndrommed (group II), Induced ovulation by CC with experimentally polycystic ovarian syndrommed and administered vitamin E (group III)and the control group which none of medication will be administered. (group IV)Rats wil be looked after with both 12 hours light and dark place where avaiable water and instant dry food. To occur experimental polycystic ovarian syndrome in groups I, II and III; 4mg oestradiol valerat (OV) in oil solution via intramuscular injection will be applied once and after 30 days of injection it will be accepted that experimental polycystic ovarian syndrome has been occured. In Group II and III, each of the rats will be given clomiphene citrate 10 mg/kg with one injection. In Group III, additional vitamin E as intraperitoneal injection, 100mg/kg dosaged with 21days of duration. will be given with CC. Rats will be terminated by cervical dislocation on the day of 52nd under the anesthesia (Ketamine HCl 80 mg/kg and Xylazine 5 mg/kg) and uterin horns will be taken for histological analysis.

RESULTS: Under immunohistochemical analysis in group I and group II, ER α and ER β receptor concentrations are lower, SOD and iNOS levels are higher and

eNOS levels are lower than group IV. In group III, with the supplement of vitamin E, ER α and ER β receptor concentrations were increased, SOD and iNOS levels were decreased and there was an increase of the level of eNOS which was not significant.

CONCLUSION: On both experimental PCOS model and CC cure which cause OS affect the receptors that play part in implantation and endometrial blood flow negatively and this process can be turn back with antioxidant vitamin E. Especially the low pregnancy rates on PCOS patients whose ovulation induced with CC may be restored with antioxidant treatment.

KEY WORDS: PCOS, oxidative stress, implantation, antioxidant, vitamin E, eNOS, iNOS

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Polikistik over sendromu (PKOS) toplumda %6-10 sıklığında görünen üreme endokrinolojisinin önde gelen bozukluğudur. Genel olarak adet düzensizliği, tüylenme ve çocuk sahibi olamama yakınmaları ile giden sendromda aslında endokrinolojik ve metabolik bozukluklar yaygındır. Etiyolojisini bilmediğimiz ancak fizyopatolojisi hakkında bilgi sahibi olduğumuz bu rahatsızlıkta oksidatif stresin (OS) önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (1). Son yıllarda obez ve insülin direnci (İD) olmayan hastalarda da OS varlığı gösterilmiştir (2,3). Çocuk sahibi olamama nedeni ile polikliniğe başvuran ve kadın kaynaklı infertilitenin yaklaşık %30-40'ını oluşturan ovulatuvar bozuklukların birinci basamak tedavisinde klomifen sitrat (KS) ile ovulasyon indüksyonu (OI) yapılır (4). Ancak KS ile yaklaşık %80 oranında ovulasyon oranı elde edilirken gebelik oranı %40'a yaklaşır (5). Bu düşük gebelik oranı KS'nin anti-östrojenik özelliği ile açıklanır. Bu anti-östrojenik etkinin yanında KS'nin OS'ye yol açtığı da gösterilmiştir (6). Hem sendromun doğasında bulunan OS hem de KS'nin OS'ye yol açması ve/veya anti-oksidan aktivitenin azalması başarısız implantasyona neden olmaktadır (7). Çalışmamızın amacı hem PKOS nedenli hem de KS ile artan OS varlığını ortaya koymak ve sonrasında anti-oksidan E vitamini desteği ile bu olumsuz metabolik durumun değişip değişmeyeceğini görmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.POLİKİSTİK OVER SENDROMU

Tipik olarak genç üreme döneminde tanı alan PKOS; hirsutizm, oligomenore, polikistik görünümlü over(ler), infertilite, obezite ve İD ile karakterize heterojen bir kliniğe sahiptir (3,10). Kadınlarda en sık gördüğümüz bu endokrin bozukluk diyabet, koroner kalp hastalığı ve kanser gibi uzun dönem ciddi sağlık sorunları ile de ilişkisi olabilen karmaşık bir rahatsızlıktır (8,9). Sendromun prevalansı tanı için kullanılan ölçütlere göre değişmektedir.

2.1.1.Tarihçe

19. yüzyılda Chereau ve Rokitanski (11) tarafından yapılan kistik sklerotik over morfolojisi tanımları sonrasında PKOS olarak isimlendirilecek olan bu rahatsızlık ilk kez 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael Leventhal tarafından “Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries” başlıklı makalede overlerde bu morfolojik değişikliklere sahip 7 hastadan oluşan, ortak özellikleri amenore ve infertilite olan grup ile tanımlanmıştır. Bu grup içindeki 4 hastanın obez, 4 hastanın hirsut, birinin akne sorunu olduğu belirtilmiştir. Stein ve Leventhal bu 7 hastanın her iki overinden 1/2-3/4 oranında kama rezeksiyon ile doku çıkartmış ve hastaların düzenli adet görmeye başladığını görmüşlerdir. Bu hastalardan ikisi gebe kalmıştır (12). Yapılan patolojik incelemede, overlerin normalden büyük ve tunika tabakasının kalın olduğu görülmüş, bunun folliküllerin yüzeye ulaşmasını engellediği düşünülmüştür. 1950’li yıllarda sendromun obezite ve hipertansiyon ile metabolik ilişkileri dikkat çekmeye başlamıştır. Sendrom 1935’den 1980’li yıllara kadar, ‘overlerin kistik distrofisi, kistik sklerotik overler, hipertekozis ovarii’ gibi birçok farklı isimle anılmıştır. 1958 yılında ise McArthur, Ingersoll ve Worcester (13) PKOS’lu kadınlarda idrar luteinizan hormon (LH) seviyelerinin arttığını göstermişlerdir. 1976 yılında Kahn ve ark. (14) ve 1980 yılında Burghen ve ark. (15) bu hastalarda İD’yi gösterdiler. Yine 1980 yılında

PKOS'lu kadınlarda LH/FSH (folikül stimulan hormon) oranlarının LH lehine yükseldiği gösterildi. (16). 1970'lerde ultrasonografinin (USG) çözünürlük sorunu giderilerek klinikte daha geniş yer bulmasıyla birlikte, Swanson ve ark. tarafından ilk sonografik polikistik over morfolojisi tanımı yapıldı (17). Adams ve ark. ise 1986 yılında sonografik olarak polikistik overlerin gösterilmesinin tanıya katkıda bulunabileceğini belirtmiştir (18). Sonografik özelliklerin tanı ölçütü olarak kabul edilmesi ise 2003 yılında Rotterdam'da düzenlenen ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embryology)/ASRM (American Society for Reproductive Medicine) toplantısı sonrasında olmuştur (8,11). 2006 yılında düzenlenen AES toplantısında klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizmin mutlak tanı ölçütü olduğu belirtilmiştir (9,10).

2.1.2. Tanı ölçütleri

Polikistik over sendromu morfolojik olarak polikistik overler, oligo-amenore, hiperandrojenizm, obezite gibi bulguların birlikte görülebildiği, hipotalamo-hipofizer disfonksiyon, steroidogenez bozukluğu, İD ve hiperinsülinemi, granüloza hücre (GH) anormallikleri, enzimatik defektler gibi birçok bozukluğun ve genetik faktörlerin sinerjistik etkisi sonucu ortaya çıktığı düşünülen multifaktöriyel bir rahatsızlıktır. Günümüze kadar PKOS ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına karşın etyolojisi hala belirsizdir (19)

Tanıda değişik ölçütlerin kullanılması, gerek sendromun görülme sıklığı gerekse hastaların fenotipik özellikleri ve taşıdıkları uzun dönem kardiyometabolik riskin tanımlanması yönünden önemli farklılıklara neden olur. Sendrom klinik olarak farklı fenotiplerinin olması ve başka endokrin hastalıklarla benzerliği nedeniyle birçok uluslararası toplantıda tartışılmış ve tanı için ölçütler belirlenmiştir. Bu toplantı sonuçlarını aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz:

NIH: En kabul göreni 1990 yılında National Institute of Child Health and Human Disease [NICHD] konsensusunda düzenlenen U.S. National Institutes of Health [NIH] toplantısıdır.

1990 NIH tanı ölçütleri (önem sırasına göre)

1. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
2. Oligo-anovülasyon ve bununla ilişkili diğer etyolojik nedenlerin dışlanması (20).

Tanı için iki ölçüt temel alındığında sendromun prevalansı %6-10 arasındadır.(19)

Rotterdam Toplantısı: Tanım ve klinik görünümdeki çeşitliliği netliğe kavuşturmak amacı ile 2003 yılında Rotterdam'da European Society for Human Reproduction and Embryology [ESHRE] ve American Society for Reproductive Medicine [ASRM] ESHRE/ASRM ortak toplantısında ölçütler yeniden gözden geçirilmiş, klinik ve biyokimyasal değerlendirmeye ek olarak, özellikle over hacmi ve follikül sayısını göz önünde bulunduran ultrasonografik değerlendirme de tanı ölçütleri arasında belirtilmiştir.

2003 Rotterdam yeniden gözden geçirilmiş tanı ölçütleri*

1. Oligo-anovülasyon
2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
3. Polikistik overler ve diğer etyolojik nedenlerin dışlanması (20)

Tanı için üç ölçütten ikisinin bulunması gerekmektedir.

Polikistik overlerin ultrasonografik tanımı her overde 2-9 mm çaplı ≥ 12 follikül olması , ≥ 10 ml over hacmi olarak yapılmıştır. Artmış stromal hacim veya ekojenite gibi öznel bulgulara tanımda yer verilmemiştir. Bu bulguların tek bir overde görülmesi tanı için yeterlidir. Rotterdam ölçütleri temel alındığında sendromun prevalansı %15 civarındadır (19)

AES Toplantısı: En yeni geniş katılımlı konsensus 2006 yılında Androgen Excess Society PKOS Phenotype Task Force raporu ile açıklanmıştır. Androgen Excess and PKOS Society (AEPS) tarafından düzenlenen uzlaşma toplantısında klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizmin sendromun en önemli ve uzun dönem metabolik riskler ile morbidite üzerine en etkili olan mutlak tanı ölçütü olduğu belirtilmiştir. Sendromun özellikleri ovulatuar ve menstruel disfonksiyon, hiperandrojenemi, hiperandrojenizmin klinik özellikleri ve polikistik over(ler) başlıkları altında özetlenmiştir. Gonadotropin anormallikleri, İD, obezite gibi özellikler tanı ölçütleri arasında yer almamıştır ve raporda da bunun tersini savunan kanıta rastlanmadığı belirtilmiştir (9).

2006 Androgen Excess Society (AES) tanı ölçütleri

1. Hiperandrojenizm: Hirsutizm ve/ veya hiperandrojenizm
2. Over disfonksiyonu: Oligo- anovülasyon ve/ veya polikistik overler

3. Diğer androgen aşırılığı veya benzeri hastalıkların ekarte edilmesi*

21 hidroksilaz tipi non-klasik sürrenal hiperplazisi, androgen salgılayan tümörler, androjenik/ anabolik ilaçların kullanılması veya kötüye kullanımı, Cushing sendromu, ciddi İD sendromları, tiroid disfonksiyonu ve hiperprolaktinemi nedenleri dışlanmalıdır.

Hastalık yerine sendrom ifadesinin kullanılması, semptomlar ve bulgular topluluğunun varlığı ve tek bir tanı testi olmaması nedeniyle genel kabul görmüştür. Üreme çağındaki bir kadına PKOS tanısı koymak disfonksiyonel uterin kanama, infertilite, obezite, tip 2 diyabet, dislipidemi, hipertansiyon, endometriyum hiperplazisi, endometriyum kanseri ve olasılıkla kardiyovasküler hastalık(KVH) riskinin arttığını söylemek anlamına gelmektedir (9).

Menarş sonrası bir-iki yıl anovulasyon olabileceği için fizyolojik anovulasyon ile polikistik over sendromuna bağlı anovulasyon ayırt edilmelidir. Puberte döneminde genç kızların yaklaşık %25'inde overlerin polikistik görünümlü olabileceği unutulmamalıdır. Kandaki androgen düzeylerine bakılarak androgen fazlalığı tanısı koymak güçtür çünkü puberte dönemi için ayrıca tanımlanmış normal değerler yoktur.

2.1.3. Fizyopatoloji

Polikistik over sendromu, fizyopatolojisi hakkında bilgi sahibi olmamıza karşın etyolojisi henüz aydınlığa kavuşturulamamış üreme sistemi yanında endokrinolojik ve metabolik sonuçları olan bir sendrom şeklinde karşımıza çıkar. Sendromda aileler içinde iyi belgelenmiş bir yığılma olduğundan hem multifaktöryel hem de poligenik olan bir genetik temelden kuşkulaniılmaktadır (21) Hiperandrojenizm, hiperinsülinemi ve İD ise etyopatogenezeninden sorumlu tutulan başlıca mekanizmalardır (1).

Hipotalamus-Hipofiz-Over Aksı ve Anovulasyon

Menstrual döngü için hipotalamik arkuat çekirdekten pulsatil gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımına bağlı olarak ön hipofizden pulsatil gonadotropin (LH ve FSH) salınımı gerekir. Polikistik over sendromlu kadınlarda görülen anovulasyon, uygun olmayan gonadotropin salgılanması ile karakterizedir. Gonadotropin salgılatıcı hormon pulsatilitesindeki değişiklikler, FSH'ya göre LH'nın

baskın üretimine neden olur (22). Lüteinizan hormon, overyan androjen üretimini uyarırken, göreceli FSH azlığı GH aromataz enziminin uygun uyarılmasını engeller. Böylece androjenin etkin östrojen olan östradiol (E2) dönüşümü azalır. Yüksek serum androjenleri (özellikle androstenedion (A)), periferde östrojenlere (öncelikle östron'a (E1)) dönüşür. Bu dönüşüm öncelikle yağ dokusunun stromal hücrelerinde görüldüğü için östrojen üretimi obez PKOS olgularında daha fazla olacaktır. Artan östrojen hipotalamus ve hipofiz bezinin kronik negatif geri bildirimi ile sonuçlanacak ve gonadotropin salınımının pulsatilitesinde değişikliğe yol açacaktır. Göreceli LH yüksekliği teka hücrelerinde androjen yapımını özellikle de A yapımını arttırır. Sonuçta daha fazla A perifer dokularda testosterona (T) dönüşür (23,24).

Over Patolojisi

Polikistik over morfolojisinin hiperandrojenizm, hiperinsülinemi, merkezi uyarı jeneratörü ile ilgili aksı olumsuz etkileyen faktörlerin başlattığı bir kısır döngünün sonucunda geliştiği düşünülmektedir. Hughesdon tarafından 1982 yılında yapılan morfolojik tanımlamada (25):

- Yüzey alanı iki kat, over hacmi 2-8 kat artmış,
- Primordial follikül sayısı aynı olup, büyümekte olan veya atreziye giden follikül sayısı artmış,
- Tunika kalınlığı %50 artmış,
- Kortikal ve subkortikal stromal hipertrofi, çok sayıda duraklamış veya atreziye giden folliküllere ait teka hücre hiperplazisine bağlanmış, hilus hücre hipertrofisi dikkat çekmiştir.

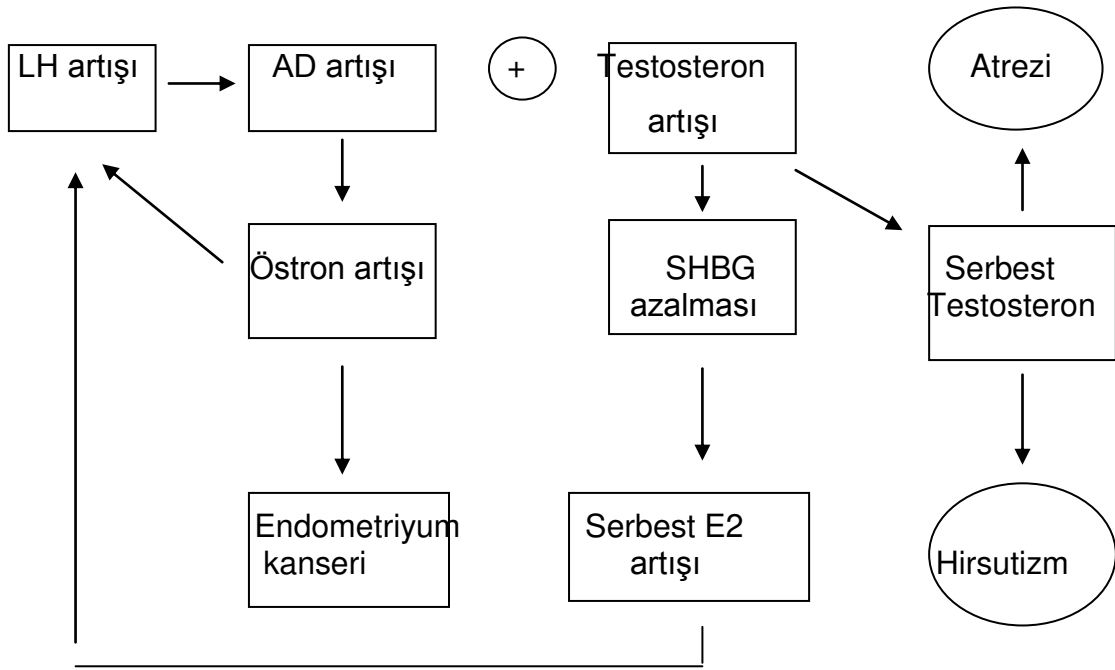
Bu olgularda serbest E2 ve A'nın periferik dönüşümünden oluşan E1'in negatif geri bildirim etkisi ile FSH düzeyi düşer ancak FSH'in tam baskılanamaması nedeniyle yeni folikül gelişimi devam eder. Gelişmeye başlayan bu foliküller tam olarak olgunlaşamaz ve ovulasyon aşamasına ulaşamazlar. Foliküller 2-8 mm çapında küçük foliküler kistler şeklinde kalıp birkaç ay devamlılık gösterirler. Bir kısım folliküller atreziye giderken, başka bir follikül grubu aynı gelişim yoluna girer. Over stromal dokusunu arttıran folliküler atrezi ile birlikte LH bağımlı A ve T sentezi artar. Over içindeki bu androjenik mikroçevre GH'lerinin aromatisasyon kapasitesini yetersiz hale getirir. Artan ön madde daha güçlü olan

5 α androjen türevlerine dönüştürülür. Bu türevler ise aromataz aktivitesini ve LH reseptör duyarlılığını azaltır, böylece follikül gelişimi için gereken östrojenik baskınlık ve LH yükselmesi sağlanamaz, sonuç olarak follikül duraklaması ve geç dönemde follikül atrezisi gerçekleşir. Bu mikroçevredeki androjen seviyesi artışı normal follikül gelişimini önlerken, prematür folliküler atreziyi uyarır (26-27).

Androjen Metabolizması - Hiperandrojenizm

Sağlıklı kadınlarda A ve T adrenal bez ve overlerden eşit miktarlarda salınmaktadır. Polikistik over sendromunda ise androjenlerin ana kaynağı özellikle A ve T salgılayan overlerdir. Normal döngüde gonadotropinler ve seks steroidlerinde görülen dalgalanma şekli, kronik anovülasyonu olan hastalarda sabit–durağan bir şekle döner. Bu hastalarda hem östrojen hem de androjenlerin sentez miktarının artması, yüksek bazal LH uyarısına bağlıdır. Lüteinizan hormon, 17-hidroksilaz ve 17,20 Liyaz aktivitelerini potansiyalize eder, seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) kapasitesini azaltır ve böylelikle serbest androjen miktarını hem direkt hem indirekt yoldan artırır (28). Dolaşımdaki A ise yağ ve deri gibi periferik dokularda T dönüşür. Hem insülin hem de LH teka hücrelerinde androjen üretimini uyarır (29). İnsülin direnci ve/veya kompensatuar hiperinsülinemi, dolaşımda bulunan, temel olarak adrenal bezler ve overlerden salınan androjen ve androjen ürünlerinin kullanılabilirliğini SHBG düzeyini azaltarak artırır (30) (Şekil 1).

Bu hastalarda %75 oranında hiperandrojenemi olduğu ve en duyarlı olan değişkenin % 60 yükselme ile serbest T olduğu belirtilmiştir (31). Testosteron kadınlarda klinik açıdan en önemli hormundur ve hirsutizm, akne ve alopesiden sorumlu tutulur.



Şekil 1 Androjen metabolizması ve periferik etkileri

İnsülin Direnci – Metabolik sendrom

İnsülin direnci, karbonhidrat metabolizmasında verilen insülin miktarına karşılık azalmış glukoz yanıtı olarak tanımlanır. İnsülin direnci ve artmış serum LH seviyesi PKOS'nun sık görülen özellikleridir. Polikistik over sendromu olan kadınlarda, olmayanlara göre daha yüksek derecede İD ve buna bağlı gelişen hiperinsülinemi görülür. İnsülin direnci ile beden kitle indeksinin (BKI) arasında iyi bir bağlantı bulunmuştur. Obez olan PKOS kadınlarda İD, hiperandrojenemi, hipertrigliseridemi daha fazla görülmüştür (32). Patofizyolojinin altında yatan neden bilinmemekle birlikte, İD sendromun görülmesinde merkezi bir rol oynar ve kısmen artmış adipozite ile açıklanabilir (33). Ancak PKOS'lu zayıf kadınlarda da normal kontrollerle karşılaştırıldığında İD'nin giderek arttığı gösterilmiştir (34). Bu olumsuz süreç, etkilenen kadınlarda bozulmuş glukoz toleransı (IGT) ve tip 2 diabetes (Tip 2 DM) riskini arttırabilir. Ayrıca IGT'nın tip 2 DM ve KVH gelişimi için bir risk faktörü olduğu da bilinmektedir.(35)

Metabolik sendrom; obezite, hipertansiyon, hiperlipidemi, İD, yaş ve cinsiyete göre düşük HDL seviyeleri ile karakterize, KVS hastalıklarında risk artışı görülen sistemik bir durumdur. İnsülin direncinin derecesi ile metabolik sendrom sıklığı arasında bir bağlantı olduğu ve İD'nin metabolik sendrom gelişmesine neden

olabileceği gösterilmiştir (36). Metabolik sendrom normal popülasyona göre PKOS olan olgularda yaklaşık 2 katı risk artışı göstererek % 43-47 sıklığında görülür (37).

Aşağıdaki tanı ölçütlerinden üç veya daha fazlası tespit edildiğinde hastalarda metabolik sendrom varlığı söz konusudur:

1. Santral obezite: Bel ölçüsü erkeklerde >102 cm, kadınlarda >88 cm.
2. Yüksek Trigliserid: >150 mg/dl veya lipid anormalliği sebebiyle ilaç tedavisi alanlar
3. Düşük HDL-Kolesterol: Erkeklerde <40 mg/dl kadınlarda <50 mg/dl veya lipid anormalliği sebebiyle ilaç tedavisi alanlar
4. Hipertansiyon: Sistolik kan basıncı > 130 mmHg, diastolik kan basıncı > 85 mmHg veya antihipertansif kullananlar
5. Yüksek açlık plazma glukozu: > 100 mg/dl

Obezite

Polikistik over sendromu hastalarında obezite görülme oranı değişik serilerde farklı bildirilmekle beraber %30-50 arasında değişmektedir (38). Beden kitle indeksi (BKİ) ≥ 30 kg/ m² olması veya ideal vücut ağırlığının %20'sinin üzerinde olma durumunu belirtir.

Hiperandojenizm, hirsutizm, infertilite ve gebelik komplikasyonları gibi bazı bulgular obezite ile birlikte artar. Obezite ve İD Tip 2 DM ve KVH riskini artırır, ayrıca İD'yi bozup, PKOS'nun üreme ve metabolik bulgularını ağırlaştırır. Obezitenin ovulasyon, gebelik kaybı ve geç gebelik komplikasyonları (preeklampsi, getasyonel diabetes mellitus(GDM)) ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Obez PKOS hastaları KS, gonadotropinler ve laparoskopik ovaryan delinme gibi tedavilere yetersiz veya geç yanıt verirler (39). Beden ağırlığının %5'inin kaybı ile obez PKOS hastalarda spontan ovulasyon ve gebelik oranları iyileşmiştir (40). Ancak halen obezitenin PKOS'u kolaylaştırıcı bir etken mi yoksa hastalığın sonucu mu olduğu tartışmalıdır. Adipoz dokunun endokrin-metabolik etkileri bakımından beden yağ dağılımı önemlidir. Bel kalça oranı KVH için bağımsız bir risk faktörüdür (40). Tüm bu veriler ışığında obezitenin PKOS üzerine sinerjistik etki yaptığı, tedavide kilo kontrolünün önemli yeri olabileceği söylenebilir. Obez PKOS'lu kadınlarda ilk tedavi kilo verme olmalıdır. Ancak tedavi şekli ve sonuçları tartışmalıdır (39).

Anti Mülleryan Hormon (AMH)

Anti-mülleryan hormon inhibin ve aktivin gibi transforming büyüme faktörü ailesinden, (TGF- β) dimerik glikoprotein yapıda bir hormondur (41). Serin-threonin kinaz tip2 reseptörleri üzerinden fonksiyonunu gerçekleştirir. Erkeklerde testiste sertoli hücrelerinden salgılanır ve parametonefrik kanalların oluşmasını önler, kadınlarda overde preantral ve erken antral foliküller tarafından salınır ve overin folliküler havuzunun boyutunu gösterir. Anti-mülleryan hormon düzeyi folliküler havuzun azalması ile giderek düşer, azalmış over rezervinin tanısı için herhangi bir eşik değer üzerinde fikir birliği olmamasına karşın, overyan rezerv belirteci olarak faydalıdır. Ortaya çıkan kanıtlar PKOS kadınlar ile yüksek AMH düzeyi arasındaki bağlantıyı göstermiştir. Anti-mülleryan hormon konsantrasyonu PKOS'da klinik, endokrinolojik ve USG belirteçleri ile ilişkilidir ve hastalığın yaygınlığını gösterebilir (42).

Genetik Faktörler

Polikistik over sendromu, etyolojisinde birçok faktörün etkileşimi ile gelişen kompleks bir rahatsızlıktır. Sendromun oluşmasında rol olan genler henüz tanımlanmamış olmasına karşın, yapılan çalışmaların sonuçlarına göre gelişiminde tek bir genden çok multigenik özellik rol almaktadır (43).

2.1.4. Klinik Bulgular

Hastalarda görülen klinik belirtiler üreme ve metabolik etkiler altında toplanır (39). Polikistik over sendromundaki bulgular Tablo 1 de gösterilmektedir.

Tablo 1. PKOS belirti ve bulguları (44)

PKOS'TA BELİRTİ VE BULGULAR	
Oligomenore	%50-90
Hirsutizm	%60-90
İnfertilite	%55-75
Polikistik over	%50-75
Obezite	%40-50
Amenore	%25-50
Akne	%25-30

Kronik Anovulasyon, Menstruel Disfonksiyon

Polikistik over sendromu hiperandrojenizm, kronik anovulasyon ve oligomenore ile karakterizedir (45). Bu olgularda menarş yaşı gecikmezken, ilk adetler genellikle düzensizdir. Döngüler genellikle gecikmeli veya uzun süren adet görememe dönemleri sonunda beklenmedik bir zamanda aşırı miktarda kanama şeklindedir. Peripubertal dönemde başlayan, oligo veya amenore şeklinde görülen anovulasyon, endometriyumda progesteron ile karşılanmamış kronik östrojen etkisiyle mitotik uyarılma ve kalınlaşmış endometriyuma neden olarak düzensiz kanama ile karşımıza çıkabilir. Bazı hastalarda yüksek androjen düzeyleri nedenli azalmış endometriyal kalınlık ve amenore de görülebilir. Düzensiz kanamaları olan hastalar yaşları ilerledikçe antral folikül sayısında ve buna bağlı androjen üretiminde azalma ile düzenli döngüye sahip olabilirler (46).

Hirsutizm-Akne-Alopesi

Hirsutizm hiperandrojenizm için iyi bir gösterge olmakla birlikte PKOS olan kadınlarda %70 oranında görülür. Ancak PKOS olduğu düşünülen tüm kadınlarda hiperandrojenemi biyokimyasal olarak değerlendirilmelidir. Buna karşılık akne ve alopesi hiperandrojenemi ile sıklıkla ilişkili olmadığından hiperandrojenizmin kanıtı olarak kabul edilmemelidir (19).

İnfertilite

Polikistik over sendromu anovulasyona sekonder infertilitenin en sık nedendir (47). Folikül stümülan hormon yetersizliği, LH hipersekresyonu, hiperandrojenemi, İD'i, follikül sıvısındaki birçok mediatör dengesinin bozulması sonucu oosit gelişiminde ve implantasyonunda sorun oluşur (48).

Akantozis Nigrikans

İnsülin direncinin bir cilt işareti olduğu düşünülen akantozis nigrikans, ense, aksilla, meme altı katlantısı, bel ve kasık bölgeleri gibi fleksiyon alanlarında görülen koyu, kadifemsi, kalınlaşmış, gri-kahverengi kadifemsi plaklardır. Patolojisinde İD ve buna bağlı hiperinsülineminin, epidermel hiperkeratozis ve dermal fibroblast proliferasyonunu uyardığı düşünülür (49).

Obezite

Polikistik over sendromunda bel-kalça oranının arttığı android tip obezite görülür.

2.1.5.Uzun Dönem Sağlık Riskleri

Polikistik over sendromunun kısa ve uzun dönem sonuçları tablo 2’de gösterilmiştir.

İnsülin Direnci- Glukoz intoleransı- Tip2 Diabet

İnsülin direnci PKOS patofizyolojisinde ve uzun dönem olumsuz sonuçlarında önemli rol oynar (35).

Kardiyovasküler hastalık

Hiperandrojenizm, İD, glukoz intoleransı, Tip 2 diabet, obezite ve daha geç dönemde ortaya çıkabilen hiperlipidemi ve hipertansiyon nedeniyle PKOS hastaları artmış kardiyovasküler riske sahiptir (50).

Kanser

Endometriyumda kronik anovulasyon nedenli karşılanmamış östrojen etkisi nedeniyle endometrial hiperplazi ve adenokarsinom riski PKOS’u olmayanlara göre 4 kat artmıştır (51). Ancak hala tüm PKOS olan hastalarda endometrial bir patolojiyi dışlamak için endometrial biopsi yapılmasının gerekliliği açık değildir. Chittenden ve ark. meta-analizinde PKOS ve jinekolojik kanser ilişkisini araştırmışlar ve PKOS kadınlarda endometriyum kanseri (OR:2.7) ve over kanser (OR:2.52) oranının yüksek olduğunu, meme kanserinde ise bir risk artışı bulunmadığını belirtmişler, sonuç olarak PKOS da vajinal, vulvar, servikal ve over kanser gelişimi ile ilgili kanıtların yetersiz olduğunu göstermişlerdir (52).

Dislipidemi

Polikistik over sendromunda sık görülen bir metabolik anormallik olan dislipidemi HDL düzeyinde azalma, trigliserid (TG), total ve LDL kolesterol düzeyinde artma ve LDL kolesterol kalitesinde bozulma gibi farklı şekillerde görülebilir (53).

Hipertansiyon

Polikistik over sendromunda hipertansiyon (sistolik ve diastolik kan basıncının 140/90 mmHg'nın üzerinde olması) ileride gelişebilecek KVH için risk oluşturmaktadır. Bu hastalarda farmakoterapi için kan basıncı en az 140/90 mmHg olmalıdır. Çünkü kan basıncı yükseliğinin ılımlı formu (prehipertansiyon) KVH riskini artırdığından dolayı uzun dönemde KVH'dan korunmak için kan basıncı 120/80mmHg'a düşürülmelidir (54).

Tablo 2: Polikistik over sendromu sonuçları

<u>Kısa Dönem Sonuçları</u>	<u>Uzun Dönem Sonuçları</u>
1- Adet düzensizliği	1- Diabetes mellitus
2- Hirsutizm, akne, androjenik alopesi	2- Kardiyovasküler hastalık
3- Obezite	3- Endometriyum kanseri
4- Hiperlipidemi	
5- Glukoz intoleransı	
6- Metabolik bozukluklar	

2.2. OKSİDATİF STRES, SERBEST RADİKALLER VE ANTİ-OKSİDANLAR

Serbest oksijen radikalleri diğer adıyla ROS, metabolik ve fizyolojik süreçlerde üretilirler ve oksidan molekül adını alırlar. Anti-oksidanlar, moleküllerin oksijen radikallerinden korunmasında ve hasarın sınırlandırılmasında temizleyici rol oynarlar Sağlıklı bir bedende ROS ve anti-oksidanlar denge halindedir (55). Oksidatif stres, oksidan moleküller olan reaktif oksijen ve nitrojen radikalleri ile anti-oksidan koruma arasındaki dengesizlikle karakterize bir durumdur ve bu dengesizlik endometriozis, PKOS ve açıklanamayan infertilite gibi üreme bozukluklarına neden olur. Ayrıca spontan abortus, yineleyen gebelik kayıpları ve preeklampsi gibi gebelik komplikasyonları OS'e yanıt olarak gelişir (30). Yani OS bir kadının bütün üreme dönemini hatta daha sonra postmenopozal dönemi de etkiler (55). Kadın üreme sisteminde ROS hem fizyolojik süreçlerde anahtar sinyal molekülleri olarak görev alır, hem de patolojik süreçlerde rol oynar (55). Son zamanlarda OS artışının kadın üreme sistemindeki etkisi üzerine gittikçe artan bilgiler vardır. Reaktif oksijen türleri oosit matürasyonu, fertilizasyon, embriyo gelişimi, gebelik gibi birçok fizyolojik süreci etkiler. Yaşa bağlı fertilite azalması, gebelik, normal doğum, preterm doğumun başlaması, preeklampsi, hidatiform mol,

serbest radikallerin indüklediği doğum defektleri, abortus, endometriosis, tubal ve peritoneal faktörlü infertilite ve açıklanamayan infertilite gibi birçok durumda OS rol oynar (55). Anti-oksidanların over fonksiyonlarında (apoptozis, ovulasyon ve steroidogenez gibi) düzenleyici olduğu bilinir (55,56,57). Ancak yüksek seviyede anti-oksidanların üreme fonksiyonu ve sağlık üzerine (amenore, fertilitede azalma, abortus olasılığında artma, embryotoksisite, over steroidogenezinde azalma ve teratojenite) zararlı etkileri bildirilmiştir.(58)

Polikistik over sendromlu hastalarda OS artmıştır (59), ancak yapılan çalışmalarda anti-oksidan düzeyi sonuçları çelişkilidir. Bazı araştırmacılar (60,61) antioksidan düzeyinin azaldığını, bazıları ise kompensatuar bir şekilde arttığını göstermiştir (59). Sabuncu ve ark. yaptıkları çalışmada, OS ve süperoksid dismutaz (SOD) (anti-oksidan enzim) düzeylerinin PKOS'lu kadınlarda arttığını yani hem total oksidan seviyesi (TOS) hem de total anti-oksidan seviyesinin (TAS) arttığını bulmuşlardır. Artan bu oksidatif durumun santral obezite, yaş, kan basıncı, serum glukozu, insülin ve trigliserid seviyesi ile ilişkili olduğunu, buna karşılık anti-oksidan durumun yetersizliğini gözlemlemiş ve bu durumun PKOS'da KVH risk artışına katkıda bulunabileceğini düşünmüşlerdir (59). Total anti-oksidan seviyesi muhtemelen TOS yükselmesine karşılık kompensatuar bir mekanizma olarak gerçekleşmiştir. Obezite ve diyabet PKOS'lu hastalarda OS üzerine pozitif etki yapar (62,63). Obezite ve hiperinsülinemisi olmayan PKOS'lu hastalarda da TOS ve TAS yükseldiği gösterilmiştir (1,3). Obeziteden bağımsız olarak PKOS'da artmış hiperglisemiye yanıt olarak mononükleer hücrelerden ROS üretilir ve bu pro-inflamatuar duruma OS katkı sağlayabilir, İD ve hiperandrojenizm de bu durumu indükler (64). Normal over fizyolojisi için anti-oksidanlar hayati öneme sahiptir ve bozulmuş anti-oksidan durum steroidogenez ve apoptozisin fonksiyonel bozukluğuna katkıda bulunarak fertilitenin azalmasına neden olur (2). Yapılan bir çalışmada ROS'un GH'lerinde apoptotik kaskadı başlattığı ve pre-ovulatuar foliküller üzerinde oluşacak anti-oksidan etkinin, apoptozisi önleyici rol oynadığı rapor edilmiştir. Artmış OS yüküne yanıt olarak salgılanan anti-oksidan faktörler, apoptozisi önleyerek folliküllerin doğal seçimini etkileyip küçük çapta follikül birikimine yol açarak overlerin polikistik görünümüne katkıda bulunabilirler. Fare oosit GH'leri ve sağlam preantral foliküllerin in vitro apoptozis sürecinde, anti-oksidan özellikteki C vitamininin serum düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (65,66).

Başka bir araştırmada ise, bir anti-oksidan olan N-asetil-L-sisteininde, in vitro olarak over dokusunda apoptozisi baskıladığı gösterilmiştir.(67)

Biyolojik sistemde bulunan başlıca endojen ROS/RNS (reaktif nitrojen türleri) süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve preoksinitrildir. Bu moleküller protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, ve DNA oksidasyonu yaparak oksidatif hasara neden olurlar. Bu serbest radikallerinin etkilerini antagonize eden belli başlı dört endojen antioksidan mekanizma bulunmaktadır:

1. Enzim yapısında olanlar; SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
2. Büyük molekül yapısında olanlar; albumin, seruloplazmin ve ferritin
3. Küçük molekül yapısında olanlar; askorbik asit, alfa-tokoferol, beta karoten, plazma ubiquinol, ürik asit, selenyum ve glutatyon (GSH)
4. Hormon yapısında olanlar; estrogen, melatonin, angiotensin ve diğer bazı hormonlar

2.2.1.Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller bir ya da birden fazla çiftleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü kararsız, düşük molekül ağırlıklı, reaktif etkinliği çok fazla olan atom ya da moleküllerdir. Nükleik asit, lipid, protein, karbonhidrat veya bir zincirleme reaksiyon kaskadı sonucu yanındaki herhangi bir molekülden elektron alarak kararlı hale geçerler. Fizyolojik reaksiyon sonucu organizmada oksijen, azot, karbon ve kükürt kaynaklı çeşitli serbest radikaller oluşabilmektedir. Organizmada en sık karşılaşılan serbest radikallerin temel kaynağı oksijen molekülünün indirgenmesi sonucunda süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Serbest oksijen radikalleri endojen olarak bedende metabolik yan ürünler olarak ortaya çıkarlar. Fizyolojik süreçte ya da patolojik tepkimeler sonucunda sentezlenen serbest oksijen radikalleri sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezlerse zararlı etkilerini oluştururlar (68).

Ortaya çıkan bu ROS'lar sonuçta özellikle hücrelerin lipid, protein ve deoksiribonükleik asitlerine (DNA) yönelik zararlı oksidatif reaksiyonlara sebep olabilir. Hücrelerde serbest radikallerin yol açtığı hasarın derecesi hücre içindeki koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır. Reaktif oksijen türleri terimi, serbest oksijen radikallerini ve bir kısım radikal olmayan oksijen kaynaklı ürünleri kapsar (Tablo 3).

Tablo 3. Bazı Reaktif Oksijen Türleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($OH^{\cdot}$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Lipit Peroksil ($LOO^{\cdot}$)	Lipid Hidroperoksit ($LOOH$)
	Singlet oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$)

2.2.2. Reaktif Azot-Oksijen Türleri

Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) L-arjinin amino asidinin L-sitruline dönüşümü sırasında nitrik oksit sentaz enzim gurubu tarafından sentezlenir. Canlıda normal nitrik oksit konsantrasyonunu sağlamak hayati önem taşır (55). Nitrik oksit eşleşmemiş bir elektron içerir, bu nedenle yüksek derecede reaktif bir serbest radikaldir. Proteinlere, nükleotidlere, lipitlere ve karbonhidratlara zarar verebilir. Nitrik oksit diğer inflamatuvar medyatörler ile birlikte hücre ve doku hasarı, düşük dereceli steril inflamasyon ve adezyon yapabilmektedir (55). Nitrik oksitin değişik fizyolojik sistemlerde önemli fonksiyonel rol oynadığı ve farklı organlarda değişik hücreler (düz kas hücresi, mesengial hücreler, nöronlar, plateletler, hepatositler, makrofajlar, fibroblastlar ve epitelyal hücreler) tarafından üretildiği bilinir. Ayrıca düz kas hücrelerinin tonusunu, trombosit kümeleşmesi ve adezyonunu, hücre büyümesi, apoptosiz, sinir iletimi ve immün sistemin indüklediği enfeksiyon ile birlikte oluşan hasarı düzenler. Nitrik oksit üreme sisteminin biyolojik ve fizyolojik süreçlerinin düzenlenmesiyle birlikte üremede önemli rol oynar. Ovulasyon ve follikülogenez gibi over fonksiyonlarını düzenler ve folliküler gelişimde artmış NO sentezi görülür. Ayrıca, tubal fonksiyonlarda, endometriyumda gebelik süresince ve doğumda NO tespit edilmiştir (69).

Nitrik Oksit Sentaz(NOS) Enziminin İzofomları

Nitrik oksit (NO) sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin 2 çeşit izoformu vardır.

1-Yapısal NOS (cNOS): Endotel, sinir dokusu ve trombositlerde bulunan Ca-kalmodulin bağımlı enzim. İki tipi vardır:

a)Endotelyal NOS (eNOS): Endotel kaynaklı gevşeme faktörünün (EDRF) sentezinden sorumludur.

b)Nöronal NOS (nNOS): MSS ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO sentezinden sorumludur.

2-İndüklenebilir NOS (iNOS): Hepatosit, makrofaj ve nötrofillerde bulunan Ca'dan bağımsız enzim.

iNOS enziminin sentezini lipopolisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile inflamatuvar sitokinler indüklerler (INF- γ , IL-1,IL-2,TNF- α gibi). iNOS yalnızca fagositik lökositlere özgü olmayıp uygun indüksiyonla tüm çekirdekli hücreler tarafından sentezlenebilir (70). Makrofajlar tarafından NO üretimi mikroorganizmaların invazyonuna bir anti-mikrobial yanıt olarak üretilir (69). İmmün efektör olarak iNOS tarafından uyarılan NO, anormal hücreler ve patojenleri öldürür fakat özellikle iNOS persiste eksprese edildiği zaman normal doku ve hücrelere hasar vererek zararlı rol oynayabilir (71).

2.2.3.Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Bileşenlerine Etkisi

Reaktif oksijen türleri hücre bileşenleri olan lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile oksidatif etkileşim sonucu hücrede zarara neden olabilir (72). Serbest radikallerin en önemli etkisi lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu başladıktan sonra zincir tepkimesi şeklinde devam eder ve sonuçta zarların normal yapısı bozulur ve hücre hasarı giderek artar (73). Proteinlerin de oksidatif hasar sonucu temel yapısı bozulur ve proteolize yatkınlığı artar. (72,73). Reaktif oksijen türleri DNA'da baz değişiklikleri ile pürin, pirimidin bazları ile deoksiriboz şekerinde parçalanma ve DNA zincir kopmaları şeklinde nükleik asitlerin de yapısına zarar verir. Bu tip oksidatif DNA hasarları mutageneze, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açar (74).

2.2.4.Anti-Oksidan Savunma Sistemi

Canlı organizmada normal metabolizma sırasında ya da patolojik yollarla ortaya çıkan serbest radikallere karşı koruyucu anti-oksidan savunma sistemi vardır. Oksidatif denge, serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızının denge içerisinde olduğu durumdur. Oksidatif denge sağlandığı

sürece organizma, serbest radikallerin etkilerinden korunmuş olur. Bu oksidan ve anti-oksidan sistem arasındaki dengenin serbest radikaller yönüne kayması OS olarak tanımlanır. Hücreler oksidatif hasara karşı enzimatik ve non-enzimatik anti-oksidan sistem ve moleküllerle korunurlar. Anti-oksidan savunma sistemi; enzimleri, yağda ve suda çözünen radikal tutucuları ve metalleri bağlayan proteinleri içerir (72) (Tablo 4).

Tablo 4. Anti-oksidanlar (72)

Enzimler	Yağda çözünen radikal tutucular	Suda çözünen radikal tutucular	Metal bağlayan proteinler
Süperoksit dismutaz	E vitamini	Glutasyon	Transferrin
Katalaz	B-Karoten	C vitamini	Ferritin
Glutasyon peroksidaz	Flavonoidler	Ürik asit	Seruloplazmin
Glutasyon transferaz	Bilirubin		Albümin
Glutasyon redüktaz			Haptoglobulin

E Vitamini (α -Tokoferol)

Yağda çözünen ve esansiyel vitaminlerden biri olan E vitamini en çok bitkisel yağlar, karaciğer ve yumurta sarısında bulunur. Yağlarla birlikte emilir ve kanda lipoprotein tanecikleri içinde taşınır. İnsan dokusunda anti-oksidan etkisini erken dönemde serbest radikalleri bağlayıp, hücre membranlarını serbest radikallerin zararından koruyarak gerçekleştirir. Biyolojik membranlarda bulunan ve zincir kırıcı özelliği olan en önemli anti-oksidandır. Yapılan hayvan çalışmalarında E vitamininin, anti-kanserojen etkileri ile kanser hücrelerini seçici biçimde yıkarak, kanser oluşma sıklığını ve gelişimini azalttıkları gösterilmiştir (75).

2.2.5.Oksidatif Stres-PKOS-Over ve Endometriyuma Etkileri

Polikistik over sendromunda görülen hiperandrojenizm ve İD'nin OS'e katkıda bulunduğu, OS'nin de bu metabolik anormallikleri tetiklediği bilinir. İn vitro çalışmalarda OS'in overde androjen üreten steroidojenik enzimleri uyardığı, anti-oksidanların bu enzimleri baskıladığı gösterilmiştir (1,30). Ayrıca PKOS'da artmış oksidan durumun İD ile bağlantılı olduğu, İD ve hipergliseminin her ikisinin de oksidatif düzeyi arttırdığı gösterilmiştir (1). Reaktif oksijen türleri iki ucu keskin kılıç gibi fizyolojik süreçlerde önemli sinyal molekülleri olarak hizmet ederken aynı

zamanda kadın üreme yollarında patolojik süreçlerde de rol oynar. Yaşa bağlı fertilité azalmasına neden olduğu gibi, fertilizasyonda oosit maturasyonu, embriyo gelişimi, gebelik, doğum ve erken doğumun başlamasında rol alırlar. Metabolik olarak aktif organ olan overlerde birçok over kanseri yüzey epitelinde görülür ve yineleyen ovulasyonun buna etken olduğu düşünülmektedir. Ovulasyon ile indüklenen oksidatif hasar ve over yüzey epitelinin DNA hasarı anti-oksidanlar ile önlenabilir (55). Folliküler gelişim ve ovulasyon süresince olağanüstü seviyede ROS üretilir ve bu ROS'un etkileri anti-oksidanlar ile nötralize olur. Bazı hayvan ve insan çalışmaları ile ROS'un oosit gelişimi, maturasyonu, folliküler atrezi, korpus luteum fonksiyonu ve luteolizisdeki rolleri aydınlatılmıştır. Oksidatif stres oosit ve embriyo kalitesini etkileyerek fertilizasyon oranlarını bozar (55,76). Serbest radikallerin belli bir seviyede üretimi memeli oositlerinde mayotik süreç için faydalıdır (77). Diğer taraftan folliküler sıvıdaki ROS'un aşırı üretimi veya anti-oksidan sistemindeki azalma OS'e neden olur (76). Yapılan bir çalışmada OS'in fare ve insanlarda oosit kalitesini, fertilizasyon ve gebelik oranını azalttığı gösterilmiştir (78).

Bir anti-oksidan enzim olan SOD, bakır-çinko SOD (Cu-Zn SOD) ve manganaz SOD (MnSoD) şeklinde, büyüyen folliküllerin teka ve GH'lerinde bulunmuştur. Hem insan hem de fare oosit ve tubasında SOD, GSH-Px ve gama glutamilsistein sentetaz gibi anti-oksidan enzimlerin transkripsiyonu gösterilmiştir (55,79). Reaktif oksijen türleri konsantrasyonu implantasyon ve fertilizasyonun her ikisinde de önemli rol oynar (76). Yapılan bir çalışmada endometriyumda SOD enziminin döngüsel değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Geç sekretuar fazda ROS düzeyi artarken SOD aktivitesi azalır. Bu değişiklik endometriyumun dökülmesi ve menstruasyonun oluşum mekanizması için önemli bir varsayımdır (80).

2.2.6. Polikistik Over Sendromu ve Klomifen Sitrat

İnfertilitenin en sık nedeni olan ovulatuar bozukluk en çok PKOS'da görülür. Dünya genelinde anovulatuar kadınlarda ovulasyon indüksiyonu için birinci basamak medikal ajan olan KS, bir non-steroidal trifeniletillen bileşigidir. Klomifen sitrat kullanımı ile yüksek ovulasyon oranına karşın, gebelik oranı çok daha düşüktür. Bu farklılığın KS'in özellikle endometriyum ve servikal mukus üzerindeki, periferik anti-östrojenik etkisi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Klomifen sitratın

over seviyesindeki anti-östrojenik etkileri tam anlaşılamamıştır. Somatik hücrelerde OS ve apoptozisi indükleyen KS'ın (102), sıçanlar ile yapılan bir çalışmada GH'de apoptozisi indüklediği ve E2 sentezini azalttığı rapor edilmiştir (103).

Klomifen Sitrat'ın Etki Mekanizması

Klomifen sitrat, östrojenden daha uzun bir süre östrojen reseptörlerine bağlı kalarak etki gösterir (doğal östrojenin reseptörlere bağlı kaldığı süre saatler sürerken KS haftalarca bağlı kalabilir.). Bu uzun süreli bağlanmadan dolayı östrojen reseptör yenilenme mekanizmasını bozarak bu reseptörlerin konsantrasyonunu azaltır (81). Böylece nukleusdaki östrojen reseptörleri seviyesinde endojen östrojenlerle yarışarak östrojen etkisini engeller. Bu engelleme hipotalamus – hipofiz sisteminde olunca östrojenin negatif geri bildirim etkisi ortadan kalkacağından hipofizden FSH ve LH salınımı artar. Ovulasyon indüksiyonundaki rolü hipotalamo-hipofizer seviyede östrojenin negatif geri bildirim etkisini önlemesine bağlanmıştır (82). Normal bir kadına KS verildiğinde gonadotropin salınım sıklığı artar ama yüksekliği değişmez, oysa PKOS olan bir hastaya verildiğinde hem gonadotropin salınım sıklığı hem de yüksekliğinin arttığı gösterilmiştir (83). Gonadotropinlerin ve özellikle FSH'nın artması ile follikül gelişimi uyarılmakta ve ovulasyonun sağlanmasında ilk tetik çekilmektedir.

Endikasyonlar

1-Anovulatuvar infertilite: Klomifen sitrat tedavisinden en çok yararlanan hastalar anovulatuvar infertilitesi olan kadınlardır. Anovulatuvar infertilitede KS tedavisi yalnızca dolaşımdaki östrojen düzeyi gonadotropinler üzerinde negatif geri bildirim oluşturacak seviyeye geldiğinde etkilidir. Klomifen sitrata yanıt oluşması için yeterli östrojen düzeyini belirlemek zordur. Bu nedenle progesteron uygulanmasından sonra oluşan çekilme kanaması, dolaşımdaki yeterli östrojenin klinik yansıması olarak kabul edilebilir.

2-Ovulatuvar infertilite: Ovulatuvar infertilitede ise KS multifoliküler gelişimi uyararak olası bir ovulasyon disfonksiyonunu düzelterip ovulasyonu sağlamaktadır (4,91).

3-Luteal Faz Defekti: Klomifen sitrat, luteal faz defekti için uygun bir tedavi seçeneğidir. Progesteron düzeyi tipik olarak KS tedavisi sonrası spontan döngüden daha yüksektir ki, bu da gelişen preovulatuvar follikülün göstergesidir.

4-Açıklanamayan infertilite: Dikkatli ve eksiksiz değerlendirme sonrası KS tedavisi

başarılı olabilir. Açıklanamayan infertilite gibi ovulatuar hastalarda ovulasyonun değerini arttırmak veya multifoliküler ovulasyon için kullanılır.

Sheehan sendromu ve Kallman sendromu gibi hipotalamo-hipofiz aksı defektif kadınlarda veya dolaşan östrojen seviyesi çok düşük olan (WHO grup I ve III) hastalarda kullanılması uygun değildir. Ayrıca over kisti olan hastalarda da kullanılmamalıdır.

Klomifen Sitrat Tedavi Rejimleri

Klomifen sitrat tedavisinde günlük oral doz 50- 150 mg'dır. Spontan veya uyarılmış kanamadan 2-5 gün sonra başlanır ve 5 gün süre ile en düşük dozda devam edilir. Ovulatuar döngü elde edilinceye kadar her döngü doz 50 mg artırılır (4). Kuramsal olarak günlük dozun 250 mg'a kadar arttırılabileceği kabul edilse de, uygulamada 150 mg/gün ile ovulasyon elde edilemezse farklı bir ilaç denir. Ovulasyon sağlandıktan sonra, aynı doz gebelik oluşana veya toplam tedavi süresi 6 döngü olana kadar tekrarlanır. Bir kez etkin doz belirlendiğinde, ovulasyonda kayıp yoksa dozu arttırmaya gerek yoktur (88,5). Tedaviye döngünün 2, 3, 4, veya 5. gününde başlanmasında sonuçlar benzerdir (85). Başlangıç doz önerisi 50 mg/gün olmasına karşın, yayınlanan 13 raporun meta-analizinde yalnızca %46'sının bu doza yanıt verdiği, %21'nin 100mg/gün'e yanıt verdiği ve %8'inin 150mg/gün ile ovüle olduğu ortaya konmuştur (86). Günlük 150mg üzerindeki dozlarda ne foliküler gelişmede, ne de ovulasyon oranında önemli artış görülmüştür (87). Bazı uygulayıcılar sıklıkla 100mg/gün başlangıç dozuyla döngünün 4 veya 5. günü tedaviye başlamakta, yalnızca aşırı hassas veya persiste kist formasyonu olan olgularda 50mg/gün dozuna başvurumaktadırlar. 100mg/gün başlangıç dozuyla tedaviye başlamanın, 50mg/gün ile tedaviye başlamaya avantajı ovulasyon elde edilip, KS'a direncin tespit edilmesine kadar bu tedavinin neden olacağı gereksiz döngü sayısını azaltmasıdır (4).

Klomifen Sitrat Tedavi Sonuçları

Ovulasyon oluşturmak için KS dozunun, beden ağırlığıyla ilişkisi gerekir, ancak bu gerekli dozun belirlenmesi için güvenli bir yol değildir. Klomifen sitrat yağ dokusunda depolanmadığı için, yanıt vermeyen obez kadınlarda neden büyük olasılıkla hiperandrojenemi ve hiperinsülinemidir. Dolaşımdaki yüksek androjen ve insülin düzeyleri hipotalamo-hipofiz-over aksını ilaca dirençli hale getirir. Klomifen

sitrat, FSH ve LH salınımına neden olur ve yüksek LH düzeyi gebeliği engeller. Gebelik elde edilememesi artmış LH düzeyine bağlı olabileceği gibi, KS'in servikal mukus ve endometriyum üzerine olan anti-östrojenik etkilerine de bağlıdır. Endometriyal kalınlık 8mm altında, endometriyal proliferasyon ve servikal mukus baskılanmış iken intrauterin inseminasyon (IUI) uygulanırsa, doz ve süreyle ilişkisiz olarak gebelik oranı düşüktür (88,89). Homburg yaptığı bir derlemede KS ile tedaviyi takiben ovulasyon ve gebelik oranlarına ilişkin sonuçlarda 5268 hastada %73 ovulasyon oranı ve %36 gebelik oranı ortaya koymuştur. Gebelik sonuçları ile ilgili 4 çalışmayı daha değerlendirdiklerinde gebeliklerin yaklaşık %20 spontan abortus, geri kalanın canlı doğum ile sonuçlandığını, %27 anovulatuvar kadında normal FSH konsantrasyonu olmasına karşın KS'a dirençli olduğunu bildirmişlerdir (4). Yapılan başka bir çalışmada KS ile ovulasyon indüksiyonuna yanıtta serbest androjen indeksinin en iyi belirleyici olduğu, ayrıca obezite, döngü öyküsü (oligo-amenore), ve ortalama over hacminin önemli değişkenler olduğu gösterilmiştir (90).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan gerekli kimyasal malzemeler Celal Bayar Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2011-055 nolu proje ile desteklenmiştir. Ayrıca çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'nun 28.10.2011 tarih ve 04/20/2011 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Deneyel Çalışmanın Yeri ve Deneklerin Türü

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminden temin edilen, 200-250 gr ağırlığında 28 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, bu türün bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

Deney gruplarının oluşturulması

Sıçanlar rasgele 4 gruba ayrıldı.

Grup I: PKOS grubu; Deneyel polikistik over sendromu oluşturmak için grup 1, 2 ve 3'teki her sıçana bir defa yağda çözünmüş 4 mg estradiol valerat (EV) intramüsküler olarak uygulandı ve enjeksiyondan 30 gün sonra deneyel polikistik over sendromu oluşmuş kabul edildi.

Grup II: PKOS +KS; Her sıçana klomifen sitrat enjeksiyon ile 10 mg/kg dozunda tek doz verildi.

Grup III: PKOS +KS+E vit; Klomifen sitrat ile birlikte, 21 gün süre ile E vitamini 100 mg/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyon şeklinde verildi.

Grup IV: Kontrol grubu (Bir şey uygulanmadı)

Sıçanlar 52.gün anestezi altında (Ketamin HCl 80 mg/kg ve Xylazine 5 mg/kg) servikal dislokasyon yoluyla feda edildi ve histolojik doku takibi için uterin boynuzlar alındı.

Deney süresinin sonunda elde edilen doku örnekleri %10'luk formaldehit ile tespit edildi.

Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

%10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı (Tablo 5).

Tablo 5: Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dk
	% 80 etil alkol	20 dk
	% 95 etil alkol	20 dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dk
	Ksilol	30 dk
Emdirme %60° C etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Mikrotom(Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksinen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile

boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 6).

Tablo 6: Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimyasal boyama için ER α (Genetex, GTX61047), ER β (Genetex, GTX23577), SOD (Genetex, GTX100659), İnos (Genetex, GTX15323), Enos (Genetex, GTX15280), primer ankitorları kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin (00-3008, Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutuldu. İnos boyamasında tripsin işlemi yerine 5 dk pH 6 sitrat buffer solusyonunda dokular kaynatıldı ve ardından soğumaya bırakıldı. Ardından tüm

dokulara, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solusyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan ER α , ER β , SOD, İnos, Enos antikorları ile +4°C'de inkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 30 dk inkübe edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 7).

İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

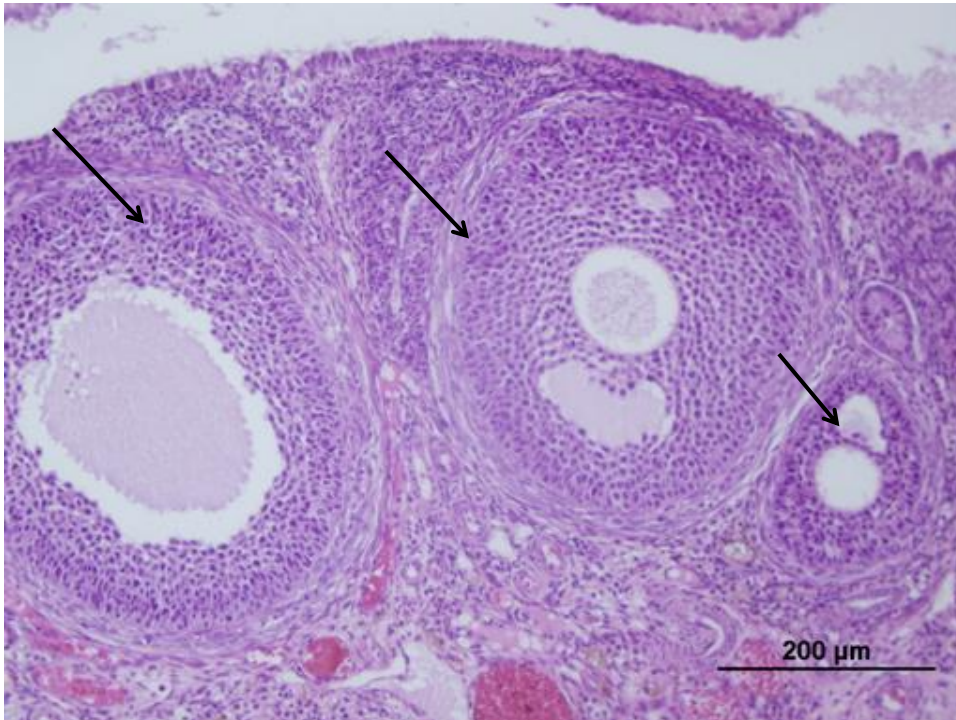
Tablo 7: İmmunohistokimyasal Yöntem

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
	Ksilen	30 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	37°C 15 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	ERα, ERβ, SOD, İnos, Enos	2 saat, 4de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

4. BULGULAR

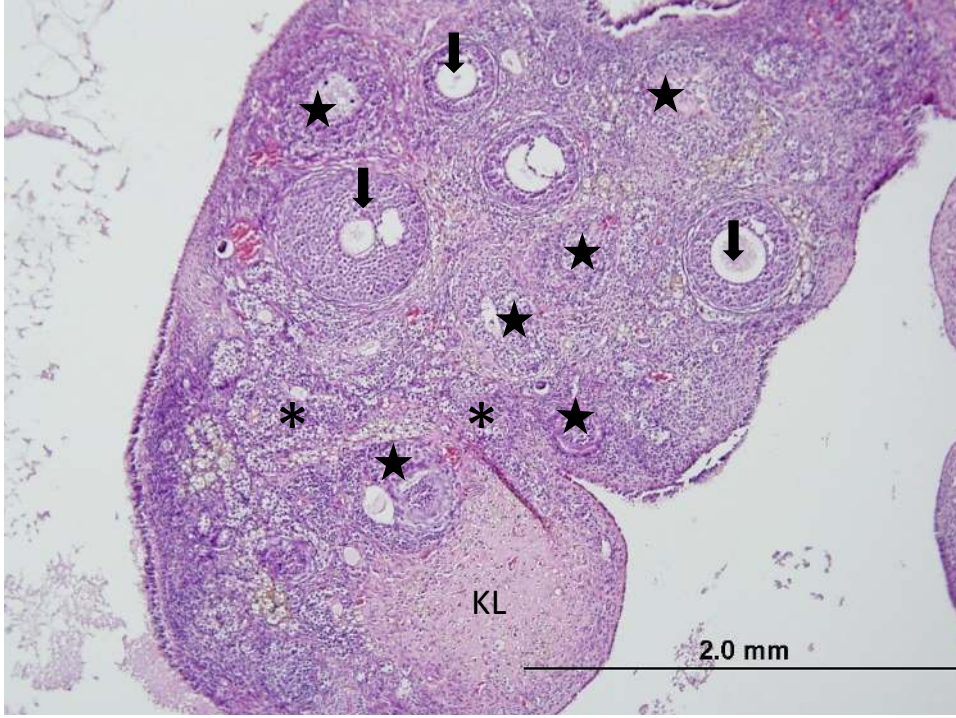
Işık Mikroskopik Bulgular:

Grup IV'e ait over dokusunun ise yüzeyi germinal epitelle döşeliydi. Çevresel yerleşimli korteks ve merkezi yerleşimli medulla ayrımı yapılmaktaydı. Kortekste gelişimlerini farklı aşamalarındaki primordial, primer, sekonder ve graaf folikülleri bulunmaktaydı. Medulla stroması mezovaryum ile devam eden düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşmaktaydı (Şekil 2).



Şekil 2: Grup IV'e Ait Over Dokusu (Ok: Çeşitli büyüme aşamasındaki folliküller.)

Grup I, Grup II, Grup III'e ait over dokusuna, antral folikül sayısında ve atreziye giden follikül sayısında artış, kortikal ve subkortikal stromal hipertrofi ve kistik dilate folliküller gözlemlendi (Şekil 3).



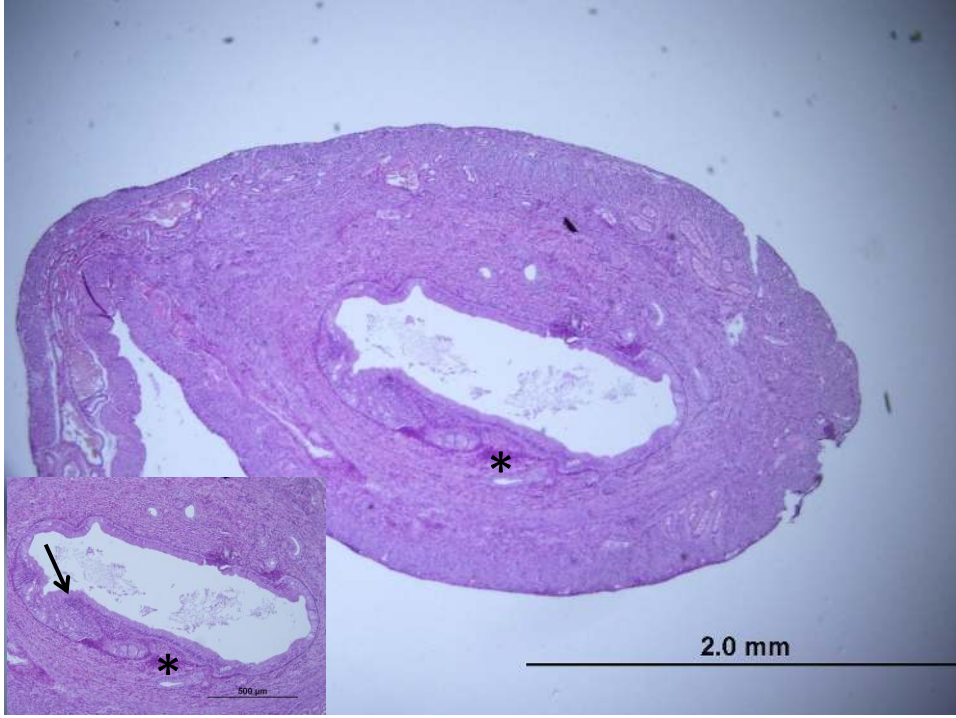
Şekil 3: Grup I, Grup II, Grup III'e Ait Over Dokusu (Yıldız :Atretik follikül, *:Stromal hipertrofi, ok: farklı aşamalarda gelişmekte olan folliküller , KL: Korpus Luteum)

Grup IV'e ait uterus dokusunda; en içte endometriyal lümen epiteli ve endometriyal bezler ile karakterize lamina propriadan oluşan endometriyum, ortada miyometriyum ve organı dıştan saran perimetrium tabakaları olmak üzere 3 ayrı tabaka ayırt edildi. Lümen epiteli bazılarında silia içeren prizmatik epitel hücrelerinden oluşan tek katlı bir tabaka şeklindeydi. Epitelin altında bağ dokusu ile birbirlerinden ayrılmış uterus bezleri ile dağınık halde bulunan stromal hücreler gözlemlendi. Miyometriyum tabakasında kas hücreleri normal yapıda gözlemlendi. Miyometriyum tabakasından sonra organı saran perimetrium tabakası bulunmaktaydı (Şekil 4).



Şekil 4: Grup IV'e Ait Uterus Dokusu (ELE: Endometriyal lümen epiteli, BE, Bez epiteli, M: Miyometriyum, P: Perimetrium)

Grup I, Grup II, Grup III'de bazı deneklere ait uterus kesitlerinde endometriyum tabakasında düzensizlik gözlemlendi. Endometriyumda daha fazla olmakla birlikte ve miyometriyum dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu dikkati çekti. Ayrıca miyometriyuma ait düz kas hücrelerinde fibriller düzensizlikler bulunmaktaydı. PKOS grubuna ait bir denekte de endometriyal atrofi izlendi (Şekil 5,6).



Şekil 5: Grup I, Grup II, Grup III'de Uterus Dokusu (Hiperplazili)

Ok: Endometriyal lümen epiteli hiperplazisi, *: MNL infiltrasyonu



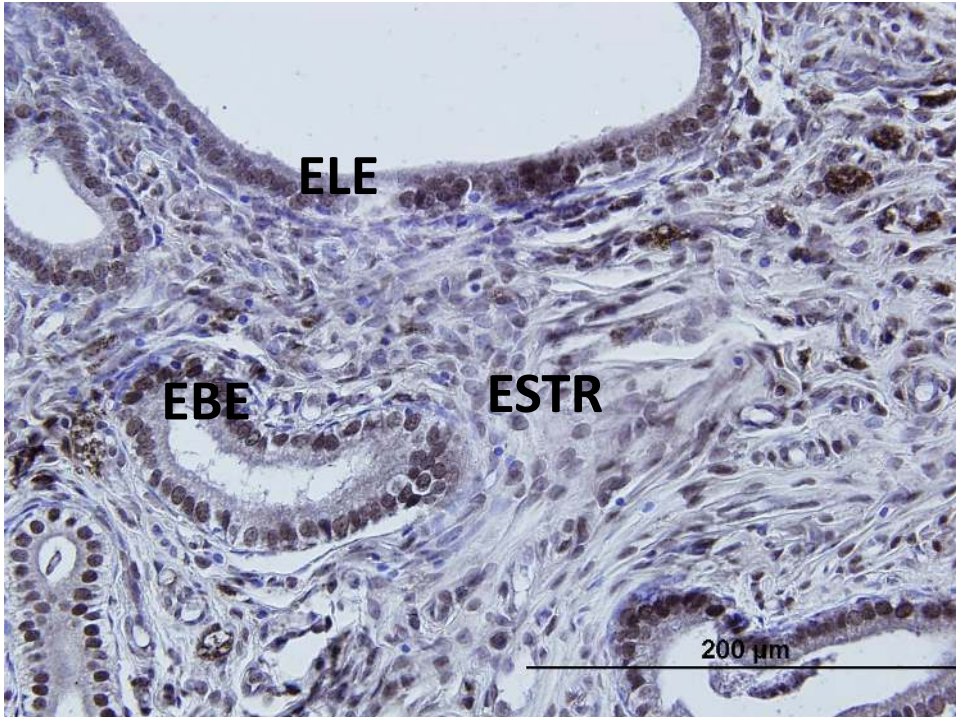
Şekil 6: Grup I, Grup II, Grup III'de uterus dokusu (Atrofiye olmuş endometriyum)

İmmunohistokimyasal Bulgular:

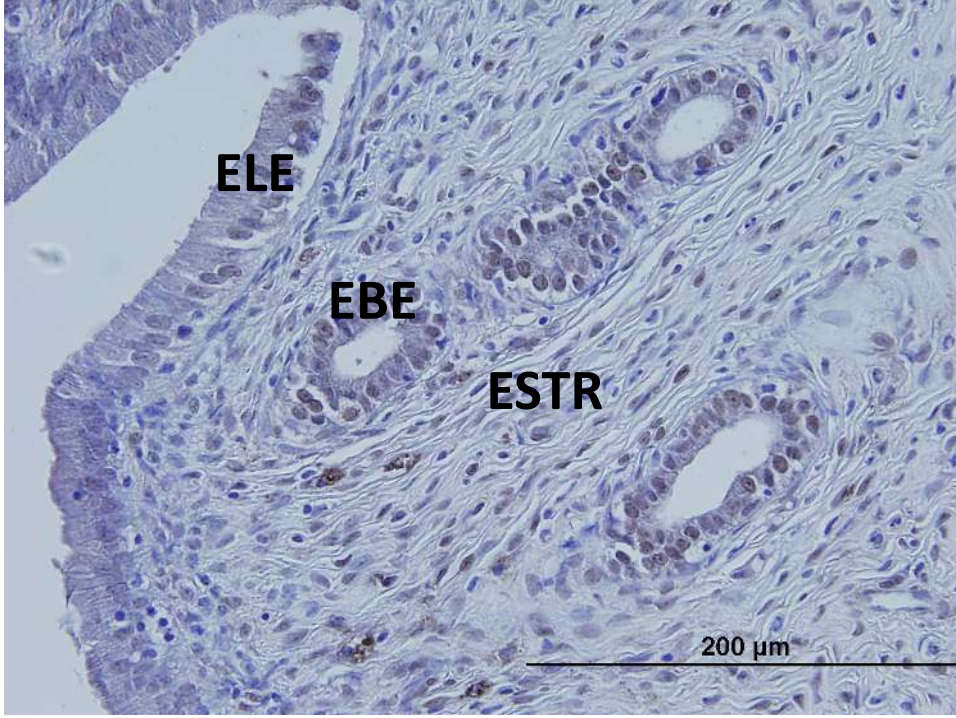
İmmunohistokimyasal boyanmalar semi-kantitatif yöntem ile değerlendirildi. Bu yöntemle boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++,3), orta (+++,2) ve zayıf (+,1), belirsiz-var yok (-,0) olarak tanımlandı. Preparatlar ışık mikroskobu ile iki histolog tarafından değerlendirildi. Değerler ortalama ve standart sapma olarak verildi.

LAMİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASI

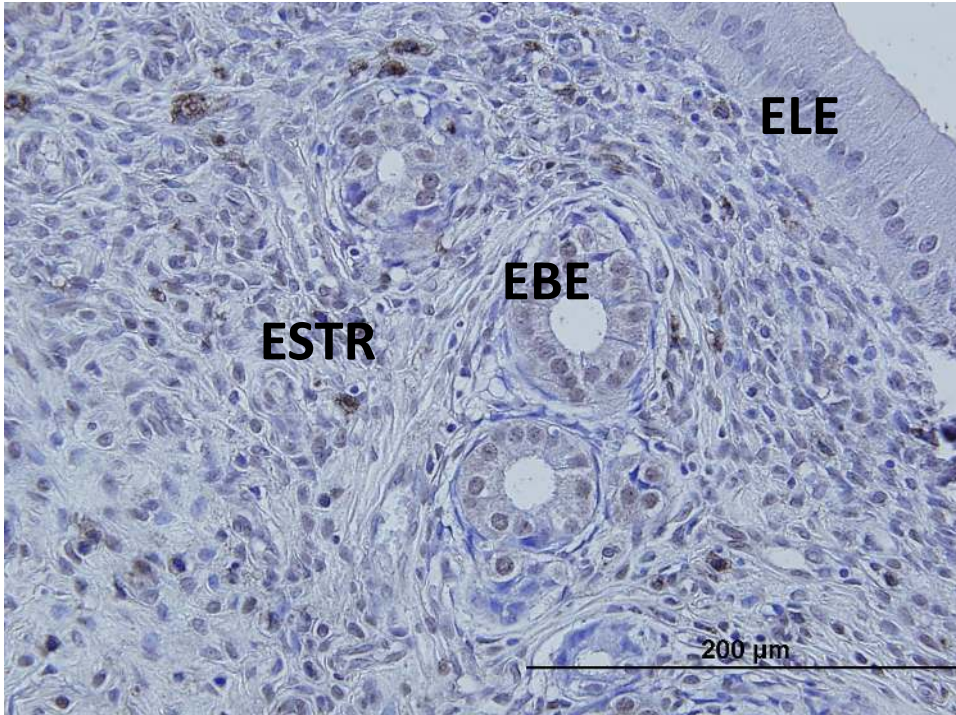
ER α immunboyanmasında Kruskal Wallis non-parametrik testine göre 4 grup arasında anlamlı fark vardı ($p= 0.000$). Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığını anlamak için Mann Whitney U testi uygulandı. Bu testin sonuçlarına göre grup IV $1.71 \pm 0,48$ olarak gözlemlendi. Grup I'de ($0,42 \pm 0,53$) grup IV'e göre anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,004$). Grup II ($0,14 \pm 0,37$) ile Grup I arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0.254$). Grup III ortalaması $1,28 \pm 0,48$ olarak gözlemlendi ve grup II'ye göre anlamlı olarak artmıştı ($p=0.002$) (Şekil 7,8,9,10) (Tablo 8,9).



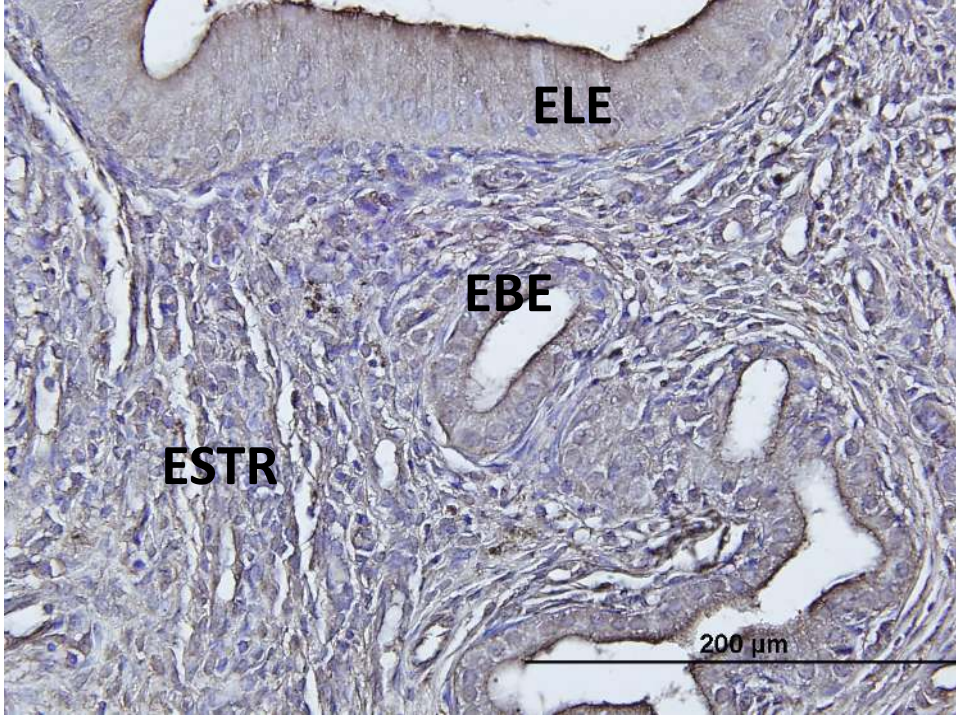
Şekil 7: Grup IV ER α (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kahverengi boyanan hücreler immün pozitif hücreleri göstermekte.)



Şekil 8: Grup I ER α (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. Kontrol grubuna göre pozitif hücrelerin azaldığı gözlenmekte.)



Şekil 9: Grup II ER α (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. Kontrol grubuna göre pozitif hücrelerin azaldığı gözlenmekte)

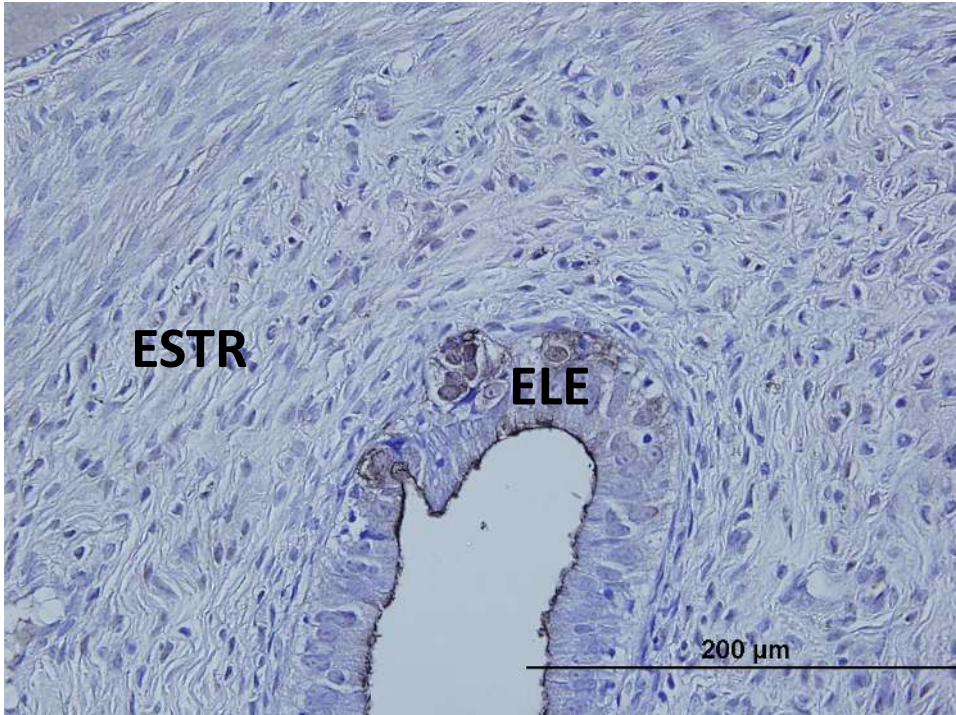


Şekil 10: Grup III ER α (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. PKOS ve PKOS+CC grubuna göre artmış immun pozitiflik gözlenmekte)

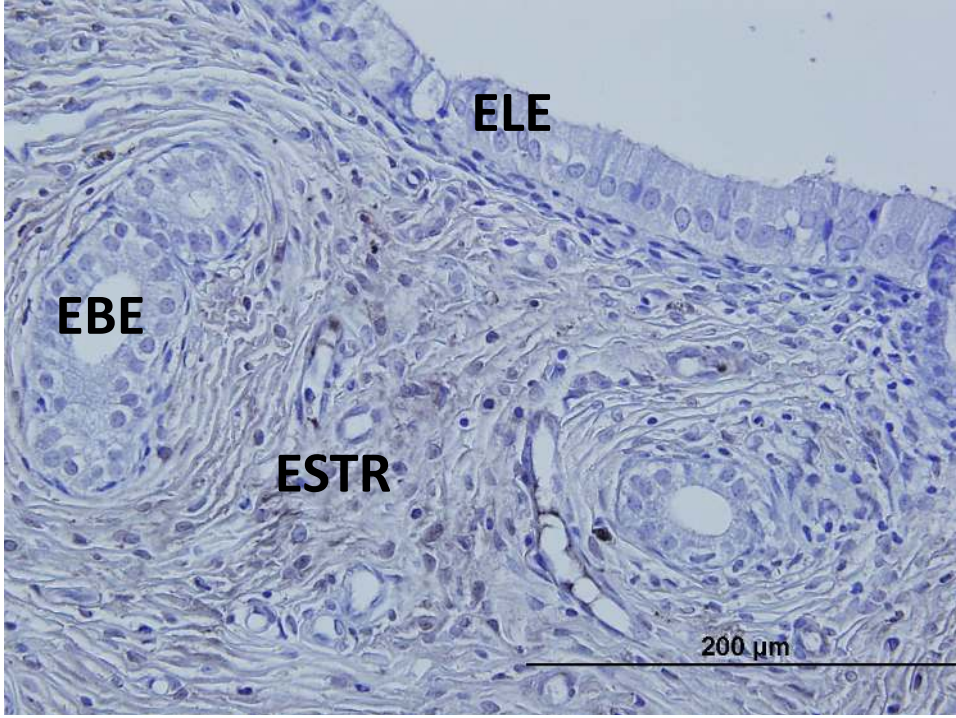
ER β immunboyanmasında Grup IV'de 1.53 ± 0.53 olarak gözlemlendi. Grup I'de (0.57 ± 0.53) grup IV'e göre anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.004$). Grup II (0.42 ± 0.53) ile grup I arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0.254$). Grup III ortalaması 1.28 ± 0.48 olarak gözlemlendi ve grup II'ye göre anlamlı olarak artmıştı ($p=0.002$) (Şekil 11,12,13,14) (Tablo 8,9)



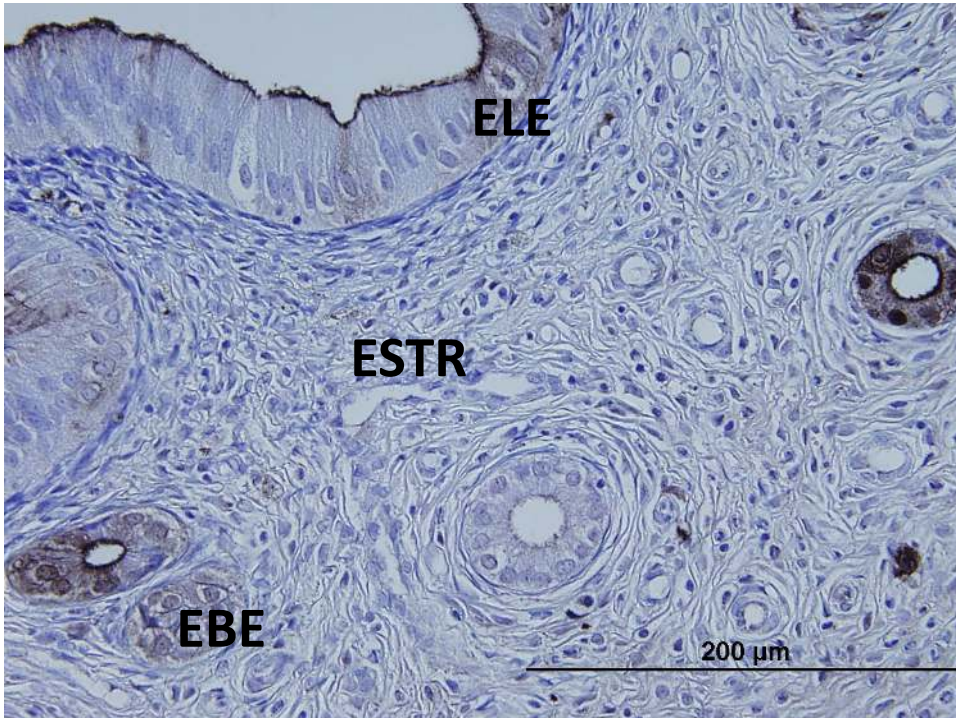
Şekil 11: Grup IV ER β (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kahverengi boyanan hücreler immun pozitif hücreleri göstermekte)



Şekil 12: Grup I ER β (ELE: endometriyal lümen epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kontrol grubuna göre pozitif hücrelerin azaldığı gözlenmekte)



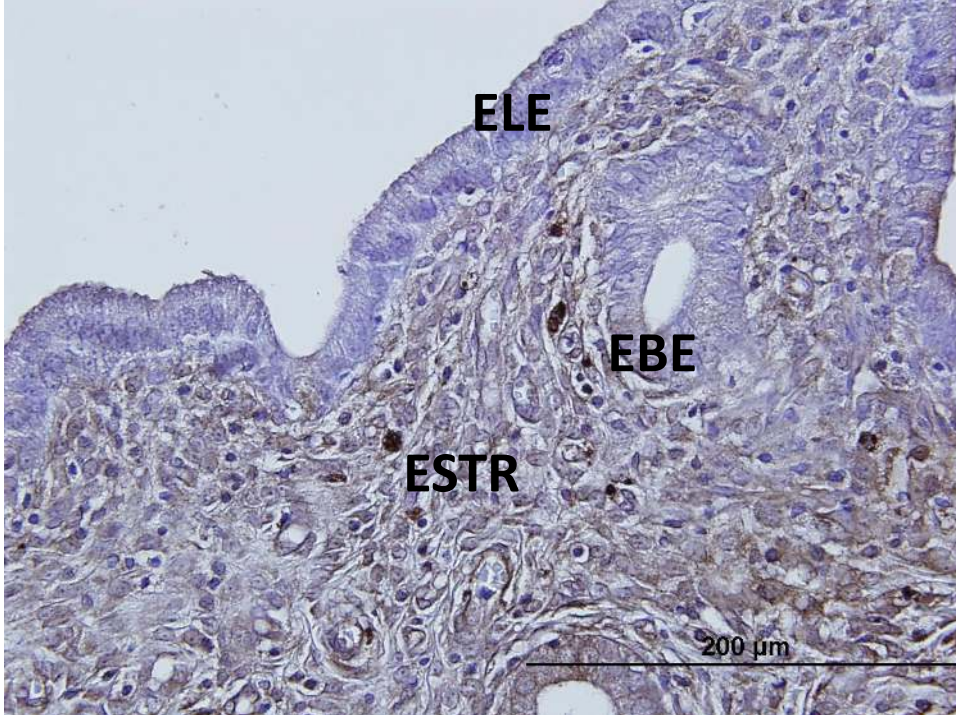
Şekil 13: Grup II ERβ (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma)



Şekil 14: Grup III ERβ (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. Grup I ve Grup II'ye göre artmış immün pozitiflik gözlenmekte)

SOD Grup IV $0,85 \pm 0,37$ olarak gözlemlendi. Grup I'de $2,00 \pm 0,57$ Grup IV'e göre

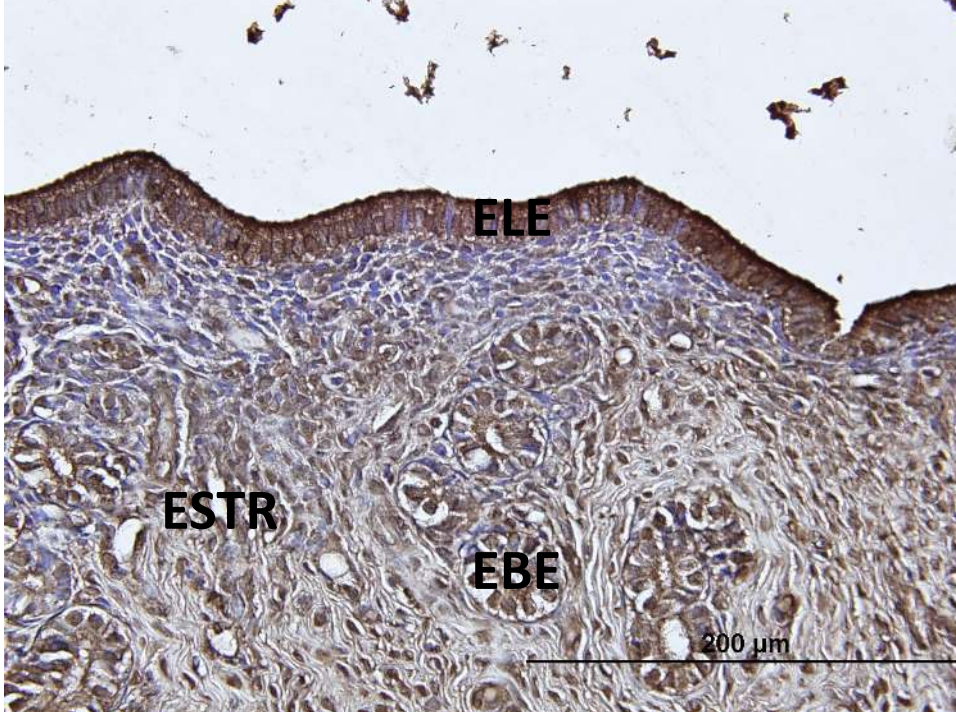
anlamli olarak artmıştı ($p=0,004$). Grup II ($2,14\pm0,37$) ile grup I arasında anlamli fark gözlenmedi ($p=0.254$). Grup III ortalaması $1,42\pm0,53$ olarak gözlendi ve grup II göre anlamli olarak azalmıştı ($p=0.002$) (şekil 15,16,17,18) (Tablo 8,9)



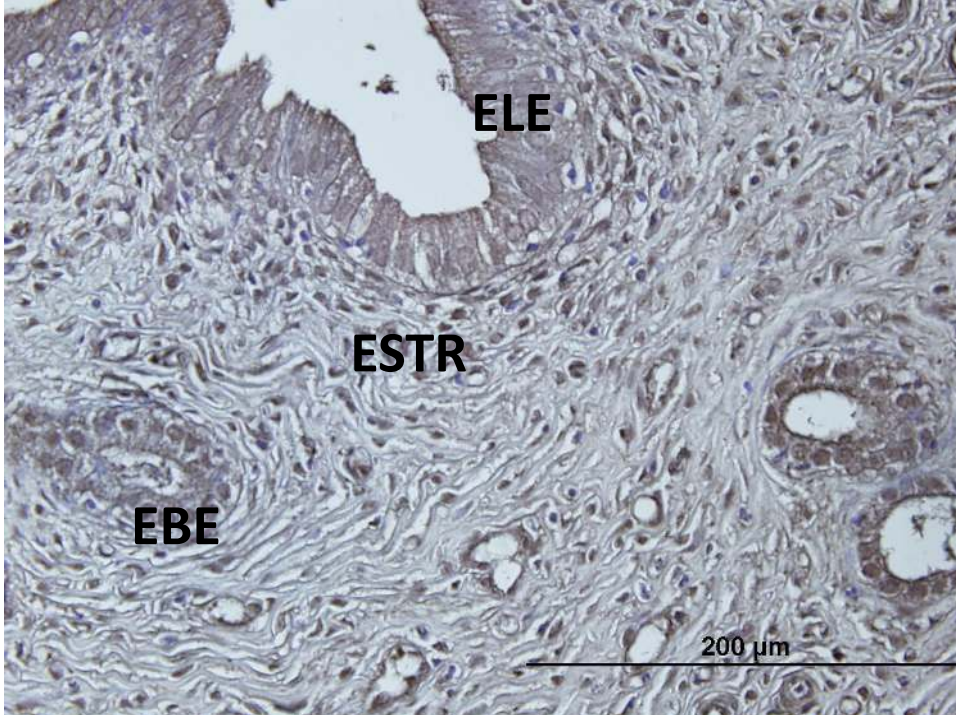
şekil 15: Grup IV SOD (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kahverengi boyanan hücreler immun pozitif hücreleri göstermekte)



Şekil 16: Grup I SOD (ELE: endometriyal lümen epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kontrol grubuna göre pozitif hücrelerin arttığı gözlenmekte)

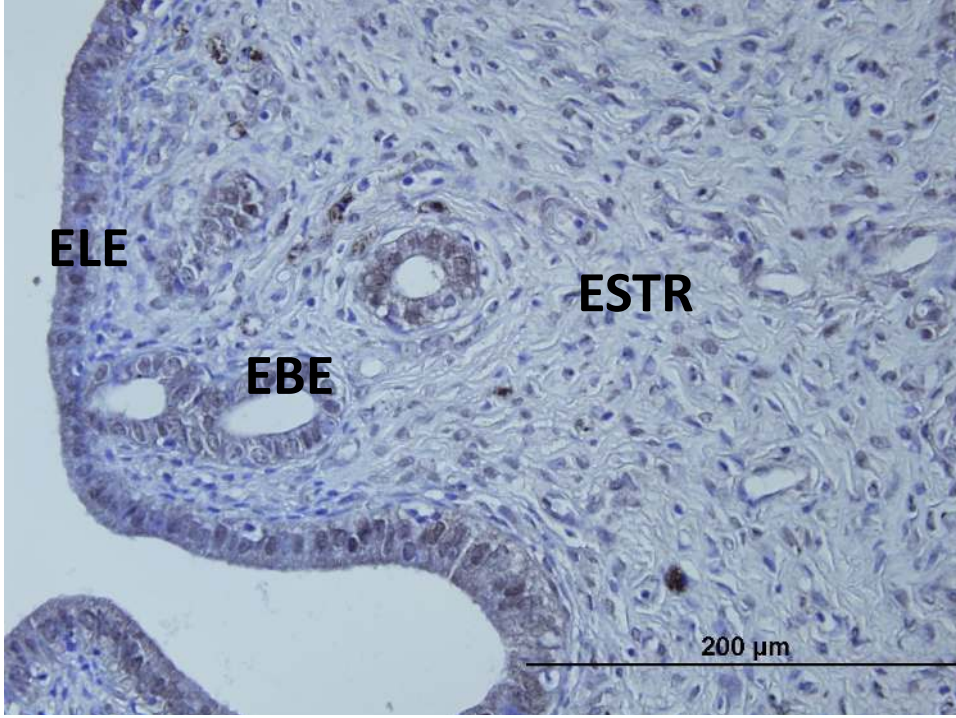


Şekil 17: Grup II SOD (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. Kontrol grubuna göre pozitif hücrelerin arttığı gözlenmekte)

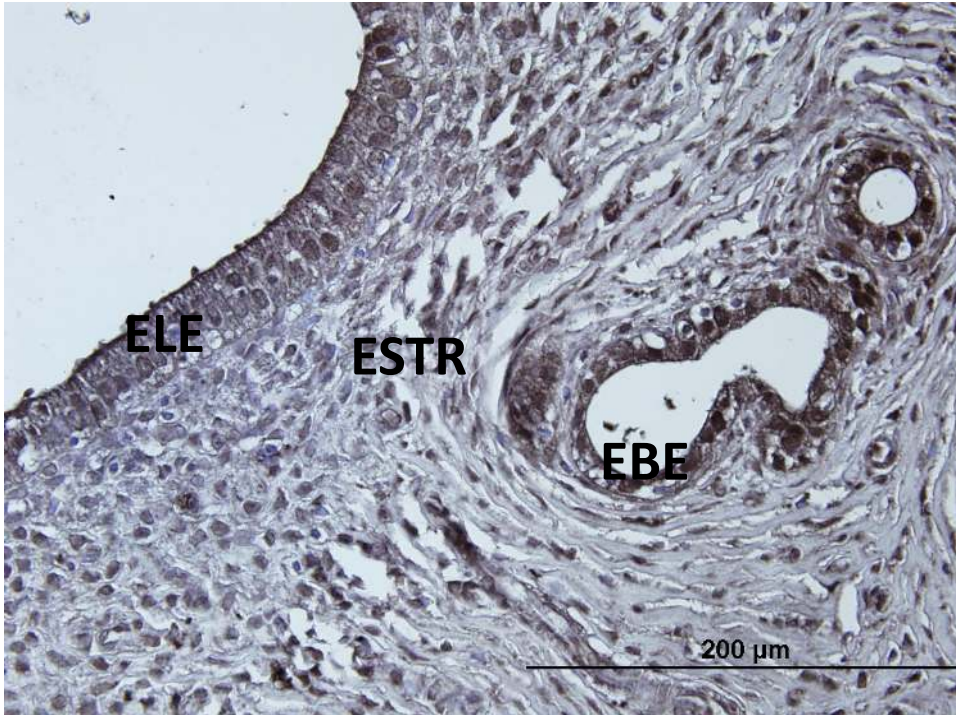


Şekil 18: Grup III SOD (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. PKOS ve PKOS+CC grubuna göre azalmış immün pozitiflik gözlenmekte)

İNOS Grup IV'de 1.42 ± 0.53 olarak gözlemlendi. Grup I'de (2.28 ± 0.48) grup IV göre anlamlı olarak artmıştı ($p=0.015$). Grup II (2.14 ± 0.69) ile grup I arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0.705$). Grup III ortalaması 1.28 ± 0.48 olarak gözlemlendi ve grup II'ye göre anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.002$). (Şekil 19,20,21,22)(Tablo 8,9)



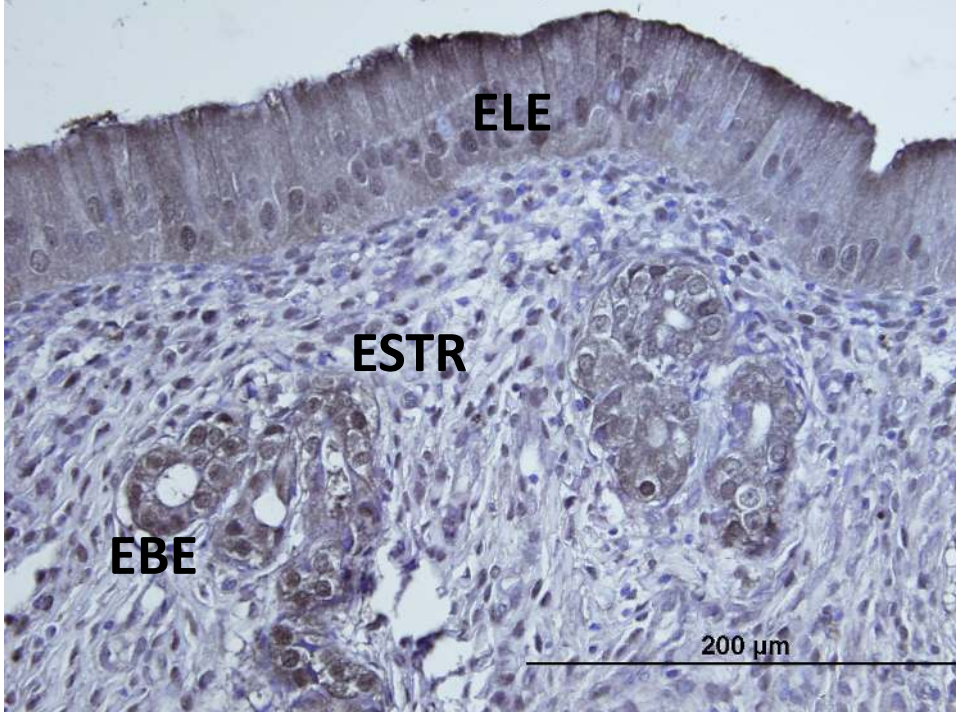
Şekil 19: Grup IV İNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kahverengi boyanan hücreler immun pozitif hücreleri göstermekte)



Şekil 20: Grup I İNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kontrol grubuna göre pozitif hücrelerin arttığı gözlenmekte)



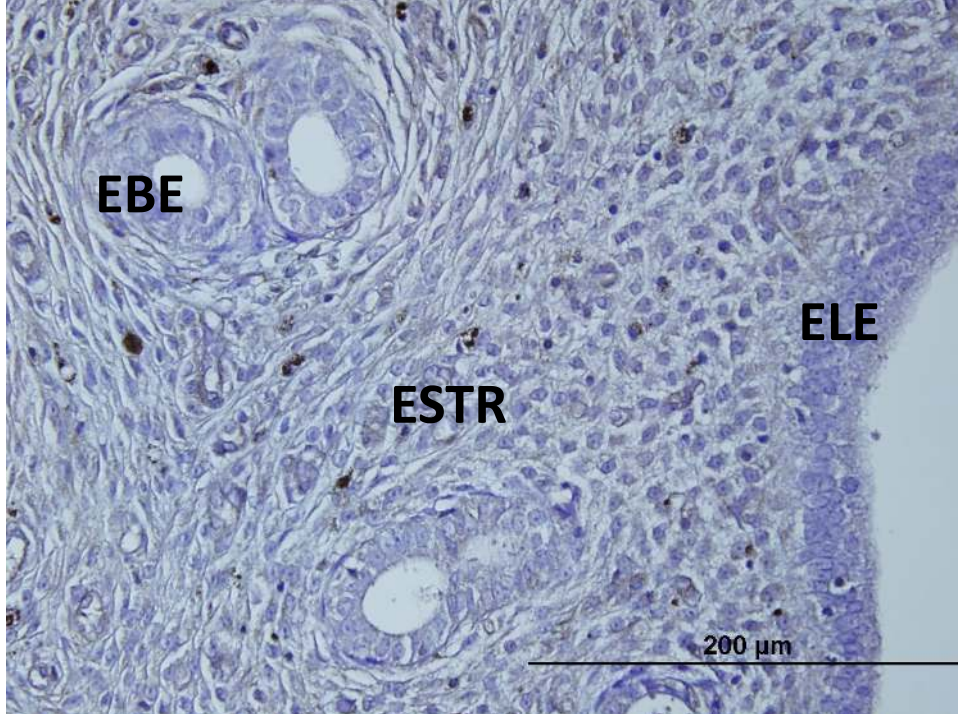
Şekil 20: Grup II İNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma)



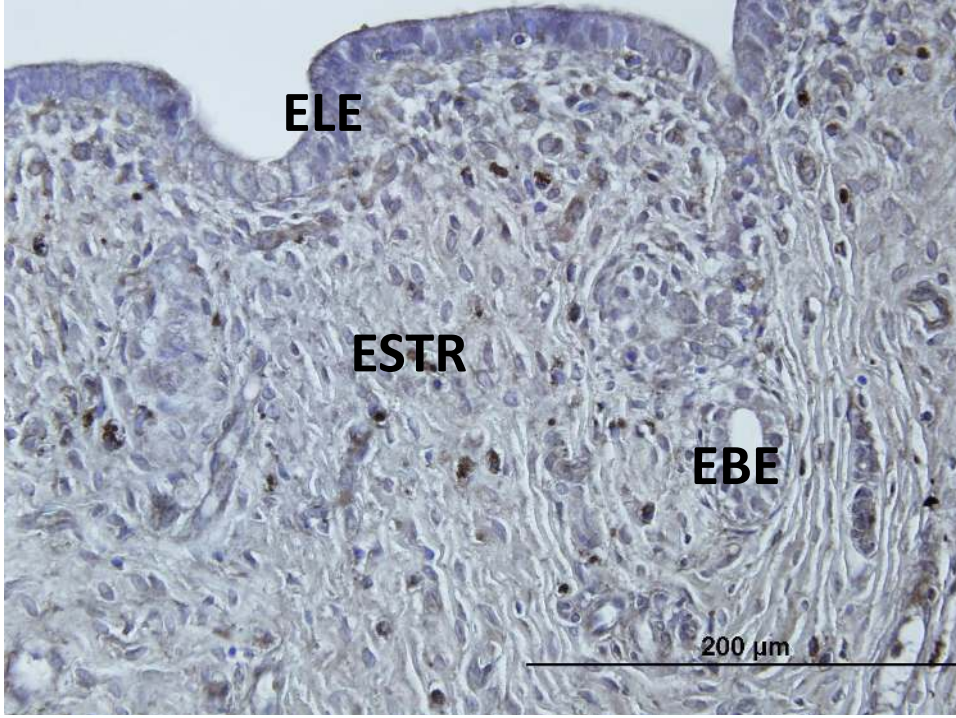
Şekil 22: Grup III İNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. PKOS ve PKOS+CC grubuna göre azalmış immün pozitiflik gözlenmekte)

Enos Grup IV 1.85 ± 0.37 olarak gözlemlendi. Grup I'de (1.14 ± 0.37) grup IV'e göre

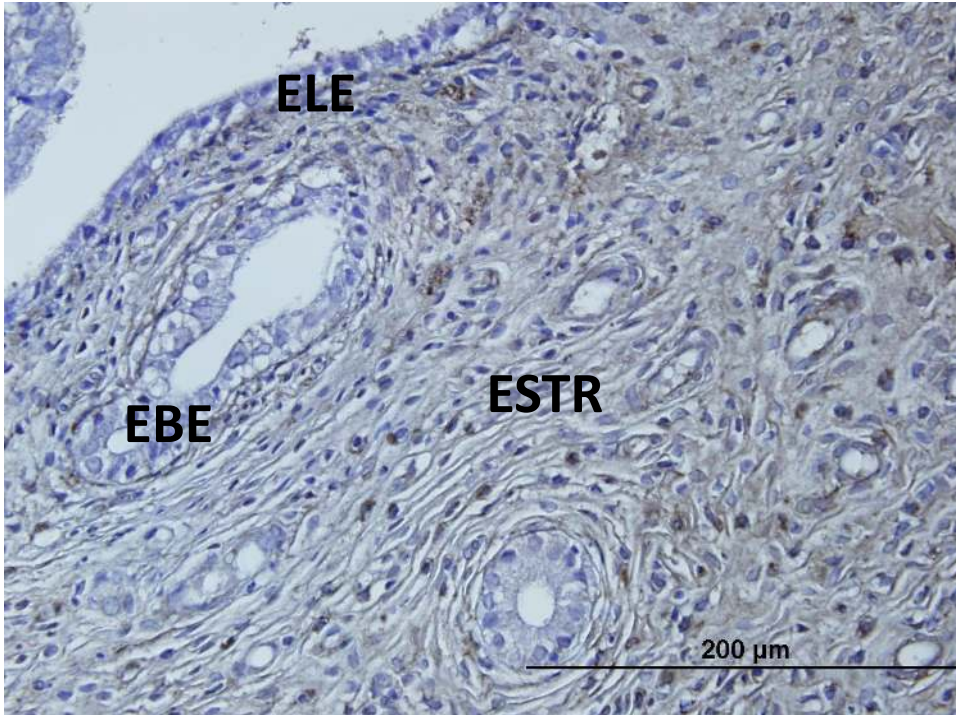
anlamalı olarak azalmıştı ($p=0,010$). Grup II ($0,14\pm0,37$) ile grup I benzer bulundu ($p=1$). Grup III'ün ortalaması $1,42\pm0,53$ olarak gözlendi ve grup II'ye göre anlamalı fark izlenmedi ($p=0.254$). (şekil 23,24,25,26) (Tablo 8,9)



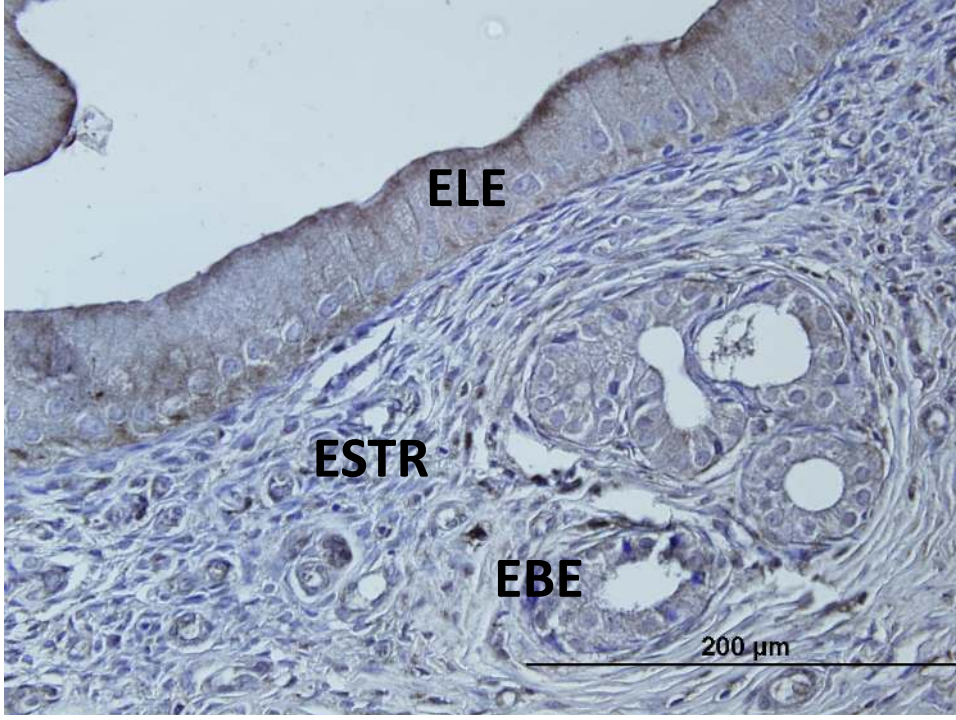
şekil 23: Grup IV eNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kahverengi boyanan hücreler immun pozitif hücreleri göstermekte)



Şekil 24: Grup I eNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, ESTR: Endometriyal stroma . Kontrol grubuna göre pozitif hücrelerin azaldığı gözlenmekte)



Şekil 25: Grup II eNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma)



Şekil 26: Grup III eNOS (ELE: endometriyal lümen epiteli, EBE: endometriyal bez epiteli, ESTR: Endometriyal stroma. PKOS ve PKOS+CC grubuna göre artmış immun pozitiflik gözlenmekte)

Tablo 8: Gruplara ait immunohistokimyasal semikantitatif skrolama (Ort $\pm$ SS)

Grup	ER α	Er β	SOD	iNOS	eNOS
Grup I	0,42 $\pm$ 0,53	0,57 $\pm$ 0,53	2,00 $\pm$ 0,57	2,28 $\pm$ 0,48	1,14 $\pm$ 0,37
Grup II	0,14 $\pm$ 0,37	0,42 $\pm$ 0,53	2,14 $\pm$ 0,37	2,14 $\pm$ 0,69	1,14 $\pm$ 0,37
Grup III	1,28 $\pm$ 0,48	1,28 $\pm$ 0,48	1,42 $\pm$ 0,53	1,28 $\pm$ 0,48	1,42 $\pm$ 0,53
Grup IV	1.71 $\pm$ 0,48	1,53 $\pm$ 0,53	0,85 $\pm$ 0,37	1,42 $\pm$ 0,53	1,85 $\pm$ 0,37

Tablo 9: Gruplar arası immunohistokimyasal istatistik değerleri (p)

4 GRUP	P=0,000	P=0,004	P=0,001	P=0,009	P=0,022
G IV - G I	P=0,004	P=0,004	P=0,004	P=0,015	P=0,010
G IV - G II	P=0,0010	P=0,001	P=0,001	P=0,058	p=0,010
G IV- G III	P=0,112	P=0,122	P=0,122	P=0,591	P=0,107
G I - G II	P=0,254	P=0,254	P=0,254	P=0,705	P=1,0
G I - G III	P=0,015	P=0,015	P=0,015	P=0,006	P=0,254
G II - G III	P=0,002	P=0,002	P=0,002	P=0,026	P=0,254

Grup:G

5.TARTIŞMA

Polikistik over sendromu, üreme dönemindeki kadınlarda en sık görülen, multifaktöryel temelli, geniş klinik spektrum gösteren bir rahatsızlıktır. Hiperandrojenizm, ovulatuvar disfonksiyon, ve polikistik overler ile karakterize sendromda (8), genellikle amenoreden menorajiye kadar geniş bir yelpazede yer alan adet düzensizlikleri, hirsutizm ve bazen de obezite görülür (8,30). Artmış serum LH seviyesi ve BKİ'ne bakılmaksızın var olan İD sendromun genel özelliğidir, dolayısıyla uzun vadede Tip II DM ve KVH riski artar (1,8). Ayrıca kronik anovulasyon, obezite ve hiperinsülinemi sonucu ileri yaşta endometriyal neoplaziye yatkınlık görülebilir (91). Anovulatuvar infertilitenin en sık nedeni olan PKOS'da (92) artmış beden yağ oranı İD'yi şiddetlendirir ve olumsuz metabolik sonuçlarla ilişkilidir (34,36). Kilo verme özellikle kilolu ya da obez PKOS'lu kadınlarda etkili, ucuz ve yan etkisiz olduğu için genel tedavide ilk seçenek olmalıdır. Obez olgularda yalnızca %5-7 arasında kilo kaybı adet döngü düzeni ve üreme fonksiyonunda iyileşme sağlayabilir (93). Diğer tedavi yöntemleri KS ya da FSH ile uyarı, insülin ve/veya LH konsantrasyonunda azalma gibi prensiplere dayanır (92). Klomifen sitrat, ovulasyonun düzensizliği ya da yokluğunda farmakolojik tedavinin birinci basamağını oluşturur. Ancak KS verilen hastalarda ovulasyon oranı yaklaşık %80 iken gebelik oranı yalnızca %35-40'ı bulmaktadır (5). Ovulasyon ve gebelik oranlarındaki bu büyük tutarsızlık KS'nin endometriyum ve servikal mukus üzerindeki anti-östrojenik etkileri ile ilişkilidir (92).

Belirgin OS'ın görüldüğü metabolik bozukluklardan biri olan PKOS'da, TOS ve TAS arasında dengesizlik vardır. Mitokondrial oksijen tüketimi ve GSH'ın azalmasıyla ROS ürünlerinin artması, PKOS'lu hastalardaki mitokondriyal disfonksiyonu açıklamada yardımcı olur. Mitokondrial ve endotelyal fonksiyonun İR ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (94). Oksidatif stres hücre ve doku yapılarına karşı gelişen moleküler hasarın ana nedenlerinden biridir. Oksijen radikallerinin zararlı etkilerini önleyen ya da sınırlandıran temizleyici moleküller olan anti-oksidanların kadın üreme sisteminin normal işleyişinde ve kadın infertilite

patogenezinde önemli rolleri vardır (55). Anti-oksidanlar ayrıca apoptoz, ovulasyon ve steroidogenez gibi ovaryan işlevleri de düzenler (55,56,57). Bununla birlikte anti-oksidanlar yüksek düzeylere ulaşırsa amenore, fertilitenin azalması, abortus riski, embriyotoksosite ve teratojenite gibi sonuçlara yol açabilirler (58). Dolayısı ile OS ile mücadele ederek dengeyi ve düzeni sağlamaya çalışan anti-oksidatif mekanizma, belli bir değerin üstünde koruyucu etki yerine olumsuz etki gösterebilir. Genel toplumda kan glikoz düzeyleri ve OS arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur (62). Diabet ve obezitede artan OS ayrıca İD'ne sahip PKOS'lu kadınlarda da belirgin artış gösterir (63,59,61). Bununla birlikte obez olmayan ve hiperinsülinemisi bulunmayan PKOS hastalarda da TOS ve TAS artışı gösterilmiştir (3,1). Ancak bu çalışmalarda anti-oksidan düzeyleri ile ilgili çelişkili sonuçlar vardır. Bazı araştırmacılar PKOS'da anti-oksidan düzeyinde azalma bulurken, diğerleri kompensatuar mekanizma olarak arttığını gözlemlemişlerdir (1,2). Süperoksit radikallerini temizleyen ve önemli bir anti-oksidan enzim olan SOD, endometriyal düzenlenme ve korpus luteum fonksiyonlarında rol oynar. Süperoksit radikalinin damar geçirgenliği artışı ile östrojen etkisine non-genomik yanıtta rol aldığı ve implantasyon ile desidualizasyonun başlaması için gerekli olduğu ileri sürülmüştür. Adenomyozis ve endometriyozisde artan süperoksitin, bu hastalıklarda görülen infertilite ve/veya abortusla ilişkili olduğu ve yanıt olarak da SOD ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (7). Endometriyal düzeyde OS artışı fertilitenin bozulması, erken gebelik kayıpları, premalign ve malign dönüşüme neden olmaktadır. Endometriyal polip, myom, hiperplazi ve adenokarsinomlu hastalarda endometriyumda anti-oksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu üzerine yapılan bir çalışmada SOD aktivitesinin hiperplastik ve adenokarsinomlu hastalarda önemli miktarda azaldığı gösterilmiştir. Katalaz aktivitesi endometriyum adenokarsinomunda önemli miktarda azalırken, lipid hidroperoksit seviyesi SOD ve katalaz aktivitesi ile negatif bağıntı, GSH-Px ve glutatyon redüktaz aktivitesi ise pozitif bağıntı gösterir (95). Bizim çalışmamızda PKOS grubunda SOD aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksektir. Bu yüksekliğin PKOS'un neden olduğu OS ile başa çıkmanın sonucu geliştiğini düşünüyoruz. Bu sonuç uzun vadede artmış endometriyal kanser riskinin belki de geç dönemde bu kompensatuar mekanizmada oluşan bozukluğa bağlı gelişebileceğini akla getirmektedir. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada, katekol östrojenler (CE), 4-hidroksiestradiol

(4-OHE(2)) and 2-hidroksiestradiol (2-OHE(2)) şeklinde östrojenin oksidatif metabolizmasının, östrojen karsinogenezinde önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bu metabolitler mikrosatellit dengesizliği ve neoplastik dönüşümü indükler (96). Bifulco ve ark. endometriyum adenokarsinomunda endometriyal seviyedeki endoplazmik retikulum (ER) stresi araştırmış ve ER stres belirteçleri olan GRP78, ATF6 and CHOP mRNA ekspresyonunun endometrioid endometriyal adenokarsinom örneklerinde önemli miktarda arttığını göstermiştir (97). Bu çalışmalar bize endometriyum adenokarsinom patogenezinde OS'in önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Karşılanmamış östrojen etkisinin neredeyse prototip örneği olan PKOS, yalnızca östrojenin proliferatif etkisi ile değil aynı zamanda artmış OS'in varlığı ile de uzun vadede endometriyum kanser gelişiminde rol oynayabilir. Erken gebelik ve endometriyumda desidual dönüşümde FOXO-1 proteinlerinin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, FOXO proteinleri ya proapoptotik ya da farklılaşma ile ilişkili genler üzerinden, hücre döngüsünün durması, oksidatif savunma ve DNA onarımı gibi düzenleme yetenekleri nedeni ile hücre kaderinin anahtar düzenleyicisi olarak ortaya çıkmıştır. Endometriyumda FOXO-1 progesterona bağımlı farklılaşma, adet kanaması ve gebelik süresince oksidatif hasara karşı fetomaternal korumada kritik bir düzenleyici olarak özel bir öneme sahiptir (98). Sağlıklı bir gebeliğin oluşumu ve implantasyon sonrasında sürmesi, OS'in yeterli düzeyde dengelenmesine bağlıdır. PKOS'nun hem kendi metabolik etkileri hem de tedavi amaçlı kullanılan KS'in OS üzerine yarattığı ek etki, sendromda görülen erken gebelik kaybı ve KS tedavisi ile elde edilen ovulasyon-gebelik oranları arasındaki dengesizliği açıklayabilir. Bu çalışmada erken gebelik kaybında görülen OS, PKOS'da görülen yüksek abortus oranı ile ilişkili olabilir. Kajihara ve ark. desidualize insan endometriyal stromal hücrelerde OS direnci ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerinde androjenlerin etkilerini araştırmış ve dihidrotestosteronun (DHT) desidualize insan endometriyal stromal hücreler üzerinde OS ile indüklenen apoptozise karşı direnci arttırdığını göstermiştir (99). Ayrıca aynı çalışmada DHT, artmış SOD2 proteinine paralel FOXO1 ekspresyonunu artırır. Yani DHT anti-oksidan aktiviteyi artırarak OS'in desidualize endometriyum üzerindeki apoptozis sürecini etkiler, implantasyon ve trofoblast invazyonu aşamasında rol oynar. Periferik dokuda güçlü bir etkinliği olan DHT, endometrial proliferasyon ve sekresyon aşamalarında da görev alarak,

apoptotik süreç üzerine olan etkisiyle uzun vadede endometriyum düzensizliğine yol açabilir. Çalışmamızda OS'e karşı korunma amacıyla arttığını düşündüğümüz SOD, DHT'a bağlı artışta da görüldüğü gibi, PKOS'da oluşan hem düzensiz EM gelişiminden hem de implantasyon üzerine olan etkisiyle artan gebelik kaybından sorumlu olabilir. Endometriyum üzerine görülen bu etkilerin benzeri, overdeki mikroçevrede görülen androjen artışıyla düzensiz follikül gelişimi hatta follikül duraklamasında rol oynayabilir. Apoptotik sürecin düzgün işlememesi folliküllerin atreziye uğramasına engel olarak küçük boyuttaki follikül havuzunun artışına neden olabilir. Pre-antral follikül artışı androjen üretimini arttırarak hem folliküllerin daha da gelişmesini baskılar hem de artan androjenin apoptozis üzerindeki baskılayıcı etkisinin görülmesine yol açacak kısır döngünün sürmesine neden olur. Sendromda gördüğümüz artmış OS İD ile de ilişkilidir (1). Sabuncu ve ark. OS belirteci olan MDA ve antioksidan GSH seviyesi ile insülin duyarlılığı arasında negatif bağıntı varlığını ve ortalama BKİ 31.4 kg/m² olan PKOS'lu hastalarda SOD düzeyininin yüksek olduğunu göstermişlerdir (59). Bu çalışmada OS artışı ile birlikte görülen yüksek anti-oksidan seviyesi bizim çalışmamızda bulduğumuz anti-oksidan artışını desteklemektedir. Kuşçu ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında SOD düzeyini obez olmayan PKOS grubunda kontrol grubuna göre yüksek tespit etmişlerdir (3). Bu iki çalışmada hem ince hem de obez hastalarda görülen SOD artışının, OS'e yanıt olarak kompensatuar bir mekanizmayla olduğu düşünülmektedir. Hastaların ortalama yaşları göz önüne alındığında olumsuz metabolik etkilerle karşılaşma süresi en az 7-8 yıldır. Çalışmamızda oluşturulan deneysel PKOS modeli, üstünden fazla bir zaman geçmese bile EM düzeyinde SOD artışının olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Polikistik over sendromunda belli bir zaman dilimi geçmeden OS oluşabilir, hatta deneysel model süresi bile olumsuz metabolik değişikliklere yol açabilir.

Uterus fonksiyonun bozulması ve azalmış fertilite ile ilişkili olan DM, artan ROS sonucu oluşan oksidatif hasar ile ilişkili metabolik bir rahatsızlıktır. Bu hasara karşı anti-oksidan desteği ile korunmanın araştırıldığı bir çalışmada, streptozotosin ile oluşturulan diabetik sıçanlarda endometriyumda lipid peroksidasyonu ve temizleyici enzim aktivitesi üzerine E vitamini ve selenyum kombinasyonunun etkileri araştırılmış, bu tedavi ile streptozotosin grubunda MDA ve kan glukoz seviyesi düşmüştür (100). Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

streptozotosin grubunda katalaz, SOD ve GSH-Px aktivitesi önemli miktarda düşük bulunmuştur. E vitamini ve selenyum tedavisi ile bunların aktiviteleri artarken, diabetik sıçanlarda OS'in neden olduğu endometriyal komplikasyonlar ve anormal kan glukoz seviyesinin anti-oksidan desteği ile giderilebileceği gösterilmiştir. Bizim PKOS modelimizdeki SOD artışı OS'e karşı mücadele edebilme kapasitesini göstermektedir ve E vitamini desteği ile SOD azalmasının, ortamdaki OS'in azalması sonucu olduğunu düşünüyoruz. Streptozotosin ile azalan SOD seviyeleri PKOS'da görülen OS'den farklı bir yolla oluşabilir. Diabetes mellitus PKOS'a göre sistem tutulumu açısından çok daha yaygın bir metabolik bozukluk yaratarak savunma mekanizmalarını bozabilir. Aslında PKOS da, uzun vadede metabolik sendromda görülen ağır değişikliklere yol açabilir. Ancak bu değişiklikler daha çok obez, belirgin İD ve dislipidemisi olan kişilerde görülür. Çalışmamızdaki PKOS modelinde overde histolojik değişiklikler görülmesine karşın, metabolik bozukluğa yol açacak süre oluşmadığı için EM düzeyinde savunma amaçlı SOD artış kapasitesinin hala çalışmış olduğunu düşünüyoruz. Sonuç olarak bu iki çalışmada da OS'in EM düzeyinde etkisinin olabileceği ve bu etkinin E vitamini tedavisi ile gerileyebileceği görülmüştür. Güney ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada florid (F) ile indüklenen OS ve endometriyal düzeydeki hasara karşı E ve C vitaminin rolünü araştırmış, F tedavisine anti-oksidan eklendiğinde endometriyal MDA'nın azaldığını fakat SOD, GSH-Px ve katalaz aktivitesinin arttığını göstermiştir (101). Bu anti-oksidan vitaminler F ile indüklenen endometriyal hasara karşı histopatolojik koruma sağlamıştır. Bizim çalışmamızda PKOS ile endometriyum düzeyinde SOD artışı ve bunun E vitamini ile geri dönüşü, endometriyum'da OS yükü ile başa çıkma yöntemi olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızın II. grubunda PKOS oluşturulan sıçanlara verilen KS tedavisi ile EM düzeyindeki SOD aktivitesini araştırdık. Bu grupta KS verildiğinde SOD düzeyinin arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Grup III de E vitamini uygulaması ile SOD düzeyinin hem Grup I hem de Grup II'ye göre azaldığı gösterildi. Anti-oksidan etkinlik için verilen E vitamininin endometriyumda SOD'u azaltması, dokunun OS yükü ile karşılaşmasının azalması sonucu olabilir. Hastalarda görülen OS ve günlük uygulamada ovulasyon indüksiyonu amacıyla genellikle ilk tercih olarak başlanan KS'in bu etkiyi kuramsal olarak arttırabilmesi, OS'e bağlı olumsuz etkilerin gelişebileceğini gösterir. Endometriyum düzeyinde artan OS,

implantasyonu bozarak ovulasyon sağlandığı halde gebelik oranının düşük olmasına yol açan faktörlerden biri olabilir. Endometrium üzerindeki OS'in yarattığı bu olumsuz sürecin E vitamini desteği ile geri dönebilmesi, gerek PKOS'un kendine özgü gerekse KS'in ek katkısı ile artan ve olasılıkla implantasyon üzerine oluşan bu olumsuz etkiyi önleyebilir. Tripathi ve ark. KS'in overde H_2O_2 üretimini indüklediğini ve bir antioksidan olan melatonin ile bu H_2O_2 'nin temizlenerek sıçan yumurtalarındaki KS ile oluşan morfolojik apoptotik değişikliklere karşı koruyucu etki gösterdiğini belirtmişlerdir (6). Bu çalışma ışığında KS'in follikülogenez aşamasında OS'e neden olduğu ve gelişen yapısal değişikliklerin melatonin ile geri döndüğü, dolayısıyla tek başına ya da ek olarak yapılacak anti-oksidan tedavinin yararı olabileceği düşünülmektedir. Klorfen sitratın tek başına OS oluşturmaması, zeminde PKOS'nun üreme sisteminde geliştirdiği anormal metabolik sürece ek olarak olumsuz katkıda bulunabilir. Hem overde hem de endometriyumdaki OS, gebelik oranını düşüren nedenlerden biri olabilir. Yapılan başka bir çalışmada KS'in somatik hücrelerde OS ve apoptozisi indüklediği bulunmuştur (102). Bu çalışmadan da anlaşılabileceği gibi, KS kullanımı bedende genel bir OS artışına yol açmaktadır. Deneysel hayvan modelinde KS'in overyan foliküllerde özellikle GH'lerinde apoptozisi indüklediği ve E2 sentezini azalttığı bildirilmiştir (103). Overde ve dolaşımdaki E2 seviyesinde azalma, folliküler mikroçevrede dominant follikül seçiminde rol oynayarak hem follikülogenez aşaması hem de oosit olgunlaşması üzerine olumsuz etki gösterebilir. Gelişen follikül içinde yeterince olgunlaşamayan oosit ovule olsa da fertilizasyon ve/veya implantasyon aşamasında başarısız kalabilir. Bütün bu olumsuz süreç, OS'in üreme sistemindeki etkinliğini vurgulaması açısından önemlidir. Polikistik over sendromunda infertilite tedavisinde kullanılan ürener ve rekombinant human koryonik gonadotropinin (uhCG-rhCG) desidualize insan endometriyal stromal hücrelerinde OS yanıtı üzerine olan farklı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, rhCG'nin oksidatif hücre ölümünden koruduğu ancak uhCG de aynı etkiyi göstermediği görülmüştür (104). Bu duruma aracılık eden mekanizmalardan biri rhCG'nin Mn-SOD ekspresyonunu arttırması olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre rhCG özellikle implantasyon ve daha sonrasında gebelikte oksidatif hasara karşı maternal desiduayı korumak için tercih edilen bir ajan olarak düşünülebilir. Biz çalışmamızda hem Grup I hem de Grup II de SOD

artışının görülmesini, oluşan OS'e karşı EM düzeyinde koruma mekanizması olarak düşünüyoruz. Eklenen E vitamini ile görülen azalma, OS yükünün ortadan kaybolması ile artık daha fazla SOD üretimi gereksiniminin olmadığını göstermektedir.

Östrojenin biyolojik aktiviteleri, endometriyumda varlığı gösterilen ER α ve ER β isimli 2 nükleer reseptörle kontrol edilir. Dokudaki östrojenik aktiviteden birincil derecede sorumlu olan ER α ve ER β 'nın, PKOS'daki endometriyal ekspresyon düzeyi tartışmalıdır. Biz çalışmamızda Grup I'de endometriyal ER α ve ER β ekspresyonunu anlamlı olarak azalmış bulduk. Bu azalma KS eklendiğinde daha da belirgin olmasına karşın anlamlı değildi. Bununla birlikte E vitamini eklendiğinde hem Grup I hem de Grup II'deki ER α ve ER β ekspresyonu anlamlı olarak arttı. Endometriyum düzeyinde implantasyonda önemli rol oynayan ER α ve ER β ekspresyonunun Grup I'de azalması bu hastalarda görülen başarısız implantasyon ve hatta belki de erken gebelik kayıpları açısından önemli olabilir. Ovulasyon indüksiyonunuda ilk seçenek olan KS'in ER α ve ER β ekspresyonu üzerine azaltıcı etkisi, KS tedavisi ile %80'e ulaşan ovulasyon oranına karşın gebelik oranlarının %30-40 seviyelerinde kalmasını açıklayan nedenlerden biri olarak karşımıza çıkabilir. Çalışmamızın belki de en önemli ve göze çarpan yanı, E vitamini ile bütün bu olumsuz sürecin geri dönebileceğini göstermesidir. Ovulasyon indüksiyonunun ardından artmış implantasyon yetersizlikleri ya da oluşan gebeliğin ardından artmış abortus riski, PKOS'lu kadınlarda azalmış fertilitede anovulasyonun tek neden olmadığını, ayrıca reseptör düzeyindeki bu değişiklik sonucu endometriyal disfonksiyonun da sorumlu olabileceğini düşündürür. Vega ve ark. 4 grup (normal endometriyum, tedavisiz PKOS, hiperplazili PKOS ve endometriyal hiperplazi) hastada yaptıkları çalışmada androjen, östrojen reseptörleri ve ek düzenleyici seviyesini araştırmışlar, steroid tedavisi almayan PKOS'da endometriyal hücre çekirdeklerinde ER α protein ekspresyonunda önemli miktarda artış görmüşler, özellikle epitelyal kompartmanda ise tedavisiz PKOS'dan EM hiperplazili PKOS ve hiperplazili endometriyuma doğru giderek artan ER β gen ve protein ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir (105). Çalışmanın sonucunda PKOS'lu endometriyumun steroid etkilere yüksek duyarlılık gösterdiği, bu değişikliklerin hücre döngüsü ile ilişkili gen transkripsiyonunu da düzenleyerek, PKOS kadınlarda EM hiperplazi gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Biz

çalışmamızda endometriyumdaki ER α ve ER β seviyelerini düşük bulduk. Bu düşük reseptör seviyelerinin implantasyonu olumsuz etkileyen faktörlerden biri olduğunu düşünüyoruz. Vega'nın çalışmasında görülen reseptör artışı, belki de uzun dönemde androjen karşısında göreceli olarak düşük kalan östrojenin, endometriyumdaki etkinliğini sağlayabilmek için kompensatuar bir yanıt olarak gelişmiş olabilir. Polikistik over sendromunda görülen ovulasyon yetmezliği ve göreceli düşük östrojen düzeyine karşın ER sayısı artarak EM hiperplazi ve kanser gelişimine neden olabilir. Yapılan başka bir çalışmada da PKOS olan kadınlarda sekretuar endometriyumda steroid reseptörleri, ek düzenleyiciler ve uterin reseptivite ile ilişkili moleküller değerlendirilmiş, PKOS endometriyumunda normal endometriyuma göre ER α ve ek düzenleyiciler için protein ve mRNA seviyesi yüksek, implantasyonda görevli β 3 integrin ekspresyonu ise düşük bulunmuştur (106). Sonuç olarak araştırmacılar PKOS olan kadınların endometriyumlarında steroid hormon yanıtı yüksekliğinin β 3 integrin ekspresyonuna zarar vererek implantasyon yetmezliğine yol açtığını düşünmüşlerdir. Ancak Wang ve ark. yaptığı başka bir çalışmada, PKOS'lu kadınların implantasyon penceresindeki endometriyumunda ER α , ER β ve G proteini çiftleşmiş ER (GPR30) nin azaldığı rapor edilmiştir (107). Azalmış gebelik oranları ve yüksek spontan abortusların düşük endometrial reseptiviteye eşlik ettiğini ve reseptör ekspresyonunun düzeltilmesinin endometrial reseptiviteyi geliştirerek PKOS ile ilişkili infertiliteyi azaltmaya yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir. Bizim de çalışmamızda hem Grup I hem de Grup II'de bulduğumuz azalmış ER α ve ER β reseptörleri, endometriyumun östrojene karşı yanıtını azaltabilir ve bu hastalardaki yüksek ovulasyon başarısına karşın düşük gebelik oranları ile yüksek erken gebelik kaybını açıklayabilir. Anti-oksidan olarak E vitamini eklenen grupta endometriyum reseptivitesinin düzelmesi, infertil PKOS hastalarının tedavilerine anti-oksidan eklenmesi ile gebelik oranlarında artış sağlanabileceğini düşündürmektedir.

İnsülin direnci ve düşük düzeyde kronik inflamasyon PKOS olan kadınlarda sıklıkla görülmektedir. Obeziteden bağımsız bir şekilde PKOS'da artmış hiperglisemiye yanıt olarak mononükleer hücrelerden ROS üretimi ile oluşan OS de pro-inflamatuar duruma katkı sağlayabilir, İD ve hiperandrojenizm de bu durumu indükler (64). Hiperglisemi ve C-reaktif protein artışına bağlı olarak, PKOS'lu hastalarda inflamatuvar evrede mononükleer hücrelerin sayısının arttığı

saptanmıştır. Fizyolojik hiperglisemi mononükleer hücrelerden ROS salınımını artırır, sonrasında TNF- α salınımını aktive eder ve inflamatuvar bir transkripsiyon faktörü olan NF-Kappa β 'yi artırır. Sonuç olarak İD'nin bilinen bir mediatörü olan TNF- α ileri evrelerde artışa uğrar. Oluşan oksijen radikalleri İD'ni arttırıp, hiperandrojenizmi belirginleştiren inflamatuvar bir çevre oluşturur (30,108,109). Ayrıca polimorfonükleer hücrelerin dönüşünde azalma, IL6, TNF α ve adhezyon molekülleri (vasküler hücre adhezyon molekülü1 ve E-selektin) ile adhezyonunda artma görülür. Elde edilen kanıtlar PKOS'da İR ile inflamatuvar durumun ilişkili olduğunu ve lökosit endotel etkileşimini indüklediğini gösterir (94). Üreme sisteminde önemli görevleri olan ve eNOS ile iNOS tarafından L-argininin L-strülinine dönüşümü sırasında sentezlenen nitrik oksit (NO) oldukça reaktif bir serbest radikaldir. Diğer inflamatuvar mediatörlerle birlikte protein, karbonhidrat, nükleotid ve lipidlere hasar vererek doku ve hücrelerde düşük dereceli steril inflamasyona neden olur (71). Uterusta bulunduğu gösterilen NO üreme sisteminin biyolojik ve fizyolojik olaylarında önemli bir düzenleyicidir (110). Düşük seviyede NO over fonksiyonları ve implantasyonda önemlidir ve tubal kasların gevşemesini sağlar (111). İndüklenebilir NOS desidual stromal hücrelerde tespit edilmiş ve aynı zamanda gebeliğin ilk 12 haftasında dokularda ekspresyonu gösterilmiştir. Dolayısıyla NO endometriyumun desidualizasyonunda ve implantasyon için hazırlanmasında rol oynar (55,76). Patolojik durumda NO üretimini düzenleyen iNOS, birçok organda yalnızca immünolojik uyaranlara yanıt olarak eksprese edilir. Yüksek seviyedeki NO'nin sperm hareketine zararlı etkileri vardır, embriyotoksik olduğu ve implantasyonu önlediği de gösterilmiştir (112,113). Mononükleer fagositlerde (monosit ve makrofajlar) bulunan iNOS, IL-1 ve TNF α gibi sitokinler ve lipopolisakkaritler tarafından aktive edilerek büyük miktarda NO üretebilir (70). Polikistik over sendromu gibi inflamatuvar sürecin oldukça belirgin olduğu bir durumda salgılanan inflamatuvar medyatörler ve/veya İD ile ilişkili artan TNF α gibi faktörler, iNOS aracılığı ile artan NO düzeyinden sorumludur. Çalışmamızda hem Grup I hem de Grup II'de endometrium düzeyinde iNOS aktivitesinde anlamlı artış bulduk. Bu artış sonucu NO seviyesinin fizyolojik sınırlarının üstüne taşınması, NO'nin endometrium üzerine toksik etki göstermesine neden olabilir. Makrofajlar mikroorganizmaların invazyonuna karşı bir anti-mikrobiyal ajan olarak NO üretirler (69). Artan NO anormal hücreler ve patojenleri öldürür fakat özellikle iNOS'un

inatçı bir şekilde ekspresyonu normal doku ve hücrelere de zarar verebilir (71). Polikistik over sendromu ovulasyon düzensizliği yanında ER α ve ER β 'yı azaltıp İNOS'u arttırarak NO'in toksik seviyelere ulaşmasına neden olup implantasyonu bozabilir. Hastalarda OS ve/veya inflamasyonun varlığının tespit edilmesi durumunda gerek anti-oksidan gerekse inflamasyonu önleyici bir ön tedavi aşaması, bu kişilerde artan gebelik oranı sağlayabilir. Teka ve GH'leri ile folliküler gelişim süresince oosit yüzeyinde eNOS ekspresyonu, insan endometriyum ve endometriyal damarlarda ise hem iNOS hem de eNOS ekspresyonu gösterilmiştir (114). Anti-progestasyonel bir ajan olan mifepristonun (RU-486) implantasyon fazı süresince endometriyumda eNOS ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmış, mifepristonun endometriyal glanduler epitelde eNOS ekspresyonunu inhibe ettiği ancak endotelyal eNOS'u etkilemediği gösterilmiştir. Mifepriston ile eNOS ekspresyonunun azalması implantasyon aşamasında endometriyal reseptivitede bu enzimin önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. (115). Bizim çalışmamızda eNOS, Grup I ve Grup II'de anlamlı olarak azalmıştır. Polikistik over sendromunda oluşan inflamasyon ve KS ile bu sürecin bazen aynı şekilde bazen de artarak sürmesi, EM düzeyinde azalan eNOS aktivitesine neden olabilir. Özellikle KS ile ovulasyon indüksiyonu yapılan hastalarda progesteron ile yapılacak luteal faz desteği belki de bu mekanizma ile implantasyonu destekleyebilir. Dolayısı ile açıklanamayan infertilite grubunda yapılan IUI'larda progesteron ile luteal faz desteği verilmese bile, PKOS'da yapılan IUI'larda progesteron desteği sağlanarak eNOS aracılığı ile oluşabilen bu olumsuz etki engellenebilir. Endometriyal NOS ekspresyonu üzerine progesteronun etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, progesteronun öncelikle insan endometriyal hücrelerinde iNOS ve eNOS mRNA uyarısı yaptığı ve progesteronun iNOS ve eNOS üzerine etkilerinin RU486 tarafından tamamen bloke olduğu gösterilmiştir (116). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada da, seks steroidlerinin NOS ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmış, progesteronun eNOS ve iNOS ekspresyonunu, E2'nin ise yalnızca iNOS ekspresyonunu artırdığı görülmüş ve E2 ile progesteronun NOS ekspresyonu ve aktivitesinin gebelik süresince ve implantasyonla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (110). Biz çalışmamızda Grup I ve Grup II'de iNOS ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı ancak eNOS'un azaldığını gördük. Grup I ve II'de gördüğümüz düşük eNOS düzeyi deneysel PKOS sonucu görülen anovulasyon ve

azalmış progesteron seviyesine bağlı olabilir. Progesterona göre göreceli olarak artmış östradiol yüksek iNOS düzeyini açıklayabilir. Rhesus maymunlarında blastokist implantasyonunda NO rolünün araştırıldığı başka bir çalışmada ise plasentada sitotrofoblastik hücrelerde NOS'un tüm 3 izoformunun da eksprese edildiği, NO'in blastokist implantasyonunda önemli rol oynadığı görülmüştür (117). Progesteronun eNOS'u artırıcı etkisinin implantasyonda rolü olduğu düşünüldüğünde, PKOS'da eNOS'un azalması ve bu azlığın KS uyarısı alan grupta da sürmesi bu hastalarda implantasyon başarısızlığını açıklayan nedenlerden biri olarak düşünülebilir. Her iki grupta iNOS'un artışı ise dokularda gerek Grup I'de gerekse Grup II'de oluşan olumsuz inflamatuvar sürece bir yanıt olarak ve/veya östrojenin progesterona göre baskın kalmasından geliştiğini düşünüyoruz. Özellikle PKOS hastalarında yapılan ovulasyon indüksiyonu ile inflamatuvar sürecin arttığını kabul edersek, IUI sonrasında yapılacak luteal faz desteğinin önemi artmaktadır. Progesteron desteği ile artacak eNOS, implantasyonda desidual damarlarda gerekli değişikliğe yol açarak embryonun sağlıklı yerleşimine yardımcı olabilir. Başka bir çalışmada erken gebelik kaybında maternal desidual ara yüzde adrenomedullin ile NOS araştırılmış ve plazma konsantrasyonları kontrol grubu ile benzer bulunmasına karşın, fetomaternal arayüzdeki trofoblast hücrelerinde hem iNOS hem de adrenomedullin önemli miktarda düşük bulunmuştur. Bizim Grup I ve Grup II'de gördüğümüz iNOS artışı endometriyal düzeyde implantasyona hazırlık ve gebeliğin devamını sağlamak amacıyla olabilir. Erken gebelik kaybı ile iNOS arasında bir neden-sonuç ilişkisi varsa, gebeliğin sürmesi için iNOS artışı olumlu bir etki yaratabilir. Kısıraklarda yapılan bir çalışmada östrojen döngüsü süresince uterin kan akımı, periferik seks steroidleri, endometriyal östrojen reseptör ekspresyonu ve NOS arasındaki ilişki değerlendirilmiş, uterus NOS sisteminde özellikle eNOS'un uterus kan akımında önemli olduğu, eNOS artışının özellikle midluteal ve sekretuar fazda en yüksek seviyeye çıktığı gösterilmiştir (118). Çalışmamızda Grup I ve Grup II'de bulduğumuz düşük eNOS seviyesi uterus kan akımı üzerine olumsuz etki göstererek bu hastalardaki ovulasyon oranı ile gebelik oranı arasındaki uyumsuzluğu açıklamaya yardımcı olabilir ve bu azalma implantasyon aşaması ile erken dönem gebelik kayıplarında rol oynayabilir. Han ve ark. östrojenin insan endometriumunda NOS izoformları üstüne etkisini araştırmış ve E2'nin doza ve

zamana bağımlı olarak hem eNOS mRNA ve proteinini hem de iNOS proteinini arttırdığını, progesteronun ise fizyolojik konsantrasyonda E2'nin eNOS üzerindeki etkisini yükselttiğini göstermişlerdir (119). Çalışmamızda düşük bulunan eNOS seviyesinin luteal faz döneminde progesteron desteği ile artması ve östrojenin bu etkiyi arttırma yönündeki katkısı özellikle PKOS'lu infertil kadınlarda önem kazanmaktadır.

SONUÇLAR

Polikistik over sendromu adet düzensizliği, infertilite ve kozmetik sorunların yanında uzun vadede endokrinolojik ve metabolik bozukluklara yol açabilir. Oksidatif stres ve inflamatuvar değişiklikler İD'nin yanında sendromun patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Oluşan bu olumsuz süreç özellikle infertil olgularda gerek follikülogenez gerekse implantasyon aşamasında başarısızlığa neden olabilir. Oksidatif stresin endometriyumda belirgin etkisinin görüldüğü PKOS'da, östrojen reseptörlerinin azalması eNOS ve iNOS değişiklikleri ve genellikle ilk tercih olarak yapılan KS tedavisinde bu belirtilerin belirginleşmesi endometriyumdaki implantasyon başarısızlığını açıklayabilir. Tüm bu değişikliklerin anti-oksidan E vitamini ile geri dönüşü KS ile indüksiyon yapılan hastalara anti-oksidan ajan eklenmesi ile implantasyon oranını arttırabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Joo Yeon Lee¹, Chin-Kun Baw¹, Sajal Gupta¹, Nabil Aziz² and Ashok Agarwal^{1,*}, Role of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome; Current Women's Health Reviews, 2010, 6, 96-107
2. Fatma Ferda Verit a Ozcan Erel bOxidative Stress in Nonobese Women with Polycystic Ovary Syndrome: Correlations with Endocrine and Screening Parameters Turkey Gynecol Obstet Invest 2008;65:233–239
3. Naci Kemal Kuscu, Ahmet Var, Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non-obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome, Turkey ; Acta Obstetricia et Gynecologica. 2009; 88: 612617
4. Roy Homburg , Clomiphene citrate end of an era? a mini-review, Division of Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and GynaecologyThe Netherlands Human Reproduction Vol.20, No.8 pp. 2043–2051, 2005
5. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. Fertil Steril 2002;77:91-7.
6. Tripathi a, Karuppanan V. PremKumar a, Ashutosh N. Pandey a, Sabana Khatun b, Surabhi Kirti Mishra b, Tulsidas G. Shrivastav b, Shail K. Chaube a, Melatonin protects against clomiphene citrate-induced generation of hydrogen peroxide and morphological apoptotic changes in rat eggs Anima European Journal of Pharmacology 667 (2011) 419–424
7. A Makker, F W Bansode, V M L Srivastava¹ and M M Singh, Journal of Endocrinology (2006) 188, 121–134 Antioxidant defense system during endometrial receptivity in the guinea pig: effect of ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator;
8. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome, Fertil Steril 2004, 81:19-25
9. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar- Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(11):4237-4245.

10. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF: The Androgen Excess and PKOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report, *Fertil Steril* 2009, 91:456-488
11. Azziz R: Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature, *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91:781-785
12. Stein IF, Leventhal ML: Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935;29:181.
13. McArthur JW, Ingersoll Fm, Worcester J. The urinary excretion of interstitial-cell and follicle-stimulating hormone activity by women with diseases of the reproductive system *J Clin Endocrinol Metab.*1958;18(11):1202-1215.
14. Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gorden P, Martin MM, Roth J. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. *N Engl J Med.* 1976;294(14):739-745.
15. Burghen G.A, Givens J.R, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovary disease. *J Clin Endocrinol Metab.*1980;50:113-116.
16. Yen S.S. The polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1980;12:177-207.
17. Swanson M, Sauerbrei EE, Cooperberg PL: Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries, *J Clin Ultrasound* 1981, 9:219-222
18. Adams J, Polson DW, Franks S: Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism, *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986, 293:355-359
19. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PKOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PKOS Consensus Workshop Group Received July 1, 2011; accepted September 13, 2011; published online December 6, 2011
20. The Rotterdam ESHRE/ASRM –Sponsored PKOS concensus workshop group. Revise 2003 concensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2004;19: 41-47
21. .Franks S, Gharani N, Waterworth D, et al: The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum reprod* 12:2641, 1997
22. Hayes FJ, Taylor AE, Martin KA, et al: Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine and androgen Dynamics. *J Clin Endocrinol metab* 83:2243, 1998
23. Speroff L, Fritz MA. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* pp. 465-491, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005.
24. -Ehrmann DA. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 1223-3.
25. Hughesdon PE: Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis", *Obstet Gynecol Surv* 1982, 37:59-77
26. Taylor AE. Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27(4): 877-902.

27. Harwood K, Vuguin P, DiMartino-Nardi J. Current Approaches to the Diagnosis and Treatment of Polycystic Ovarian Syndrome in Youth. *Horm Res.* 2007;68(5): 209-217.
28. Goudas VT, Dumesic DA: Polycystic ovary syndrome, *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997, 26:893-912
29. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, et al: Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 41 :1257, 1992
30. Ashok Agarwal, Anamar Aponte-Mellado, Beena J Premkumar, Amani Shaman, Sajal Gupta; The effects of oxidative stress on female reproduction: a review *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012, 10 :49
31. Huang A, Brennan K, Azziz R: Prevalence of hyperandrogenemia in the polycystic ovary syndrome diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria, *Fertil Steril* 2010, 93 :1938-1941
32. Acien P, Quereda F, Matallín P, Villarroja E, Lopez-Fernandez JA, Acien M, Mauri M, Alfayate R. Insulin, androgens, and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. *Fertil Steril.* 1999;72(1):32-40.
33. Kelsey E. S. Salley, Edmond P. Wickham, Kai I. Cheang, Paulina A. Essah, Nicole W. Karjane, and John E. Nestler: Glucose Intolerance in Polycystic Ovary Syndrome—A Position Statement of the Androgen Excess Society; *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(12):4546–4556 2007-1549
34. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A: Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome, *Diabetes* 1989, 38:1165-1174
35. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A 1999 Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 22: 920–924
36. Garber AJ. The metabolic syndrome. *Med Clin North Am* 2004; 88(4): 837-46.
37. Apridonidze T, Essah PA, Luorno MJ, Nestler JE: Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90:1929-1935
38. Goldzieher JW, Gren JA. The polycystic ovary. I. Clinical and histologic features. *J Clin Endocrinol Metab* 50:113-116, 1962.
39. Motta AB The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome. PhD, Director of the Laboratory of Ovarian Physio-pathology, Center of Pharmacological and Botanical Studies, School of Medicine, University of Buenos Aires, Argentina. *Curr Pharm Des.* 2012;18(17):2482-91
40. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, et al: Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51:2734, 2002
41. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.* 2001;22(5):657-674.

42. Jason Franasiak,¹ Steven L. Young,¹ Christopher D. Williams,² and Lisa M. Pastore³ Longitudinal Anti-Müllerian Hormone in Women with Polycystic Ovary Syndrome: An Acupuncture Randomized Clinical Trial; Received 1 April 2012; Accepted 13 June 2012 Academic Editor: Gerhard Litscher
43. Nam Menke M, Strauss JF 3rd. Genetics of polycystic ovarian syndrome. Clin Obstet Gynecol 2007; 50: 188–204.
44. Farquhar C, Johnson N Understanding polycystic ovary syndrome www.bpac.org.nz keyword: PKOS.
45. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, Zapaniti ED, Bartzis MI: A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile, J Clin Endocrinol Metab 1999, 84:4006-4011
46. Elting MW, Kersen TJM, Rekers-Mombarg LTM: Woman with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when aging. Human Reprod 15,24,2000
47. Costello MF, Misso ML, Wong J, Hart R, Rombauts L, Melder A, Norman RJ, Teede HJ. The treatment of infertility in polycystic ovary syndrome: a brief update. Australia. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2012 May 28. doi: 10.1111/j.1479-828X.2012.01448.x.
48. Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. Hum Reprod Update 2011; 17(1): 17-33.
49. -Cruz Jr. PD, Hud Jr. JA: Excess insulin binding to insulin-like growth factor receptors: proposed mechanism for acanthosis nigricans. J Invest Dermatol 98(suppl):82S, 1992
50. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC: PKOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors, BJOG 2006, 113:1210-1217
51. Fearnley EJ, Marquart L, Spurdle AB, Weinstein P, Webb PM. Australian Ovarian Cancer Study Group and Australian National Endometrial Cancer Study Group. Polycystic ovary syndrome increases the risk of endometrial cancer in women aged less than 50 years: an Australian case-control study. Cancer Causes Control 2010; 21(12): 2303-8.
52. Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S: Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review, Reprod Biomed Online 2009, 19:398-405
53. Legro RS, Kusanman AR, Dunaif A 2001 Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. Am J Med 111:607–613
54. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Lobo R, Norman RJ, Talbott E, Dumesic DA. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PKOS) Society, USA. 2010 May;95(5):2038-49. Epub 2010 Apr 7.
55. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK: Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol 2005; 3: 28.

56. -Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, Sasano H: Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 1999; 72: 720–726.
57. Sasaki J, Sato EF, Nomura T, Mori H, Watanabe S, Kanda S, Watanabe H, Utsumi K, Inoue M: Detection of manganese superoxide dismutase mRNA in the theca interna cells of rat ovary during the ovulatory process by in situ hybridization. *Histochemistry* 1994; 102: 173–176.
58. Tarin JJ, Brines J, Cano A: Antioxidants may protect against infertility. *Hum Reprod* 1998; 13: 1415–1416.
59. Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M: Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2001; 34: 407–413.
60. Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M: Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril* 2003; 80: 123–127.
61. Dincer Y, Akcay T, Erdem T, Saygili EI, Gundogdu S: DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65: 721–728.
62. Menon V, Ram M, Dorn J, Armstrong D, Muti P, Freudenheim JL, Browne R, Schunemann H, Trevisan M: Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabet Med* 2004; 21: 1346–1352.
63. Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F: Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabète Métab* 1992; 18: 264–271.
64. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP: Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 336–340.
65. Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S: Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 109–116.
66. Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE: Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction* 2001; 122: 487–495.
67. Ojala M, Erkkilä K, Tuuri T, Sjöberg J, Suomalainen L, Suikkari AM, Pentikainen V, Dunkel L: Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 228–236.
68. Halliwell B, Cross CE, Gutteridge JMC: Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598–620.
69. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK: Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 3–24.

70. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW: Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2000, 17:222-228.
71. -Dong M, Shi Y, Cheng Q, Hao M: Increased nitric oxide in peritoneal fluid from women with idiopathic infertility and endometriosis. *J Reprod Med* 2001, 46:887-891.
72. Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya Kitabında*. Gürdöl F, Ademoğlu E (editörler). Nobel Tıp Kitapevleri Birinci baskı 2006: P. 829-835.
73. Smith C, Marks AD, Lieberman M. Oksijen toksisitesi ve serbest radikal örsentisi. Bölüm 24. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım Kitabında. İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A (çeviri editörleri). İkinci baskı. Güneş Tıp Kitabevleri. 2007: P.439-57.
74. Anderson ME, Meister A. Glutathione moesters. *J Anal Biochem*. 1989;183:16-20.
75. .Shklar G., Shwartz J., Trikler D., Reid S.: Prevention of experimental cancer and immunostimulation by vitamin E. *J. Oral. Pathol. Med*. 1990; 19, 60-64.
76. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R., 2005. Oxidative stress and its implications in female infertility a clinician's perspective. *Reprod. Biomed. Online* 11, 641–650.
77. Tripathi, A., Khatun, S., Pandey, A.N., Mishra, S.K., Chaube, R., Shrivastava, T.G., Chaube, S.K., 2009. Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocyte at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. *Free. Radic. Res*. 43, 287–294.
78. Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R.J., Sugino, N., 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal Res*. 44,
79. El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y: Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod* 1999, 5:720-725
80. Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Tamura H, Ono M, Nakata M, Nakamura Y, Ogino K, Uda T, Kato H: Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum Reprod* 1996, 11:1073-1078.
81. Use of clomiphene citrate in women. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril* 2003; 80: 1302-8.
82. Phipps WR. Polycystic ovary syndrome an ovulation induction. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001;28: 165- 82.
83. Çolgar U, *Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite*. İstanbul Medikal Yayıncılık 1. Baskı 2006.
84. Kousta E, White DM, Franks S. Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Hum Reprod Update*. 1997;3(4):359-65.
85. Wu CH, Winkel CA. The effect of therapy initiation day on clomiphene citrate therapy. *Fertil Steril* 1989; 52: 564- 568.
86. Rostami-Hodjegan A, Lennard MS, Tucker GT and Ledger WL (2004) Monitoring plasma concentrations to individualize treatment with clomiphene citrate. *Fertil Steril* 81,1187–1193.

87. -Dickey RP, Taylor SN, Curole DN, Rye PH, Lu PY and Pyrzak R (1997) Relationship of clomiphene dose and patient weight to successful treatment. *Hum Reprod* 12,449–453.
88. Haritha S. Rajagopalan G. Follicular growth, endometrial thickness, and serum estradiol levels in spontaneous and clomiphene citrate-induced cycles. *Int J Gynecol Obstet* 2003;81:287-92.
89. Dickey RP, Holtkamp DE. Development, pharmacology and clinical experience with clomiphene citrate. *Hum Reprod Update* 1996;2:483- 506.
90. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD and Fauser BC (1998) Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 83,2361–2365.
91. Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W: Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet* 2003, 361:1810–1812.
92. Roy Homburg* Review Open Access The management of infertility associated with polycystic ovary syndrome; Published: 14 November 2003 *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003, 1:109
93. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Anyaoku V, Reed MJ, Franks S: Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1992, 36:1105-1111.
94. Victor VM, Rocha M, Banuls C, Alvarez A, de Pablo C, Sanchez-Serrano M, Gomez M, Hernandez-Mijares A: Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96:3115–3122.
95. Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Kasapović J, Pajović SB. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrium of patients with polyps, myoma, hyperplasia and adenocarcinoma. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Serbia Dec 23;7:149.
96. Salama SA, Kamel M, Awad M, Nasser AH, Al-Hendy A, Botting S, Arrastia C. Catecholestrogens induce oxidative stress and malignant transformation in human endometrial glandular cells: protective effect of catechol-O-methyltransferase. *Int J Cancer*. USA 2008 Sep 15;123(6):1246-54.
97. Bifulco G, Miele C, Di Jeso B, Beguinot F, Nappi C, Di Carlo C, Capuozzo S, Terrazzano G, Insabato L, Ulianich L Endoplasmic reticulum stress is activated in endometrial adenocarcinoma. *Italy Gynecol Oncol*. 2012 Apr;125(1):220-5
98. .Kajihara T, Brosens JJ, Ishihara O. The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy *Med Mol Morphol Japan*. 2013 Feb 5.
99. Kajihara T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Androgen signaling in decidualizing human endometrial stromal cells enhances resistance to oxidative stress. *Japan. Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):185-91

100. Güney M. Selenium-vitamin E combination modulates endometrial lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. *Biol Trace Elem Res.* 2012 Nov;149(2):234-40
101. Guney M, Oral B, Demirin H, Karahan N, Mungan T, Delibas N. Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007 May-Jun;34(5-6):467-74.
102. Hayon, T., Bvilansky, A., Oriev, L., Nathan, I., 1999. Non-Steroidal antiestrogens induce apoptosis in HL60 and MOLT3 leukemic cells: involvement of reactive oxygen radicals and protein kinase C. *Anticancer. Res.* 19, 2089–2093.
103. Chaube, S.K., Prasad, P.V., Thakur, S.C., Srivastav, T.G., 2005. Estradiol protects clomiphene citrate induced apoptosis in rat ovarian follicles and superovulated cumulus oocyte complexes. *Fertil. Steril.* 84, 1163–1172.
104. Kajihara T, Tochigi H, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cells. *Placenta.* 2011 Aug;32(8):592-7
105. Villavicencio A, Bacallao K, Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol.* 2006 Oct;103(1):307-14
106. Quezada S, Avellaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome, *Fertil Steril.* 2006 Apr;85(4):1017-26.
107. Wang A, Ji L, Shang W, Li M, Chen L, White RE, Han G. Expression of GPR30, ER α and ER β in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol.* 2011 Apr;27(4):251-5
108. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP: Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91:336–340.
109. Costello MF, Shrestha B, Eden J, Johnson NP, Sjoblom P: Metformin versus oral contraceptive pill in polycystic ovary syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2007, 22:1200–1209.
110. Ogando D, Farina M, Ribeiro ML, Perez Martinez S, Cella M, Rettori V, Franchi A, Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus. *Reprod Fertil Dev.* 2003;15(5):269-74.
111. Ekerhovd E, Brannstrom M, Alexandersson M, Norstrom A: Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Hum Reprod* 1997, 12:301-305.

112. . Lee TH, Wu MY, Chen MJ, Chao KH, Ho HN, Yang YS: Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2004, 82:126-131.
113. Oztezcan S, Turkoglu UM, Kervancioglu E, Kocak T, Kocak-Toker N, Aykac-Toker G: In vitro effects of peroxynitrite on human spermatozoa. *Andrologia* 1999, 31:195-198.
114. Tseng L, Zhang J, Peresleni T, Goligorsky MS: Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial glands of human endometrium. *J Soc Gynecol Investig* 1996, 3:33-38.,
115. Sun X, Qiu X, Gemzell-Danielsson K: Effects of mifepristone on expression of endothelial nitric oxide synthase in human endometrium during the implantation phase. *Fertil Steril* 2003, 80:1454-60.
116. Khorram O, Han G. Influence of progesterone on endometrial nitric oxide synthase expression. *USA. Fertil Steril*. 2009 May;91(5 Suppl):2157-62.,
117. Sengupta J, Dhawan L, Lalitkumar PG, Ghosh D Nitric oxide in blastocyst implantation in the rhesus monkey *Reproduction India*. 2005 Sep;130(3):321-32
118. Honnens A, Weisser S, Welter H, Einspanier R, Bollwein H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. *J Reprod Dev*. 2011 Feb;57(1):43-8.
119. Han G, Magee T, Khorram O. Regulation of nitric oxide synthase isoforms by estrogen in the human endometrium. *Fertil Steril*. 2005 Oct;84 Suppl 2:1220-7.

