

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA D VİTAMİNİNİN
OVER ÜZERİNE ETKİLERİNİN IŞIK VE ELEKTRON
MİKROSKOBİK DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Latife Seyran ÇELİK

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Ufuk Özgü METE**

ADANA-2016

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA D VİTAMİNİNİN
OVER ÜZERİNE ETKİLERİNİN IŞIK VE ELEKTRON
MİKROSKOBİK DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Latife Seyran ÇELİK

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Ufuk Özgü METE**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL20142778'nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

ADANA-2016

KABUL VE ONAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

“Deneyssel Polikistik Over Sendromu’nda D Vitamininin Over Üzerine Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 11 / 01 / 2016

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Ufuk Ö. METE
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Sait POLAT
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. S. Necat YILMAZ
Mersin Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez konumun seçilmesi, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde bana her zaman destek olan ve eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tez danışmanım Prof. Dr. Ufuk Özgü Mete'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca gerek tez çalışmalarım sırasında gerekse eğitim aldığım süre boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sait Polat'a ve anabilim dalımızın bütün öğretim üyelerine saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasındaki katkı ve yardımları için Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülşah Seydaoğlu'na, Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Abdullah Tuli ve Uz. Dr. Ebru Dünder Yenilmez'e, tezimin tüm aşamalarında yardımını esirgemeyen Uzm. Dr. Yurdun Kuyucu'ya, deneylerim sırasında yardımcı olan TIPDAM sorumlusu Doç. Dr. Kenan Dağlıoğlu ve personeline, çalışma arkadaşım Fulya Furucu'ya, anabilim dalımız teknisyenleri Adile Sarıcalar, Nevriz Dural ve Zuhal Özkurt'a teşekkür ederim.

Uzun bir eğitim süresini beraber paylaştığım, dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, Güven Özdemir'e, yaşamımın her alanında bana destek olan, hayatıma yön vermem konusunda yardım ve özverilerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Neyran Çelik'e, varlıklarıyla şanslı hissetmemi sağlayan kardeşlerim Cansu ve Emre'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yük. Lis. Öğr. Latife Çelik

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sıçanlarda Over Histolojisi	3
2.1.1. Ovaryan Foliküller	3
2.1.1.1. Primordiyal Foliküller	3
2.1.1.2. Gelişen Foliküller	4
2.1.1.3. Folikülogenez	6
2.1.1.4. Ovulasyon	8
2.1.1.5. Korpus Luteum	8
2.1.1.6. Atretik Foliküller	9
2.1.1.7. İnsterstisyel Hücreler	10
2.2 Sıçanlarda Over Gelişimi	11
2.3. Sıçanlarda Östrus Siklus	12
2.4. Polikistik Over Sendromu	13
2.5. D Vitamini	17
3.GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı	23
3.2. Deneyin Yapılışı	23
3.3. Kan Örneklerinin Alınışı	24
3.4. Overlerin Eksizyonu	24
3.5. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi	25

3.6. Elektron Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi	26
3.7. İstatistiksel Analizler	27
4.BULGULAR	28
4.1. Hayvan Ağırlıkları	28
4.2. Biyokimyasal Analizler	28
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular	33
4.3.1. 1.Grup	34
4.3.2. 2.Grup	39
4.3.3. 3.Grup	43
4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular	48
4.4.1. 1.Grup	48
4.4.2. 2.Grup	54
4.4.3. 3.Grup	63
5.TARTIŞMA	68
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	85

ÇİZELGE DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. Işık mikroskopik doku takip işlemi.	25
Çizelge 2. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon, şeffaflandırma ve immersiyon işlemi.	26
Çizelge 3. Gömme materyalinin hazırlanışı.	27
Çizelge 4. Deneyin başlangıcı ve bitiminde kontrol ve deney grubundaki sıçanların ağırlık (gr) ortalamaları ve standart sapmaları.	28
Çizelge 5. Gruplara göre FSH, LH, LH/FSH ve testosteron dağılımları.	30
Çizelge 6. Gruplara göre primer, sekonder, tersiyer, atretik, kistik foliküller ve korpus luteum dağılımları.	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa No:
Şekil 1.	D vitamininin kadın fertilitesi üzerine etkileri.	19
Şekil 2.	D vitamini eksikliği ve PKOS patogenezindeki rolü.	21
Şekil 3.	Gruplara ait serum FSH değerleri.	31
Şekil 4.	Gruplara ait serum LH değerleri.	31
Şekil 5.	Gruplara ait serum testosteron değerleri.	32
Şekil 6.	Gruplara ait serum LH/FSH değerleri.	32
Şekil 7.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin.	36
Şekil 8.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin.	37
Şekil 9.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin.	38
Şekil 10.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	40
Şekil 11.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	41
Şekil 12.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	42
Şekil 13.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	43
Şekil 14.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	44
Şekil 15.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	45
Şekil 16.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	46
Şekil 17.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	47
Şekil 18.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	50
Şekil 19.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	50
Şekil 20.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	51

Şekil 21.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	51
Şekil 22.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	52
Şekil 23.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	52
Şekil 24.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	53
Şekil 25.	1. Grup. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	53
Şekil 26.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	56
Şekil 27.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	57
Şekil 28.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	57
Şekil 29.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	58
Şekil 30.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	58
Şekil 31.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	59
Şekil 32.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	59
Şekil 33.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	60
Şekil 34.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	60
Şekil 35.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	61
Şekil 36.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	61
Şekil 37.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	62
Şekil 38.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	62
Şekil 39.	2. Grup. PKOS grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	63

Şekil 40.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	65
Şekil 41.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	65
Şekil 42.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	66
Şekil 43.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	66
Şekil 44.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	67
Şekil 45.	3. Grup. Tedavi grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	67



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMH	: Anti Müllerian Hormon
AMHR II	: Anti Müllerian Hormon Reseptörü II
BMI	: Vücut Kitle Endeksi
Connexin43	: CX43
DETAUM	: Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHT	: Dihidrotestosteron
ESHRE	: European Society for Human Reproduction and Embryology
EV	: Estradiol Valerate
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
FSHR	: Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü
GER	: Granüler Endoplazmik Retikulum
IGF – 1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü – 1
IVF	: İn Vitro Fertilization
LH	: Luteinizan Hormon
NIH	: National Institutes of Health
PKOS	: Polikistik Over Sendromu
PTH	: Paratiroid Hormon
SHGB	: Sex Hormone Binding Globulin
VDR	: D Vitamini Reseptörleri
25(OHD)	: 25 – Hidroksivitamin D

ÖZET

Deneyisel Polikistik Over Sendromunda D Vitamininin Over Üzerine Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

Polikistik Over Sendromu (PKOS), hiperandrojenizm, oligo veya anovulasyon ve polikistik overler ile karakterize endokrin bir bozukluktur. Bugüne kadar patogenezi tam olarak aydınlatılamayan PKOS'nda semptomlara göre değişen farklı tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır. Son zamanlarda D vitamini tedavisi PKOS'lu kadınlarda semptomların giderilmesi için yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve daha çok hormonal ve metabolik düzensizlikler üzerine olan etkisi klinik ve deneysel çalışmaların konusu olmuştur. Ancak D vitamininin PKOS'lu over dokularında histolojik yapı üzerine etkilerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, Dehidroepiandrosteron (DHEA) ile oluşturulmuş PKOS sıçan modelinde uygulanan D vitamini tedavisinin over yapısı üzerine olan etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, 24 adet prepubertal dişi sıçan kullanıldı. 21 günlük sıçanlardan her grupta 8 hayvan olacak şekilde 3 grup oluşturuldu. 1. gruptaki hayvanlara subkutan 0,2 ml susam yağı+0,01 ml %95 etanol enjekte edilerek kontrol grubu olarak değerlendirildi. 2.gruptaki hayvanlara her gün subkutan 6mg/kg DHEA enjeksiyonu ile PKOS oluşturuldu. 3.gruptaki hayvanlara ise 6 mg/kg/gün DHEA ile PKOS oluşturulurken aynı zamanda haftada bir 120ng/100gr 1,25(OH)2D3 tedavisi uygulandı. 28 günün sonunda anestezi altındaki sıçanlardan alınan kan örneklerinde FSH, LH ve testosteron seviyeleri ölçüldü. Alınan over dokuları ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için rutin doku hazırlama yöntemlerine uygun olarak hazırlandı. Işık mikroskopik değerlendirme ve folikül sayımı için hazırlanan dokular Olympus BX53 ışık mikroskopuyla incelendi. İnce yapı değerlendirmesi için ise dokular JEOL-JEM 1400 transmisyon elektron mikroskobu ile incelenerek fotoğraflandı.

Çalışmamızda; serum FSH, LH değerleri, LH/FSH oranı ve testosteron düzeyi PKOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterirken; tedavi grubunda FSH, LH değerleri, LH/FSH oranı ve testosteron düzeyi PKOS grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Işık mikroskopik olarak PKOS grubunda atretik ve kistik folikül sayısında artma görülürken, elektron mikroskopta granüloza tabakası belirgin şekilde incelmış ve teka tabakası kalınlaşmış kistik folikül yapıları ve interstisyel hücrelerde lipid birikimi izlendi. Vitamin D tedavisi sonucu atretik ve kistik foliküller sayıca azalmıştı.

Sonuç olarak; D vitamininin PKOS'nda gözlenen hormonal ve yapısal değişiklikler üzerine olumlu etkileri bulunduğu ancak uzun süre kullanımının daha yararlı olabileceği kanaatine varıldı. Uzun süreli D vitamini tedavisinin etkilerini gösteren çalışmaların yapılması ve buna yönelik bilgilerin artmasıyla PKOS'na sahip hastalar için bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilebileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: PKOS, DHEA, D vitamini, transmisyon elektron mikroskop, ışık mikroskop.

ABSTRACT

Effects of vitamin D on ovary in experimental polycystic ovary syndrome: A light and electron microscobic study

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrine disorder characterized by hyperandrogenism, oligo or anovulation and polycystic ovarian morphology. So far, the pathogenesis of PCOS are not fully understood and different treatment approaches are applied according to the symptoms. Recently, vitamin D treatment have been widely used for reducing the symptoms of PCOS and effects of this treatment on hormonal and metabolic abnormalities are heavily researched in clinical and experimental studies. However, there is no light and electron microscopic study in the literature which exhibits the effects of vitamin D on the ovarian tissues of patients with PCOS. In our study; we aimed to investigate the effects of vitamin D treatment on ovary tissues in a rat model of PCOS with DHEA administration using light and electron microscopy techniques.

In our study, 21 days old 24 female prepubertal rats were used and divided into 3 groups each consisted of 8 animals. In group 1, 0.2 ml sesame oil + 0.01 ml 95% ethanol was injected subcutaneously and used as control group. In group 2, PCOS was created by the injection of 6 mg / kg DHEA/day subcutaneously. In group 3, PCOS was created by 6 mg / kg / day DHEA and at the same time 120ng / 100g 1,25 (OH) 2D3/ treatment was performed weekly. At the end of the 28th day, the blood samples were collected from rat under anesthesia and FSH, LH and testosterone levels were measured. The ovarian tissue were obtained for light and electron microscopic examinations and prepared according to the routine tissue preparation methods. Slides were examined by Olympus BX53 microscope for light microscopic evaluation and follicle counting. Tissue samples were analyzed with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope for ultrastructural evaluation.

In our study; FSH, LH levels, LH / FSH ratio and testosterone levels showed a significant increase in PCOS group when compared with the control group. Moreover FSH, LH levels, LH / FSH ratio and testosterone levels were significantly lower in the treatment group than the PCOS group. In PCOS group, increased number of atretic follicles and cystic follicles were seen with light microscopic analysis. Cystic follicles with attenuated granulosa layers and thickened theca cell layers and lipid accumulation in interstitial cells were observed by electron microscope. It is observed that atretic and cystic follicles were decreased as a result of the vitamin D treatment.

In conclusion; although positive effects of vitamin D is found on hormonal and structural changes, we thought that long-term use of vitamin D may be more beneficial in PCOS. In addition further studies are needed to clarify the effects of long-term vitamin D treatment and could be considered as a viable treatment option for PCOS patients with the advancing knowledge about the effects of vitamin D.

Key words: PCOS, DHEA, vitamin D, transmission electron microscopy, light microscopy.

1. GİRİŞ

Polikistik Over Sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkileyen endokrin bir bozukluktur¹. İlk olarak 1935'te Stein ve Leventhal tarafından tanımlanan ve günümüzde üreme çağındaki kadınları yaşamları boyunca etkileyen en yaygın endokrin bozukluklardan biri haline gelen bu sendrom; hiperandrojenizm, ovulatuvar disfonksiyon, polikistik overler ile karakterize olup²; tip 2 diyabet, dislipidemi ve bozulmuş glikoz toleransı gibi kardiyovasküler hastalık risk faktörlerinin artmasından da sorumludur^{3,4}.

Günümüzde sendromu başlatan neden tam olarak bilinmemekle birlikte, hipotalamohipofizer disfonksiyon, androjen fazlalığı, insülin direnci, enzimatik defektler, intraovaryan ve genetik faktörler hastalığın fizyopatolojisini oluşturmaktadır². PKOS'na sahip kadınlarda metabolik bozukluklar oldukça yaygındır ve semptomlara göre değişen farklı tedavi yaklaşımları bulunmaktadır. PKOS hastalarında görülen metabolik sendromun D vitamini eksikliğine bağlı olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir^{5,6}.

Son zamanlarda yapılan birçok araştırmada, D vitamini yetersizliğinin kanser, otoimmün hastalıklar, diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklarda önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiş olup, kadın ve erkeklerde üreme sürecini etkilediği de rapor edilmiştir⁷. Özellikle kadın infertilitesinin altında yatan en önemli sebeplerden biri olan PKOS'na sahip kadınlarda, D vitamini serum seviyesinin düşük olduğunun tespit edilmesiyle birlikte, D vitamini metabolizması infertiliteyle ilişkilendirilmiştir⁸. D vitamini seviyesi ile insülin direnci, infertilite ve hirsutizmin dahil olduğu PKOS semptomları arasındaki ilişki, yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur^{9,10}.

PKOS'nda over yapısı üzerine yapılan araştırmalarda; over ağırlığında artma ve iyi gelişmiş teka interna tabakasına sahip çok sayıda foliküler kistlerin varlığı saptanmıştır¹¹. Ayrıca PKOS'lu hastalarda, ovaryan folikül uyarımını düzenleyen hormonlar olan FSH ve LH seviyesi ile ovaryan steroidojenik fonksiyonda görev alan testosteron seviyesinde belirgin artış gözlenmiştir¹².

Bazı çalışmalarda düşük serum 25(OH)D seviyesi ile insülin direnci, ovulatuvar ve menstruel düzensizlikler, düşük hamilelik oranı, hiperandrojenizm,

hirsutizm, obezite ve kardiyovasküler rahatsızlıklar arasında bağlantı kurulmuş ve D vitamini tedavisiyle birlikte bu olumsuzluklarda belirgin oranda azalma olduğu klinik olarak rapor edilmiştir. PKOS ve beraberinde görülen tüm bu metabolik düzensizlikler üzerine D vitamininin tedavi edici etkisi PKOS'lu sıçan modellerindeki farklı doku çalışmalarında da gösterilmiş^{13,14,15}. Ancak D vitamininin PKOS'nda overlerin histolojik yapısı üzerine etkilerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmalar D vitamini ile PKOS'ndaki hormonal ve metabolik bozukluklar arasında bir ilişki olduğunu göstermekle birlikte, bu hastalığın etiyolojisinde ve tedavisinde D vitamininin rolünün kesin olarak ortaya konulmasını sağlayan literatürlerin henüz sınırlı olduğu görülmekte ve hala araştırmacılar tarafından çelişkili sonuçlar rapor edilmektedir^{16,17}.

Sunulan çalışmada, prepubertal dönemdeki sıçanlara Dehidroepiandrosteron (DHEA) verilerek oluşturulan PKOS modelinde uygulanan D vitamini tedavisinin, over yapısı üzerine olan etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde araştırılması ve sonuçların biyokimyasal parametrelerle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sıçanlarda Over Histolojisi

Gamet hücrelerinin üretimi ve steroidogenezisten sorumlu olan overler, pelvik kavitenin lateral duvarlarında, mezovarium ile uterusun geniş ligamentine tutunmuş olarak yer alırlar¹⁸. Over yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan ve mezovaryumu kaplayan mezotel ile devam eden, tek tabakalı kübik ve bazı bölgelerde yassı hücrelerle çevrilidir. Bir bazal lamina üzerine oturan germinal epitelin altında ise sıkı bağ doku tabakası olan tunika albuginea uzanır¹⁹.

Overler korteks ve medulla olmak üzere iki bölge halinde düzenlenir. Korteks ile medulla arasında belirgin bir sınır bulunmaz; dışta yer alan korteks en önemli bölgedir, hücresel yönden zengin bir bağ doku içinde yerleşen, büyüklük ve yapıları oldukça farklılık gösteren, farklı gelişim aşamalarındaki foliküller ile korpus luteum ve atretik foliküller içerir^{18,20}. Foliküllerin etrafındaki stromal bölgede, retiküler lifler, hem fibroblast hem de düz kas hücresi özelliklerini gösteren iç şekilli hücreler, oldukça geniş ve kıvrıntılı kan damarları, lenf damarları ve sinirler bulunur. Overin iç kısmında yer alan medulla çok sayıda geniş kan damarları, lenfatikler ve sinirleri içeren gevşek, fibroelastik bağ dokusu yapısında olup hilumda mesovariumun vasküler bağ dokusu ile birleşir¹⁸.

2.1.1. Ovaryan Foliküller

Histolojik olarak, gelişim evrelerine göre primordiyal foliküller, gelişen foliküller (primer folikül, sekonder folikül) ve olgun foliküller (Graaf folikül) olmak üzere 3 tip ovaryan folikül yapısı tanımlanır¹⁸.

2.1.1.1. Primordiyal Foliküller

Sıçanlarda doğumdan sonra 2-3. günlerde oluşan primordiyal foliküller korteks stromasında, tunika albugineanın hemen altında yerleşim gösterirler. Primordiyal folikül 17-20 µm çapında olup, 1. mayoz bölünmenin profaz evresinde diploten safhada duraklamış olan primer oosit ve onu çevreleyen tek tabakalı yassı foliküler hücrelerden (pregranüloza hücreleri) oluşmuştur²¹. Erken

dönemde stromal hücrelerden ayırt edilemeyen foliküler hücreler dıştan bir bazal lamina ile çevrilidir¹⁸. Primordiyal foliküllerin merkezinde bulunan 11-15 µm çapındaki primer oosit²⁰, geniş veziküler bir çekirdek ve belirgin bir çekirdekçik ile sitoplazmasında Golgi kompleksi, endoplazmik retikulum, lizozomlar ve çok sayıda mitokondriyonlar içerir¹⁸. Seksüel olgunluğa ulaşmış bir dişide foliküller, folikül havuzunu terk ederek primordiyal folikül-primer folikül transizyonuna dahil olurlar²¹.

2.1.1.2. Gelişen Foliküller

Büyümekte olan folikülün ilk gelişim aşaması primer foliküldür. Bir primordiyal folikül büyümekte olan foliküle farklanırken; oositte, foliküler hücrelerde ve ilişkili stromada birtakım değişiklikler meydana gelir¹⁸.

Oositin büyümeye başlaması ve etrafındaki yassı pregranüloza hücrelerinin kübik hale gelmesiyle primordiyal folikülden primer folikül oluşur²². Primer folikül evresinde oositin çevresinde zona pellusida tabakası gelişir. Zona pellusida, oosit ile etrafındaki granüloza hücreleri arasında bulunan, tamamen glikoproteinlerden oluşmuş bir tabakadır. Oosit mikrovillusları ve daha kalın yapıdaki granüloza hücre uzantıları zona pellusidayı delerler¹⁸.

Oosit sitoplazmasında gevşek olarak kümelenmiş olan organellerin çoğu oositin kortikal ve perinükleer bölgelerinde yerleşmiştir. Merkezi yerleşimli bir çekirdek ve çekirdek içerisinde birden fazla çekirdekçik ile sitoplazmada mitokondriyonlar, endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi ve veziküller bulunur¹⁵. Foliküler hücreler mitoz bölünmeler geçirerek oosit etrafında tek katlı kübik bir epitel tabakası oluştururlar. Bu foliküle tek tabakalı (unilaminar) primer folikül adı verilir. En küçük primer foliküllerde oosit çapı ise 16,3 µm olup 8-13 adet foliküler hücre ile çevrilidir ve folikül çapı 27,5 µm kadardır²⁰. Gelişim ilerlerken foliküler hücreler çoğalmaya devam ederler ve çok katlı granüloza hücre tabakasını meydana getirirler. Granüloza hücreleri birbirleriyle geçit bağlantıları aracılığı ile iletişim kurarlar. Bu durumda oluşan folikül ise çok tabakalı (multilaminar) primer folikül olarak adlandırılır¹⁹. En büyük primer foliküller ise 25-29 adet granüloza hücre tabakası ile çevrili olup çapları 63,6 µm'dir. Bu büyüklükteki foliküllerde oositin çapı ise 38,5 µm'dir²⁰.

Primer foliküller gelişirken, folikül etrafındaki stromal hücreler, foliküler teka hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşırlar¹⁹. Teka hücrelerinin kapsül şeklinde düzenlenmesi sonucunda oluşan tabakaya Teka folikülü adı verilir¹⁸. Bir folikülde teka hücrelerinin oluşumu ilk olarak, 2 veya daha fazla granüloza hücre tabakasına sahip olduğu, LH'ya duyarlı ve steroidojenik enzimlerin aktive olduğu evreye denk gelir²⁴. Teka tabakası folikül etrafında iki ayrı tabakaya farklılır. İçte yer alan teka interna iyi vaskülarize olmuş endokrin bir dokudur¹⁹. Oval veya elips şekilli bir çekirdeğe sahip iç veya polihedral şekilli hücreler içerir. Teka internayı oluşturan hücreler belirgin agranüler endoplazmik retikulum sisternaları, tübüler kristal mitokondriyonlar ve yağ damlacıkları içerir. Dış kısımda yer alan teka eksterna kapsül benzeri bir bağ doku yapısındadır²⁰. Çok sayıda sıkıca paketlenmiş kollajen lifler ile birlikte birkaç tabaka halinde düzenlenmiş uzun, yassı iç şekilli hücrelerden oluşmuştur. Sitoplazmalarında mitokondriyonlar, az miktarda yassılaştırmış granüler endoplazmik retikulum sisternaları ve oldukça fazla serbest ribozomlar bulunur²⁵.

Primer foliküller gelişimini sürdürürken granüloza hücre proliferasyonu devam eder ve granüloza hücreleri 6-12 tabaka kalınlığına ulaşır²⁰. Bu sırada granüloza hücreleri arasında içleri foliküler sıvı ile dolu boşluklar belirir. Ekstrasellüler, yoğun boyanan ve PAS pozitif olan bu materyal Call-Exner cisimcikleri olarak adlandırılır. Granüloza hücreleri tarafından salgılanan bu cisimcikler hyaluronan ve proteoglikanları içerirler¹⁸. Foliküler sıvı içerisinde büyüme faktörleri, plazminojen, fibrinogen, antikoagülan heparan sülfat ve bağlayıcı proteinlerle birlikte yüksek konsantrasyonlarda steroidler (progesteron, androstenedion, östrojen) bulunur¹⁹. Folikül sıvısı granüloza hücreleri arasında birikmeye devam eder ve boşluklar birleşmeye başlayarak sonunda büyük, tek bir boşluk olan antrumu meydana getirirler. Antrum oluşumunu tamamlamış olan folikül artık sekonder (antral) folikül olarak tanımlanır¹⁸. Sekonder foliküldeki oositte organellerin çoğu kortikal ve perinükleer bölgelerde yerleşim gösterir. Mitokondriyonlar yuvarlak veya oval şekilli olup az miktarda lameller tipte kristallara sahiptirler. Az miktarda bulunan düz endoplazmik retikulum sisternaları mitokondriyonlara yakın yerleşim gösterirler. Primer oosit sitoplazması içinde küçük gruplar halinde, birbirine paralel olarak düzenlenmiş

lamellalara veya sitoplazmik ışınlara rastlanmaktadır²³.

Antral foliküllerde primer oosit hızla büyür ve en geniş antral folikülde çapı 70 µm'ye ulaşır²⁰. Bu sırada antrum genişler ve granüloza hücre tabakası oositle ilişkili bir bölge dışında düzenli tabakalar halinde dizilim gösterir. Bu bölge granüloza hücrelerinin antruma doğru çıkıntı yaptığı kalın bir küme olan kumulus ooforusudur¹⁸. Oosit etrafına ışınsal olarak dizilen bir grup granüloza hücresi ise korona radyatayı oluşturur ve ovulasyon esnasında oositle birlikte atılır. Her menstrüel siklusta genellikle bir folikül diğerlerine göre daha fazla büyür ve dominant folikül haline gelirken, diğer foliküller atreziye uğrarlar¹⁹. Bu olgun veya preovulatuvar (Graaf) folikül yaklaşık 500 µm çapa sahiptir. Graaf folikülünde primer oosit merkezi bir yerleşime sahiptir ve eksantrik yerleşimli germinal vezikül içerir²⁰.

Foliküller, gelişimlerinin son basamağı olan Graaf folikülü haline geldiklerinde maksimum boyutlarına ulaşırlar ve granüloza hücre proliferasyonu azalır. Granüloza hücre tabakası incelirken, antrum boyutu ve foliküler sıvı miktarında artış meydana gelir¹⁸. Over korteksinin büyük bir kısmını kaplayan Graaf folikülü LH dalgalanmasından sonra gözlenir. Folikülün duvarında bazal membran yok olmaya başlar ve teka tabakasındaki kan damarları teka interna içerisinde derinlere girer²⁰.

2.1.1.3. Folikülogenez

Folikülogenez, fetal veya neonatal overlerde pregranüloza hücrelerinin oosit etrafına göç ederek primordiyal folikülleri oluşturmasıyla başlar²⁶. Sıçanlarda over içerisinde yer alan germ hücreleri ve pregranüloza hücrelerinden oluşan ovigeroz kordonlar doğum gerçekleştikten birkaç saat sonra parçalanırlar^{27,28}. Ovigeroz kordonların foliküler birimlere parçalanması ile merkezde yer alan bir oosit, etrafında tek tabaka halinde foliküler hücreler ve devamlılık gösteren bir bazal laminaya sahip primordiyal foliküller oluşur^{27,29}.

Sıçanlarda gebeliğin 18. gününden sonra oogoniumlar mitotik aktivitelerini kaybederek, geç intrauterin ve erken postnatal dönemde mayoz bölünmeye başlarlar. Bu evrede steroid hormon üretimi görülmemektedir. Primordiyal folikül oluşumu postnatal 2.-3. günler içinde gerçekleşir²⁹. Folikül

içerisindeki oosit mayoz bölünmenin profaz evresinde diploten safhaya girmiş olarak dinlenme halinde beklemektedir. Mayoz bölünmenin profaz evresinin diktiyojen safhası başladığında steroid hormon üretimi (FSH ve LH) başlamaktadır³⁰. Böylece primordiyal folikül havuzundaki foliküllerden bazıları primer, sekonder veya antral folikül yönünde gelişebilmek için uyarılmaktadırlar. İlk olarak yassı granüloza hücrelerinin kübik hale geçmesi ve proliferatif özellik kazanmalarıyla primer foliküller oluşur²⁷. Artan FSH ve LH dalgalanmasını takiben gerçekleşen bu evre sıçanlarda postnatal 3. güne denk gelir ve zona pellusida yapısı ilk kez 3. günde gözlenir³¹.

Primer foliküller büyümeye devam eder ve foliküllerin etrafını saran stromal hücreler farklılaşarak içte teka interna ve dışta teka eksterna olmak üzere iki tabakadan oluşan teka foliküliyi meydana getirirler¹⁸. Teka interna hücreleri östrojen sentezleme özelliğine sahip değildir, fakat LH salınımına cevap olarak androjen sentezlerler. Bu androjenler daha sonra seçilmiş haldeki büyümekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinde bulunan FSH tarafından indüklenen aromataz enzimi sayesinde östrojene çevrilir³². Teka eksterna hücreleri ise teka internanın dış kısmında yer almakta olup koruyucu bir kapsül görevi görmektedir¹⁸. Oldukça iyi gelişmiş kan damarlarına sahip teka eksterna tabakasının oluşumundan sonra, granüloza hücreleri arasında içi foliküler sıvı ile dolu düzensiz boşluklar belirmeye başlar²⁰. Bu evre sıçanlarda postnatal 5.güne denk gelmektedir³¹. Foliküler sıvı dolu boşlukların genişleyip tek bir antrumu oluşturması ve folikül boyutunun artmasıyla, antral foliküller oluşur²⁰. Antral folikül oluşumu ise postnatal 10. günde gözlenmektedir. Antral folikül gelişiminin son evrelerindeki foliküller postnatal 17. günde gözlenir³¹.

Oositin olgunlaşması, primordiyal folikül gelişimi ve preantral folikül oluşumunu içeren evre gonadotropinlerden bağımsız olarak tamamlanır ve çeşitli sitokinler ile büyüme faktörlerinin varlığında gerçekleşir. Antral folikülden ovulatuvar folikül gelişimine kadar olan süreç ise sirküle kandaki FSH ve LH seviyelerine bağımlı olup, foliküllerin sağlıklı bir şekilde gelişebilmesi ve devamlılıkları için gonadotropinlere ihtiyaçları vardır³².

2.1.1.4. Ovulasyon

Ovulasyon, bir sekonder oositin olgun folikülden (Graaf folikülü) dışarı atılmasını kapsayan süreçtir¹⁸ ve dişi sıçanlarda östrus fazından 8-11 saat sonra gerçekleşir³². Graaf folikülleri, ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde bekleyen sekonder oositlere sahiptirler. Over korteksinin büyük bir bölümünü işgal eden bu foliküller LH dalgalanmasından sonra gözlenirler²⁰.

Bu evrede kumulus hücre-oosit kompleksi antruma doğru çıkıntı yapacak şekilde kalın bir bölge oluşturur. Geri kalan granüloza hücreleriyle olan iletişim azalmıştır. Bazal membran bulanık hale gelir ve teka tabakasındaki kan damarları teka internanın derinlerine kadar penetre olurlar. Ovulasyon anında foliküllerin bulunduğu overlerin yüzeyine yakın kısımlar incelmeye başlar. Bu alanda yüzey epiteli yassılaştır²⁰. Foliküler sıvı basıncı ve miktarında artış gözlenir. Foliküler duvarın enzimatik proteolizisi gerçekleşir ve teka eksterna tabakasındaki düz kasların kasılmasıyla birlikte folikülün dış duvarı yırtılır¹⁸.

Ovulasyon esnasında, tuba uterinaların fimbria adı verilen uzantıları over yüzeyine yakın bir konum alır. Fimbriaların süpürme hareketiyle, korona radyata ve kumulus hücreleriyle çevrili olan oosit, tuba uterina kanalına itilir. Kumulus hücre kompleksinin hareketi, tuba uterinanın yüzey epitelindeki hücrelerin hareketli silyaları ile de desteklenir ve ovumun peritoneal kaviteye girmesi engellenir¹⁸. Ovum, fertilizasyonun gerçekleşeceği ampulla bölgesine ulaşır. Fertilizasyon 24 saat içinde gerçekleşmezse sekonder oosit dejenere olur¹⁹.

2.1.1.5. Korpus Luteum

Ovulasyon sırasında atılan ovumun ardından geride kalan granüloza ve teka hücrelerinden oluşan folikül duvarı katlantılı bir hal alır ve korpus luteuma (luteal bez) dönüşür. İlk olarak, teka interna tabakasındaki kapillerlerden foliküler lümene doğru meydana gelen kanama korpus hemorajikum adlı bir pıhtı yumağının oluşmasına yol açar. Daha sonra stromal bağ dokusu foliküler kaviteyi kuşatır¹⁸. Böylece granüloza hücreleri kapillerler tarafından sarılmış hale gelir ve hem granüloza hem de teka interna tabakasının hücreleri LH etkisi altında histolojik ve fonksiyonel değişiklikler geçirerek, östrojenlere ek olarak

aşırı miktarda progesteron üretmekle görevli hücreler olarak özelleşirler¹⁹. Progesteron üretimi korpus luteumun temel fonksiyonu olup, hamileliğin gelişimi ve sürdürülmesinde büyük rol oynar. Bu yüzden kadınlarda ve hamile hayvanlarda ortaya çıkan luteal bir bozukluk, embriyo implantasyonlarında başarısızlık ve düşük ile ilişkilendirilir³³.

Granüloza hücreleri ve teka interna tabakasındaki hücrelerin granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine dönüştüğü bu süreç luteinizasyon olarak adlandırılır¹⁸. Granüloza lutein hücreleri hacimce genişlemiş halde olup kazandıkları lipid damlacıklarından dolayı daha açık renklidirler^{18,20}. Yaklaşık 20-35 µm çapa sahip bu hücreler FSH ve LH uyarısına yanıt olarak östrojen ve progesteron salgırlar^{18,34}.

Teka lutein hücreleri ise granüloza lutein hücrelerinden daha küçük boyutlarda, yaklaşık 15 µm çapa sahip koyu boyanan hücrelerdir^{18,20}. LH uyarısına yanıt olarak progesteron ve androstenedion üretirler³⁴.

Eğer fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmemişse korpus luteum gerileme evresine girer, steroid üretimi durur ve hücreler apoptozise uğrar. Korpus luteum dejenerasyonundan sonra, kandaki steroid konsantrasyonları azalır ve bunun sonucunda FSH salınımı tekrar artar, diğer bir grup folikülün gelişimini uyarır ve yeni menstrual siklusun başlamasını sağlar. Dejenere olan korpus luteumun yerine bir skar doku olan korpus albicans oluşur^{18,19}.

2.1.1.6. Atretik Foliküller

Ovaryan foliküllerin çoğu atrezi adı verilen dejeneratif bir sürece girer. Bu süreçte foliküler hücrelerin ve oositin ölümü ve fagositik hücrelerce yıkımı gerçekleşir¹⁹. Foliküler atrezi, memeli over gelişimi boyunca meydana gelen önemli bir süreç olup, programlanmış hücre ölümünün bir formu olan apoptoz ile granüloza hücrelerinin ölümünü kapsar³⁵. Birçok folikül fetal gelişim, erken postnatal yaşam ve puberte süresince atreziye uğrar. Puberteden sonra, her menstrual siklus boyunca foliküller gruplar halinde olgunlaşma sürecine girerler; bunlardan sadece bir tanesi maturasyonunu tamamlar¹⁸.

Primordiyal, küçük ve gelişen foliküllerin atrezisinde immatür oosit küçülür ve dejenere olurken; granüloza hücrelerinde de benzer değişiklikler

meydana gelir¹⁸. Atretik primordiyal foliküllerde oosit içerisinde vakuol yapıları ve sekonder lizozomlar gözlenir²³. Küçük foliküllerin atrezisi sonucu over stromasında meydana gelen boşluk, stroma hücrelerinin o bölgeye göçü ile doldurulur¹⁸.

Büyümekte olan geniş foliküllerde ise atreziye bağlı değişiklikler ilk olarak granüloza hücrelerinde gözlenir. Bu hücreler çekirdekte kromatin marjinasyonu, sitoplazmik çıkıntıların oluşumu ve sitoplazmik vakuolizasyon gibi değişiklikler gösterirler. Bir diğer önemli değişiklik ise oosit ve etrafındaki granüloza hücreleri arasındaki fokal bağlantıların yok olmasıdır²³. Granüloza hücre tabakası nötrofil ve makrofajlar tarafından kuşatılır ve granüloza hücreleri antrum içerisine dökülür. Teka interna hücrelerinin hipertrofisi gerçekleşir¹⁸.

Oositte meydana gelen değişiklikler ise organellerin sitoplazma boyunca dağılımı, mikrovillusların yok olması ve oosit segmentasyonunu kapsar²³. Teka interna tabakası ile granüloza hücreleri arasındaki bazal membran hücrelerden ayrılır, kalınlığı artar ve dalgalı yapıda hyalin bir membran olan glassy membranı oluşturur. Bu yapı atrezinin geç dönemindeki foliküllere özgüdür. Gelişimin ileri dönemlerindeki foliküllerin atrezisi sonucunda over stromasında korpus atretikum adlı yapı oluşur¹⁸.

2.1.1.7. İnterstisyel Hücreler

İnterstisyel hücreler folikül gelişimi ve hormon sekresyonunun önemli bir parçası olup, atreziye uğrayan foliküllerin teka interna tabakasından köken alırlar¹⁹. Zengin lipid içeriği ile karakterize geniş çaptaki bu hücreler atrezi artışına paralel olarak ovaryan stromada artış gösterirler³⁶. Bol miktarda, agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları ve tübüler tipte kristalara sahip mitokondriyonlar içermeleri yönünden steroid salgılayan hücrelere benzerlik gösterirler. Bunun yanında, küçük veziküller ile karakterize az sayıda Golgi kompleksi içerirler³⁷. İnterstisyel hücreler insanda östrojen üretiminin önemli bir kaynağıyken, diğer türlerde progesteron üretiminden sorumludurlar^{34,23}.

2.2. Sıçanlarda Over Gelişimi

Sıçanlarda gebeliğin 10.5 gününde gonadal çıkıntılar belirmeye başlar. Dişide ve erkekte aynı yapıdan köken alan gonadlar, mezonefrozun ventrolateral yüzeyindeki kölomik epitelin bir kabarıntısı olarak yükselirler²⁷. Yol kesesi duvarı endoderminden gelişen germ hücreleri göç ederek gonadal çıkıntılara ulaşırlar. Bu süreç yaklaşık olarak prenatal 11. güne denk gelir. Gonadal çıkıntılara ulaşan germ hücreleri çok hızlı mitotik bölünmeler geçirirler ve postnatal 18.5 günde sayıları yaklaşık 75.000 civarındadır³⁸. Gonadal çıkıntılara ulaşmadan önce, 9.günde primordiyal germ hücreleri pasif transfer ile son bağırsağın endodermal epiteline gelirler. Gebeliğin 10-12. günleri arasında ameboid hareketler ile dorsal mezenter boyunca hareket ederler ve gelişmekte olan gonadlar içerisindeki kalıcı yerlerine ulaşırlar³⁰. Elektron mikroskopik olarak incelendiğinde primordiyal germ hücrelerinin geniş, sferikal bir çekirdek ve içerisinde 1-2 çekirdekçiğe sahip olduğu gözlenmiştir. Sitoplazmada iyi gelişmiş Golgi kompleksi, sferikal şekilli mitokondriyonlar, granüler endoplazmik retikulum sisternaları, membranlarla çevrili granüller, polizomlar ve örtülü veziküllerin olduğu belirtilmiştir²⁸.

Ovaryum ve oositlerin histolojik yapılarının gözlenmesi ancak oogonyumların mitotik aktivitelerinin sona ermesi ile mümkündür. Bu da oosit ve somatik hücrelerin foliküllerde organize olduğu zamana eşdeğerdir. Sıçanlarda bu süreç postnatal 18. güne denk gelir. Germ hücreleri mitoz bölünme süreci sona erip mayoz bölünme evresine girdiklerinde oositlere farklılaşırlar. Mayoz bölünme leptoten, zigoten ve pakiten safhalarıyla devam eder fakat diploten evresinde durur³⁸.

Gelişmekte olan overde germ hücreleri ve (kölomik epitelin proliferasyonu ile ortaya çıkan) epitelyal hücreler ovigeroz kordonlar adı verilen epitelyal yapılara organize olurlar. Ovigeroz kordonlar over yüzey epiteli ile devam eder ve ince bir bazal lamina ile sarılmıştır. Dış kısımda ise mezenşimal hücreler ile çevrilidirler. Farklanmakta olan over böylece, ovigeroz kordonlar ve interstisyel doku olmak üzere iki ayrı bölge olarak organize olur²⁷.

Embriyonik overde mayoz bölünme sonucu meydana gelen oositler birbirlerine yapışık kümeler halinde ve somatik hücrelerle çevrilmiş olarak

gözlenirler. Folikül oluşum süreci bu oosit kümelerinin dağılması ile gerçekleşir. Bu süreçte birçok oosit apoptotik hücre ölümüyle ortadan kalkar. Somatik hücreler oosit kümelerinin içine göç eder ve hayatta kalan oositlerin arasında dağılım gösterirler. Böylece bir oosit ve onu çevreleyen tek sıra halindeki pregranüloza hücreleri ve onların da etrafını saran bazal lamina ile primordiyal foliküller oluşur²⁹. Postnatal 2. günden sonra overde her biri az miktarda yassı pregranüloza hücresi ile çevrili 27.000 civarında oosit bulunur³⁸.

Daha sonra, 1. mayoz bölünmenin profaz evresinde dinlenme halinde beklemekte olan oosit ve onu saran yassı pregranüloza hücrelerinden oluşan primordiyal foliküller, primordiyal-primer folikül transizyonuna uğrar. Folikülogenez, büyümekte olan foliküller, atrezi, apoptoz veya ovulasyona uğrayana kadar sürer²¹.

2.3. Sıçanlarda Östrus Siklus

Dişi sıçanlar spontan gelişen ovulasyon periyoduna sahiptirler. Yaşa ve türlere bağlı olarak düzenli ve başarılı bir östrus siklus gösterirler. Bu sikluslar aynı zamanda ışık, mevsimler ve yaşam şartlarından da etkilenir^{39,40}.

Östrus siklus overlerde, uterus ve vajinada meydana gelen birtakım yapısal değişikliklerle karakterizedir³⁹. Dişi sıçanlarda bu üreme periyodu proöstrus, östrus, metöstrus (diöstrus I) ve diöstrus (diöstrus II) olmak üzere 4 evreden oluşur⁴¹. Ovulasyon proöstrusun başlangıcından östrus evresinin sonuna kadar devam eder. Seksüel olgunluğun başlangıcından 12 aylık olana kadar geçen süreçte dişi sıçanların %60-70'inde siklus uzunluğu 4-5 gündür. Bazı sıçanlar ise daha uzun, düzenli veya düzensiz sikluslara sahiptirler⁴¹.

Östrus siklus boyunca prolaktin, LH ve FSH düşük seviyelerdedir ve proöstrus fazının öğleden sonrasında artış gösterirler. Östradiol seviyeleri metöstrus evresinde artmaya başlar, proöstrus boyunca en üst seviyeye ulaşır ve östrus fazında eski haline döner. Progesteron salınımı da metöstrus boyunca artar ve diöstrus fazında azalmaya başlar. Proöstrusun sonunda progesteron değerleri ikinci pik değerine ulaşmak üzere yükselir⁴². Sıçanlarda östrus siklus vajinal yaymalardaki farklı hücre tiplerinin varlığı ile sınıflandırılır ve östrus siklus boyunca vajinal epitelde gözlenen yapısal değişiklikler östrojen ve progesteron

ile uyarılır³⁹.

Dişi sıçanlarda pubertenin başlangıcı, 4. haftadan sonra LH salınımının başlatılmasını takiben gerçekleşen birtakım olaylar zinciriyle sonuçlanır. Bu süreçten önce üreme sistemleri inaktiftir. LH salınımındaki bu değişiklik ilk proöstrus evresinden 8-9 gün önce başlar ve bu dönem anöstrus olarak kabul edilir. Daha sonra ilk proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus periyodları devam eder⁴³. Ovulasyon ile sonuçlanan östrus siklusu 4-5 gün sürmektedir⁴⁴. Bu sürecin 12-14 saati proöstrus, 25-27 saati östrus, 6-8 saati metöstrus ve 55-57 saati diöstrus evrelerini kapsar⁴³. 1 yıl sonra ise sıçanlarda progesteron sekresyonunun uzaması nedeniyle östrus ve diöstrus sürelerinin uzamasını takiben siklus uzunlukları artar⁴⁵. Uzamış olan siklus periyodu 4 günlük östrus siklus sürecine benzer fakat LH ve östrojen sekresyonu, luteolizis ve uterus değişiklikleri 24 saat gecikmeli olarak gerçekleşir. Östrus siklusun 3. gününde meydana gelen LH salınımı östrojen sekresyonu için gereklidir. Östrojen sekresyonu LH'ın pik yaptığı ana kadar devam eder ve 4. gün 14. saat civarında meydana gelen LH piki ile ovulasyon gerçekleşir⁴⁴.

Proöstrus boyunca östrojen seviyeleri artar ve foliküller daha hızlı büyüme gösterir. Ovulasyon LH dalgalanmasından 10-12 saat sonra östrus fazının gecesi boyunca gerçekleşir³⁹. Östrus fazında genellikle 10-20 ovum ovule olur. Metöstrus fazında küçük foliküller ve sadece kısa bir süreliğine progesteron salınımı gerçekleştiren çok sayıda korpus luteum gözlenir. Diöstrus fazında ise küçük foliküller mevcut olup, bir önceki ovulasyon sürecinden kalma geniş korpus luteumlar gözlenir⁴⁰.

2.4. Polikistik Over Sendromu

Polikistik Over Sendromu (PKOS) üreme dönemindeki kadınlarda hiperandrojenizm ve ovulatuvar disfonksiyon ile karakterize çok kökenli endokrin bir bozukluktur⁴⁶. Modern tıp literatüründe PKOS ilk olarak 1935'te Stein ve Leventhal tarafından rapor edilmiştir. Bu rapora göre 7 kadın hastada amenore, hirsutizm ve çok sayıda kist içeren genişlemiş overler tanımlanmıştır. Günümüzde ise, kadınları yaşamları boyunca etkileyen yaygın bir hastalık olarak bilinmektedir².

PKOS'na sahip hastalar ile yapılan kromozomal çalışmalarda herhangi bir anormallik gözlenmezken, hastaların aileleri ile yapılan genetik çalışmalarda etkilenme oranının yüksek olduğu saptanmıştır. Bu etkilenme hem X'e bağlı hem de otozomal dominant kalıtım yönündedir. Buna ek olarak, paternal metabolik sendrom ve adölesan PKOS arasındaki bağlantıya işaret eden çalışmalar da mevcuttur. Bunun yanında, PKOS'nun kalıtsal kökeninde rol alan genetik faktörleri tanımlamak amacıyla androjen sentezinden sorumlu enzimleri kodlayan veya insülin sinyalizasyonunda rol oynayan protein dönüştürücüler analiz edilmiştir. Buna rağmen genetik polimorfizmler veya mutasyonların PKOS'nun patogeneziindeki rolleri hala incelenmekte olup daha fazla araştırma gerektirmektedir⁴⁷.

PKOS'nun tanı kriterleri; "National Institutes of Health (NIH)", "European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE/ Rotterdam)", "Androgen Excess and PCOS Society" olmak üzere 3 kuruluş tarafından yapılmıştır². Bunlardan Rotterdam kriterleri uluslararası kabul görmekle birlikte daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Rotterdam kriterlerine göre PKOS'nun; oligomenore/amenore, klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm ve ultrasonografik polikistik overlerin varlığı olmak üzere 3 temel tanımlayıcı kriteri vardır⁴⁸. Buna rağmen bireyler arası çeşitli varyasyonlar gözlenebilmektedir. Bunlar arasında hirsutizm, insülin direnci, hiperinsülinemi, metabolik sendrom, artan diyabet riski (Tip 2 diyabet) ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi metabolik komplikasyonlar yaygındır². Bunun yanında; azalan yaşam kalitesi, depresyon, anksiyete gibi fizyolojik problemler de mevcuttur⁴⁹. Düzensiz ovulatuvar fonksiyonun neden olduğu anovulatuvar infertilite ve hamilelikte görülen düşük riskleri de en önemli klinik problemlerin başında gelmektedir. Bu yüzden PKOS endokrin, metabolik ve kardiyovasküler sağlığı olumsuz etkileyen bir hastalıktır².

PKOS ve beraberinde gözlenen tüm bu sorunların kaynağını araştırarak olursak, obezite; hiperandrojenizm, hirsutizm, infertilite ve hamilelik ile ilgili sorunları artırmaktadır. Klinik hiperandrojenizm ise başlıca hirsutizm, akne oluşumu ve erkek tipi alopesiye neden olmaktadır⁴⁸. Genel olarak obezite ve insülin direncinin artışıyla Tip 2 diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar arttığı gibi, PKOS'na sahip hastalarda obezite, insülin direncini artırmakta, reproduktif

ve metabolik bozuklukları şiddetlendirmektedir. Ayrıca PKOS'lu kadınlarda yine Tip 2 diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve bozulmuş glikoz toleransı riski artmaktadır. Obezite oranı yükseldikçe PKOS'na yakalanma riski artacaktır. Bu yüzden obezite tedavisi PKOS için anahtar tedavi yöntemidir. Bu tedavi ile birlikte insülin direnci ve beraberinde gözlenen metabolik ve reproduktif bozukluklarda iyileşme gözlenmektedir⁴⁹.

PKOS'nda yaygın olan bir diğer metabolik bozukluk ise dislipidemi. Yüksek trigliserid ve düşük densitede lipoprotein kolesterol seviyeleri ile karakterize olan dislipideminin nedeni multifaktöriyeldir. Bunlardan insülin direnci; lipoliz stimülasyonu, lipoprotein lipaz ve hepatik lipaz ekspresyonlarında etki göstererek dislipidemi gelişiminde önemli rol oynar⁴⁹.

Araştırmalara göre overde androjen hipersekresyonunun PKOS'nun gelişiminde başlıca etken olduğu belirtilmiştir. İnsülin direnci gelişimine bağlı olarak aşırı LH sekresyonunun meydana geldiği genetik olarak belirlenmiş olup⁵⁰, yükselen LH ve insülinin sinerjik olarak androjen üretimini artırdığı tespit edilmiştir⁴⁸. İnsülin direnci, hiperinsülinemiye yol açarak PKOS'nda anormal androjen sekresyonunun başlatılmasına neden olur⁵⁰. Androjen üretimini çoğaltarak ve Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)'i azaltma yoluyla serbest androjen miktarını artırarak metabolik ve üreme ile ilgili birtakım değişikliklere yol açar⁴⁹ ve böylece ovaryan folikül gelişimi zarar görür⁴⁸. İnsülin, LH ile birlikte hareket ederek androjen üretimini artırır ve LH'nin reseptörlerine bağlanmasını indükler. Hiperinsülinemi, teka hücrelerinde İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF-1)'i stimüle eder. Bu durum androjenlerin LH dalgalanmasına bağlı down regülasyonunu bloke eder ve overde hiperandrojenik bir çevre oluşmasını sağlar⁵⁰.

PKOS'nda meydana gelen klasik endokrin anormallikler olan LH hipersekresyonu ve özellikle over kökenli olmak üzere artan androjen sekresyonuna bağlı olarak; PKOS'lu kadınlarda ve çoğunlukla anovulatuvar olanlarda granüloza hücre fonksiyonu anormaldir ve bu hastalığa sahip kadınlarda mevcut olan overler hacimce genişlemiş olup, genellikle korteksin periferik kısmında yerleşim gösteren, kalınlaşmış merkezi stroma yapısına sahip çok sayıda küçük antral foliküller (2-9 mm) içerirler. Rotterdam kriterlerine

göre bu polikistik over yapısı; her overde sayıca 12'den fazla folikül ve 10ml'nin üstündeki ovaryan hacim şeklinde tanımlanmıştır⁵¹. Foliküller, normal over yapısındaki foliküllere göre daha heterojenöz olmakla birlikte, hem östradiol hem de progesteron hipersekresyonunu gerçekleştiren önemli bir subpopulasyon içermektedirler. Bu foliküller zamanından önce LH'a duyarlı hale gelirler. Foliküllerin LH'a karşı bu şekilde erken cevap oluşturmada hiperinsülineminin büyük önemi vardır⁵².

Gelişmekte olan preantral ve erken antral folikül formasyonu ise normal overlerdeki foliküller ile histolojik olarak benzerdir. Fakat mid-antral evreden sonra folikül gelişimi normal olarak izlenmez, folikül büyümesi durur ve dejeneratif değişiklikler gösterir. Foliküler sıvı artışı ve beraberinde antrum yayılımı gerçekleşir. Folikül büyüdükçe granüloza hücre tabakası hücreleri apoptoza gider ve artan biçimde atretik yapı sergiler. Sonunda folikül duvarı nerdeyse granüloza hücrelerinden yoksun hale gelir; ince duvarlı bir kist yapısı oluşur⁵¹.

PKOS'nun folikül gelişimi üzerine etkilerine bakıldığında; 1982'de yapılan histolojik bir çalışmada overlerdeki polikistik görünümün, çapları 10 mm'den küçük, büyümekte olan foliküllerin overde sayıca artmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir⁴⁹. Ultrasonografik yaklaşımlara göre, folikül birikimi yanında, ovaryan hacmin ve ovaryan alanın genişlemesi polikistik over sendromunda önemli belirteçler olarak gösterilmektedir. Yapılan histopatolojik çalışmalar, hem ovaryan hacim hem de ovaryan alanın artmasının, ovaryan hipertrofi ve folikül birikiminin bir sonucu olduğunu doğrulamıştır⁵³.

Yapılan bir çalışmada primer evreden başlayarak tüm gelişim aşamasındaki foliküllerin sayıca arttığı tespit edilmiştir⁵⁴. Başka bir çalışmada ise tüm preantral foliküllerin densitesinde artış gözlenmiş ve polikistik yapıdaki overlerde primer folikül densitesinin arttığı kabul edilmiştir⁵⁵. Bir diğer çalışmada ise; PKOS'na sahip anovulatuvar ve ovulatuvar over dokuları normal overler ile karşılaştırıldığında, PKOS'lu overlerde primordiyal folikül oranının azaldığı, büyümekte olan folikül oranının ise arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca polikistik yapıdaki overlerde bulunan preantral foliküllerin atreziye maruz kalma oranlarının normal overlerdeki foliküllere göre daha az olduğu (daha uzun süre

yaşayabildikleri) gözlenmiştir⁵².

Bazı kaynaklarda PKOS'lu kadınlarda serum FSH seviyeleri azaldığından; yetersiz FSH stimülasyonu da başarısız folikül maturasyonunun bir nedeni olarak gösterilirken⁵¹, bazı kaynaklarda ise serum FSH konsantrasyonlarının normal bir düzen içinde olmakla birlikte folikül maturasyonunu gerçekleştirmek için düşük olduğu rapor edilmiştir.

PKOS'lu anovulatuvar kadınlarda görülen yüksek östradiol seviyeleri, FSH'nin normal feedback mekanizmasını değiştirmesine ve böylece geniş antral foliküllerde disfonksiyonel ve duraklamış maturasyon gerçekleştirmesine yol açar. Bu yüzden anti-östrojenler veya ekzojen FSH kullanımı ile FSH seviyeleri artırılmakta ve bu durum çoğunlukla ovulasyon ile sonuçlanmaktadır⁵².

Endokrin çevreyi iyileştirmenin ve başarılı bir ovulasyon gerçekleştirmenin bir diğer yolu da kilo kaybına bağlı olarak hiperinsülinemiye azaltmaktır. PKOS'na sahip kadınlara uygulanacak diğer terapötik yaklaşımlara bakıldığında ise; diyet ve yaşam tarzı değişiklikleri, menstrual düzenlenme başlıca tedavi yöntemlerindendir⁵⁶. Bunun yanında egzersiz, fiziksel aktivite, ilaç tedavileri ve ameliyat prosedürleri de PKOS tedavisi kapsamında önerilen yöntemlerdir. İlaç tedavisi olarak metformin, glitazon, spironolakton, östrojen ve klomifen sitrat kullanımı önerilmektedir⁵⁷.

2.5. D Vitamini

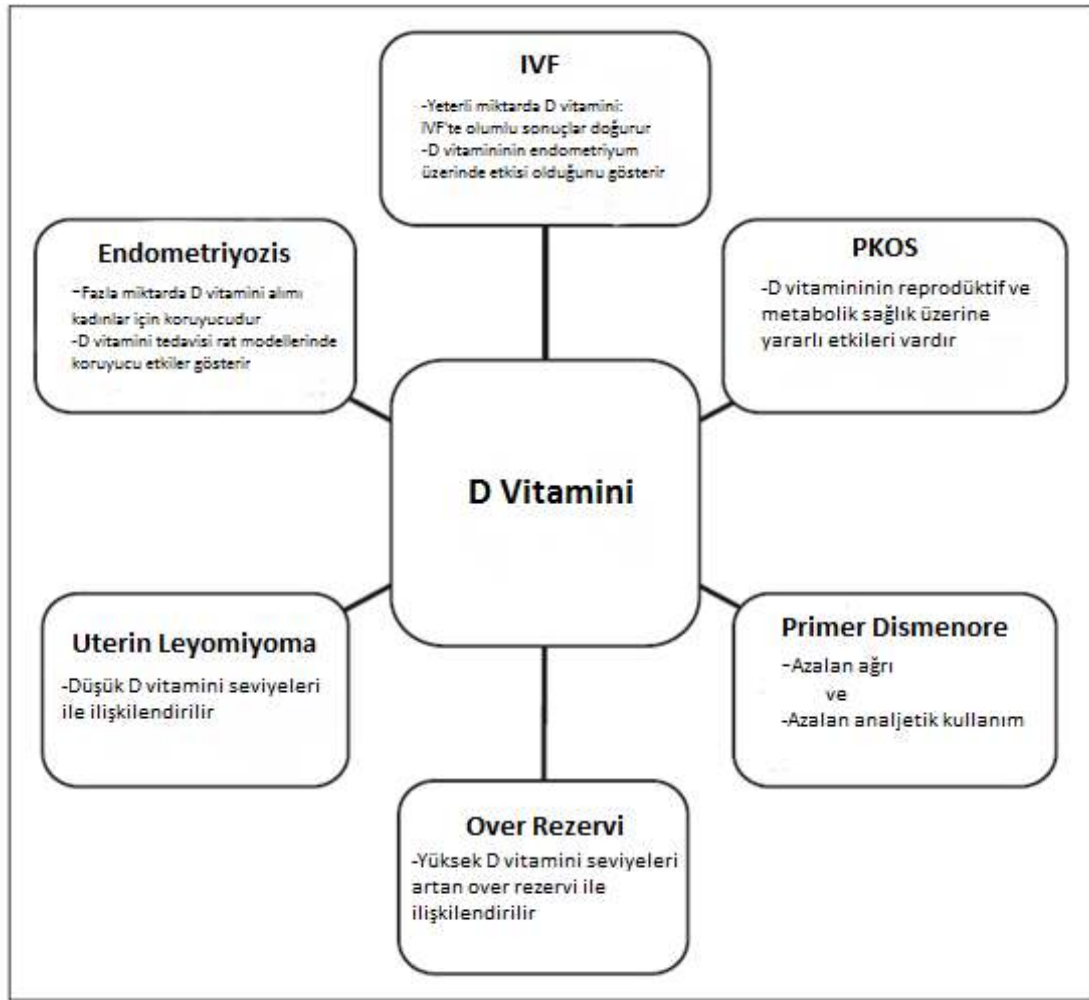
D vitamini, kemik mineralizasyonunun yürütülmesi, kalsiyum ve fosfor homeostazisinin sürdürülmesinde önemli role sahip steroid bir hormondur⁸. D vitamininin yaklaşık %80-90'ı deride, güneş ışığına maruz kalma yoluyla üretilir. Vücuttaki toplam D vitamininin az bir miktarı da diyet veya tamamlayıcı gıdalarla temin edilir⁵⁸. D vitamininin biyolojik aktivasyonları D vitamini reseptörleri (VDR) aracılığıyla yönetilir⁵⁹. D vitamini reseptörleri yaklaşık 2776 genomik pozisyonda eksprese olmaktadır ve 30'dan fazla farklı dokuda 229 genin ekspresyonunu modüle etmektedir. Bu dokular iskelet, beyin, meme, pankreas, paratiroid bezler, immün hücreler, kardiyomiyositler⁶⁰ yanında overler (özellikle granüloza hücreleri), uterus, plasenta ve testis gibi birçok üreme organlarını da kapsamaktadır⁵⁹. Bu yüzden D vitamini miktarında meydana gelebilecek herhangi bir eksiklik; glukoz homeostazisi, kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser, otoimmün hastalıklar ve fizyolojik bozukluklara neden olabileceği gibi⁶⁰, dişi üreme sistemi fizyolojisi üzerinde de çok çeşitli etkilere yol açabilir⁵⁹.

D vitamini eksikliği, üreme dönemindeki kadınlar arasında oldukça yaygın olup hayat tarzında meydana gelen değişimler, güneşe daha az maruz kalma ve obeziteden kaynaklanır⁵⁸. "Endocrin Society of North America" rehberliğindeki güncel bilgilere göre D vitamini eksikliği 20 ng/mL'nin altındaki 25 OH-D seviyeleri için tanımlanmıştır⁵⁹.

D vitamini ve kadın fertilitesi üzerine şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada in vitro fertilizasyon (IVF), PKOS, endometriyozis ve fertilité ile ilgili birtakım sağlık sorunları araştırılmıştır. D vitamininin IVF üzerindeki potansiyel rolü incelendiğinde; IVF tedavisi gören kadınlarda hamilelik oranlarının, D vitamini eksikliği olanlarda olmayanlara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Endometriyozisle ilişkisine bakıldığında ise yüksek D vitamini alımının düşük endometriyozis riski ile ilişkilendirilebileceği ve endometriyozisle ilgili çeşitli risk faktörleri için önemli bir tedavi kaynağı olabileceği saptanmıştır⁵⁸.

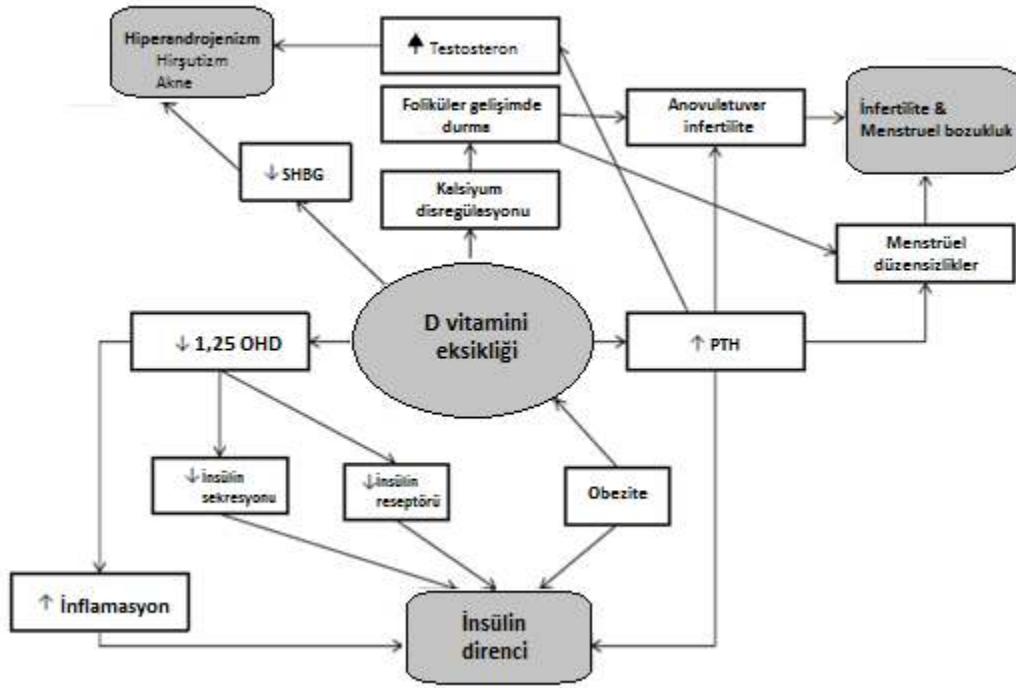
D vitamini ile PKOS'ndaki ovulatuvar disfonksiyonlar arasındaki ilişkiye bakıldığında; yapılan çalışmalarda, sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında PKOS'lu hastalarda D vitamini eksikliği olduğunu göstermiştir. Bir diğer bulgu ise D vitamini eksikliğinin, insülin direnci, obezite ve

metabolik sendrom gibi PKOS'nda sıklıkla gözlenen ve ovulatuvar disfonksiyon ile ilişkili bozukluklarda etken faktör olduğu yönündedir⁵⁹. Birçok çalışma serum 25OH-D değerleri ile insülin direnci, obezite ve serbest androjen değerleri arasında zıt bir ilişki olduğunu göstermiştir. D vitamini desteğinin insülin direncini tedavi ettiği ve serum androjen seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. Bunun yanında, obez adölesanlarda D vitamini takviyesinin insülin direncini belirgin ölçüde tedavi ettiği tespit edilmiştir⁵⁹.



Şekil 1. D vitamininin kadın fertilitesi üzerine etkileri⁵⁸.

D vitamininin insülin direnci üzerine tedavi edici etkisini glikoz metabolizması aracılığıyla gösterdiği düşünülmüştür. Bunu da insülin sentezi ve salınımını ve insülin reseptör ekspresyonunu artırarak veya insülin direncinin gelişiminde rol oynayan proenflamatuvar sitokinlerin supresyonunu sağlayarak yaptığı belirtilmektedir. Reprodüktif olarak, insülin direnci ovaryan androjen üretimini artırarak ve SHBG'yi azaltarak hiperandrojenizm gelişimine yol açmaktadır. Metabolik olarak ise insülin direnci; bozulmuş glikoz toleransı, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıkların oluşma riskinde artma ile ilişkilendirilir. Tip 2 diyabet riski insülin direncine bağlı olarak arttığından, PKOS ile tip 2 diyabet arasında ortak bağlantı olabileceği düşünülmüştür. PKOS'lu kadınlar genel olarak insülin direnci ve metabolik bozukluklar ile karşılaşmakta ve bu bozukluklar D vitamini metabolizması ile ilişkili olabileceğinden⁶¹, D vitamininin PKOS gelişiminde anahtar rol oynuyor olabileceği düşünülmektedir⁶⁰. D vitamini glikoz ve insülin metabolizmasını etkilemektedir ve düşük D vitamini seviyeleri, bozulmuş glikoz toleransı, insülin direnci ve tip 2 diyabet için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Düşük D vitamini konsantrasyonları serum paratiroid hormon (PTH) konsantrasyonlarında artışa yol açmakta ve PTH'daki artış glikoz metabolizmasında değişikliklere neden olmakta ve insülin sensitivitesini azaltmaktadır. Dolayısıyla D vitamininin, hücrelerde glikoz transportunu gerçekleştirmek amacıyla insüline cevap yeteneğini artırmak için insülin reseptör ekspresyonunu artırmakta olduğu düşünülmektedir⁶¹. İnsülin direnci ile benzer olarak, yapılan birçok çalışma serum 25(OH)D konsantrasyonlarının vücut kitle endeksi (BMI) ve vücut yağ oranı ile de negatif bir ilişki içerisinde olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak; D vitamini yetersizliği sonucu oluşan intrasellüler kalsiyum seviyesi değişikliklerinin PKOS'unda ovulatuvar disfonksiyona ve reprodüktif anormalliklere yol açabileceği düşünülmüştür⁶².



Şekil 2. D vitamini eksikliği ve PKOS patogenezindeki rolü⁶³.

D vitamininin foliküler gelişim üzerine etkilerine bakıldığında ise granüloza hücre luteinizasyonunu artırdığı tespit edilmiştir. Bu sayede progesteron üretimi artacak ve daha iyi bir endometriyal çevre sağlanacaktır⁵⁹.

İnsan granüloza lutein hücrelerinde D vitamini AMHRII ve FSHR gen ekspresyonlarını azaltmaktadır. Kadınlarda geç foliküler fazda, folikül seçilimini takiben folikül FSH'a daha az LH'a ise daha fazla bağımlı hale gelir ve son olarak maturasyon ve ovulasyon işlemi gerçekleşir. D vitamininin bunu hem AMHRII ve hem de FSHR'nin düzenlenmesinde görev alan ortak mekanistik yolları değiştirerek yaptığı düşünülmüştür⁵⁹.

D vitamini ile over rezervi arasındaki ilişkiye bakıldığında serumda D vitamini ile AMH arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Ayrıca D vitamini desteğinin serum AMH değerlerindeki mevsimsel değişiklikleri önlediği tespit edilmiş ve bunun üzerine yetişkinlerde AMH üretiminin D vitamini tarafından düzenleniyor olabileceği sonucuna varılmıştır⁵⁹.

Kadın fertilitesi yanında D vitaminin erkek üreme sistemi üzerindeki mevcut etkileri birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. D vitamini erkeklerde

spermatogenezis, semen kalitesi ve testikülopatilerin yanı sıra erkek hipogonadizmi ile ilişkilendirilebilmektedir⁸. D vitamininin erkek üreme sistemi üzerindeki rolü birçok hayvan çalışması ile desteklenmiş ve D vitamini eksikliği ile subfertilite veya gonadal disfonksiyon arasında bir ilişki tespit edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada D vitamini eksikliği görülen sıçanların kontrol gruplarına oranla azalmış fertilite gösterdikleri tespit edilmiştir. Yine D vitamini eksik erkek sıçanlarda çiftleşme başarısında %55 oranında azalma gözlenmiştir. Bunun yanında D vitamini eksikliği testiküler ve epididimal sperm sayısında azalma, Sertoli hücre fonksiyon bozukluğu, Leydig hücre sayısında azalma ve germinal epitelde dejeneratif değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir⁷. Yapılan insan çalışmalarında ise D vitamini eksikliği, spermatogenez, sperm motilitesi, sperm sayısı ve yapısında meydana gelen değişiklikler ve düşük testosteron konsantrasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında D vitamini tedavisinin total testosteron, biyoaktif testosteron ve serbest testosteron konsantrasyonlarını belirgin ölçüde artırdığı tespit edilmiştir⁷.

Şimdiye kadar yapılan gerek hayvan gerekse insan çalışmaları D vitamininin kadın ve erkek üreme sisteminde birçok fonksiyonda yararlı etkilere sahip olduğunu kanıtlamıştır⁷. Bu sonuçlar kadın ve erkek üreme bozukluklarının tedavisinde D vitamini desteğinin etkili olabileceği yönünde yeni terapötik yaklaşımlar ortaya koymaktadır⁸.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı

Sunulan çalışma, Çukurova Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (DETAUM) koşullarında yapılmıştır. Deney sürecindeki tüm işlemler ile kan ve doku örneklerinin alınışı etik kurul onayı ile veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir.

Deney kapsamında 24 adet 21 günlük sıçan kullanıldı. Bu amaçla, deneye başlanmadan önce ağırlıkları 200-250 gram olan Wistar albino türü, ergin 8 adet dişi ve 8 adet erkek sıçan DETAUM biriminden temin edildi. Dişi sıçanlar gebe bulunma olasılıklarına karşı, 21 gün süre ile erkek sıçanlardan izole edildi. Her dişi sıçan bir kafese konuldu. Kafeslerin içine altlık olarak talaş serildi ve her gün talaşları değiştirildi. Tüm hayvanlara su ve besin ad libidum olarak verildi. Ortam ısı $22\pm2^{\circ}\text{C}$ de sabit tutuldu. Havalandırma pencere tipi aspiratörle sağlandı. Aydınlık-karanlık döngüsü otomatik denetleyici bir aygıt yardımı ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Gebe olmadığı belirlenen dişi sıçanların erkek sıçanlarla çiftleşmeleri sağlanarak, sonrasında vajinal plak oluşumu izlendi. Vajinal plak oluşumu gözlenen dişilerin yanından erkek sıçanlar alınarak dişi sıçanların gebeliğin 0. gününde oldukları kabul edildi. Gebe olan dişilerin, 21 gün sonunda doğum yapmaları beklendi ve doğan yavrular cinsiyetlerine göre ayrıldı.

3.2. Deneyin Yapılışı

Deney kapsamına alınan dişi yavrular, anneleri ile aynı kafese konuldu ve doğdukları gün 0. gün olarak kabul edilerek 21 gün boyunca günlük takipleri ve bakımları aynı şartlarda yapıldı. Bu süre sonunda sıçanlar her biri 8 hayvandan oluşan 3 gruba ayrıldı:

1. Grupta yer alan yavrulara 28 gün boyunca her gün saat 10:00'da subkütan 0,2 ml susam yağı+0,01 ml %95 ethanol karışımı enjekte edilerek kontrol grubu olarak değerlendirildi.

2. Gruptaki yavrulara 28 gün boyunca her gün saat 10:00'da 6mg/kg DHEA (Sigma-Aldrich Co.) 0,2 ml susam yağı+0,01 ml %95 ethanol içinde çözdürülerek subkütan olarak enjekte edildi. Bu grup PKOS oluşturulan deney grubu olarak kabul edildi.
3. Gruptaki yavrulara 28 gün boyunca her gün saat 10:00'da sübkutan olarak 6mg/kg DHEA 0,2 ml susam yağı+0,01 ml %95 ethanol içinde çözdürülerek enjekte edilirken, haftada bir 120 ng/100gr 1,25(OH)₂D₃ (Calcijex 2mcg/ml I.V. Ampul, Abbott) enjeksiyonu gerçekleştirildi. Bu gruptaki hayvanlar PKOS tedavi grubu olarak kabul edildi.

Tüm gruptaki sıçanların her hafta 2 kez ağırlıkları ölçülerek doz değerlendirilmesi yapıldı.

3.3. Kan Örneklerinin Alınışı

28. gün saat 10.00'da ağırlıkları ölçülen sıçanlara 10mg/kg Ksilazin (Alfazyne %2, Atafen) ve 80 mg/kg Ketamin (Alfamine %10, Ege-Vet) intraperitoneal olarak verilerek anestezi uygulandı. Hayvanlar sırtüstü yatırıldıktan sonra hormonal tetkikler için enjektör yardımıyla intrakardiyak kan alınarak tüplere konuldu. Kanlar 3000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma kısımları ayrıldı. Serum kısmı ependorf tüplere alınarak kullanılacakları zamana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Serum örnekleri oda ısısında bekletilerek çalışma periyoduna getirildi. Serum örneklerinde FSH, LH, Testosteron değerlerinin ölçümünde "Epoch Biotek (USA)" cihazı kullanıldı. Serum FSH değerleri Double Antibody Sandwich, serum LH ve Testosteron değerleri ise "Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay" tekniği kullanılarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda analiz edildi.

3.4. Overlerin Eksizyonu

Kanları alınan hayvanların abdominal kavitesi derin bir insizyon ile açıldı. Overler ince bir forseps yardımı ile tutularak eksize edildi. Her sıçanın overlerinden biri ışık mikroskopik değerlendirme için %10'luk nötral formalin

içerisine alınırken, diğer over elektron mikroskopik inceleme için pH'sı 7,4 olan %5'lik glutraldehit içerisine konuldu.

3.5. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi

Işık mikroskopik incelemeler için alınan doku örnekleri %10'luk nötral formalin içerisinde 3 gün boyunca tespit edildi ve Leica TP 1020 ototeknikon cihazı ile Çizelge 1'de belirtilen doku takip yöntemi uygulandı.

Çizelge 1. Işık mikroskopik doku takip işlemi

Oda sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Bloklanan dokulardan mikrotom yardımı ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Olympus BX53 ışık mikroskopunda incelenerek histolojik özellikleri değerlendirildi ve resimleri çekildi. Ayrıca her bir over bloğundan 50 mikronda bir, her bir hayvan için 5 alandan alınan seri kesitlerde primer, sekonder, atretik ve kistik folliküller ile korpus luteum sayıldı. Foliküllerin gelişim aşamasını belirleme kriterleri; primer oosit ile etrafında tek veya çok tabakalı granüloza hücrelerinden oluşan foliküller primer, primer oosit ve etrafındaki çok katlı granüloza hücreleri arasında antrum boşluklarının görüldüğü foliküller sekonder, antrum gelişimini tamamlamış ve oositin içine gömülmüş olduğu kumulus ooforus yapısı ile karakterize foliküller ise tersiyer folikül olarak değerlendirildi.

3.6. Elektron Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi⁶⁴

Elektron mikroskopik değerlendirme amacıyla alınan over dokuları dişçi mumu ile kaplı petri kaplarında 1mm³ büyüklükte parçalara ayrılarak, Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %5'lik gluteraldehit solüsyonunda 4 saat boyunca tespit edildi. Dokular Millonig fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika yıkandı ve aynı tampon içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik osmium tetraoksit solüsyonu ile ikinci defa tespit edildi ve yine fosfat tamponu ile iki kez yıkandı. Dokular daha sonra Çizelge 2'de belirtildiği gibi dehidrate edilerek, gömme materyali içerisinde immerse edildi.

Çizelge 2. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon, şeffaflandırma ve immersiyon işlemi

%50'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%70'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%86'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%96'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları yeni hazırlanmış gömme materyali olan resin (Çizelge 3) içerisinde bir gece boyunca rotatorda dönmeye bırakıldı.

Çizelge 3. Gömme materyalinin hazırlanışı

Araldite CY 212	20 ml
Sertleştirici HY 964	20 ml
Hızlandırıcı DY 064	0,6 ml
Plastikleştirici-Dibütil Fitalat	1 ml

Bir gün sonra doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak Beem kapsüllere gömüldü ve 60°C etüvde 48 saat polimerize edildi. Elde edilen bloklar daha sonra etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve belirlenen alanlardan 500 Å kesitler alındı. Kesitler bakır gridlere dizildi ve % 70'lik alkolde doymuş uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu ile incelendi.

3.7. İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamındaki 3 gruba ait vücut ağırlıkları, biyokimyasal analiz sonuçları, overlerdeki primer, antral, tersiyer, atretik, kistik follikül ve korpus luteum sayılarının istatistiksel analizleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu test edilmiş olup, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin analizinde ise Mann-Whitney U, Kruskal Wallis ve Friedman testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma, medyan (min-max), n ve yüzde olarak ifade edilerek p değerinin <0,05 olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Hayvan Ağırlıkları

Deney öncesi ve sonrasında tüm hayvanların ağırlıkları ölçülerek karşılaştırıldığında her 3 grupta da vücut ağırlıklarının anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Çizelge 4).

Çizelge 4. Deneyin başlangıcı ve bitiminde kontrol ve deney grubundaki sıçanların ağırlık (gr) ortalamaları ve standart sapmaları.

	Hayvan Ağırlığı		P değeri (önce ve sonra karşılaştırması)
	Ort±SS Medyan(min-max)		
	Önce	Sonra	
Kontrol grubu (n=8)	17,75±0,46 18(17-18)	54,12±6,44 53,5(44-62)	0,0001
PKOS grubu (n=8)	27,25±2,43 28(23-31)	48,12±7,73 49 (37-63)	0,0001
Tedavi grubu (n=8)	27,75±1,16 28 (25-29)	52,12±9,67 51,5 (38-68)	0,0001

*Kruskal Wallis Test, ** Mann Whitney U test

4.2. Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda tüm gruplardaki sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen FSH, LH ve testosteron değerleri ve LH/FSH oranları karşılaştırıldı.

Serum FSH medyan değerinin PKOS grubunda (med:8,4 min:7,8-max:9,9) kontrol grubuna (med:7,2 min:5,8 max:8,8) göre anlamlı olarak arttığı ($p=0,031$), tedavi grubunda (med:7,4 min:6,3 max: 8,4) ise PKOS grubuna göre düştüğü ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu saptanmış olup ($p=0,004$); tedavi grubu ile kontrol grubu medyan değeri arasında ise istatistiksel olarak fark olmadığı ($p=0,958$) ve tedavi sonunda elde edilen değer kontrol grubu değerine yaklaştığı görüldü (Şekil 3).

Serum LH medyan değerinin PKOS grubunda (med:60,3 min:43

max:110,8) kontrol grubuna göre (med:6,7 min:3,7 max:9,9) anlamlı olarak arttığı ($p=0,001$), tedavi grubunda (med:43,3 min:23,4 max:60,0) ise PKOS grubuna göre düştüğü ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu saptandı ($p=0,021$). Ayrıca tedavi sonunda elde edilen değer ile kontrol grubu medyan değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p=0,001$) gözlemlendi (Şekil 4).

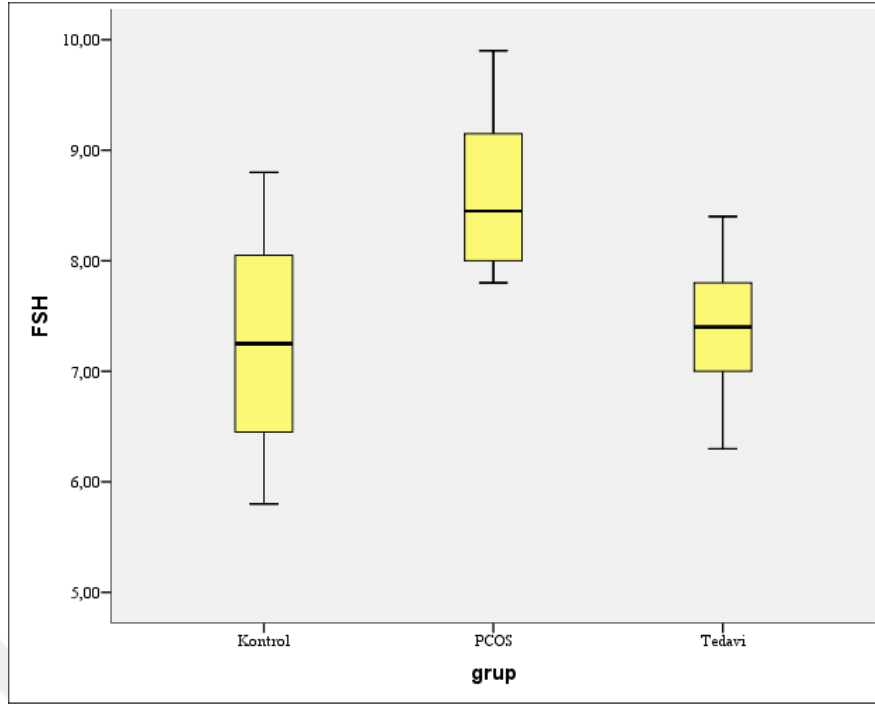
Serum testosteron medyan değerinin PKOS grubunda (med:13,5 min:2,4 max:25,6) kontrol grubuna göre (med:0,5 min:0,4 max:0,9) anlamlı olarak arttığı ($p=0,001$), tedavi grubunda (med:4,4 min:2,4 max:9,7) ise PKOS grubuna göre düştüğü ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu saptandı ($p=0,010$). Kontrol grubu ile tedavi grubu medyan değeri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p=0,001$) gözlemlendi (Şekil 5).

Serum LH/FSH medyan değerinin PKOS grubunda (medyan:7,1 min:5 max:11,6) kontrol grubuna (medyan:0,9 min:0,5 max:1,5) göre anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0,001$). Tedavi grubunda ise LH/FSH medyan değerinin (medyan:5,7 min:2,8 max:8,5) PKOS grubuna göre azaldığı fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0.248$) saptanmış olup; tedavi grubu ile kontrol grubu medyan değeri arasında hala anlamlı bir fark olduğu ($p=0,001$) gözlemlendi (Şekil 6).

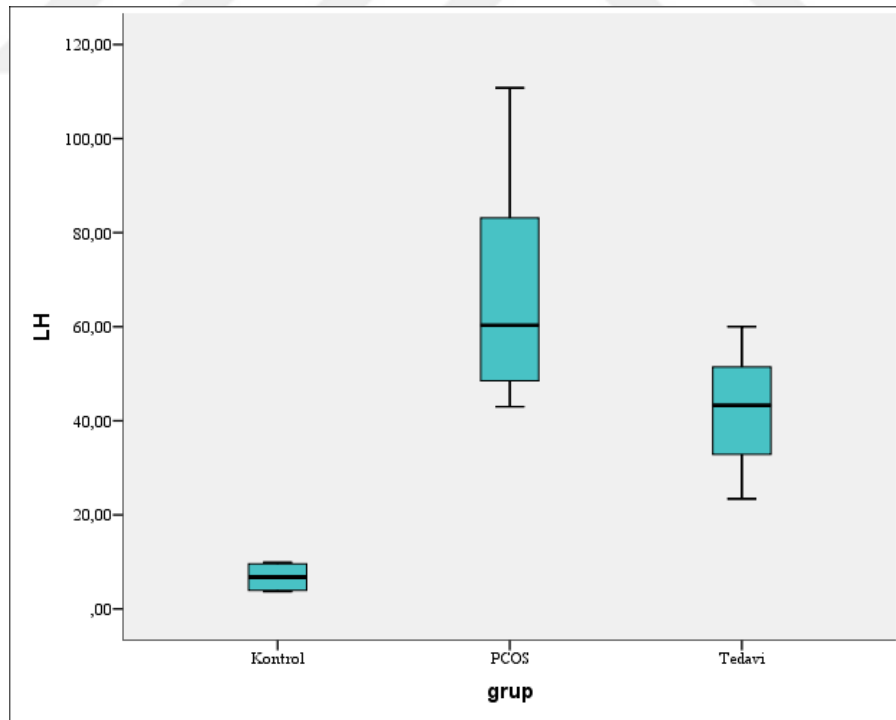
Çizelge 5. Gruplara göre FSH, LH, LH/FSH ve testosteron dağılımları.

	Ort±SS			
	Medyan(min-max)			
	FSH	LH	LH/ FSH	Testosteron
Kontrol grubu (n=8)	7,26±1,05 7,25(5,8-8,8)	6,78±3,01 6,75(3,7-9,9)	0,94±0,41 0,9(0,5-1,5)	0,61±0,17 0,56(0,47-0,98)
PKOS grubu (n=8)	8,61±0,78 8,45(7,8-9,9)	67,21±23,93 60,3(43-110,8)	7,75±2,49 7,1(5-11,6)	13,74±9,51 13,55(2,43-25,6)
Tedavi grubu (n=8)	7,39±0,66 7,4(6,3-8,4)	42,33±12,26 43,3(23,4-60)	5,84±1,96 5,7(2,8-8,5)	4,96±2,52 4,45(2,40-9,70)
P değeri				
3 grup karşılaştırması *	0,014	0,0001	0,0001	0,0001
PKOS - Tedavi**	0,004	0,021	0,248	0,010
PKOS - Kontrol**	0,031	0,001	0,001	0,001
Kontrol - Tedavi**	0,958	0,001	0,001	0,001

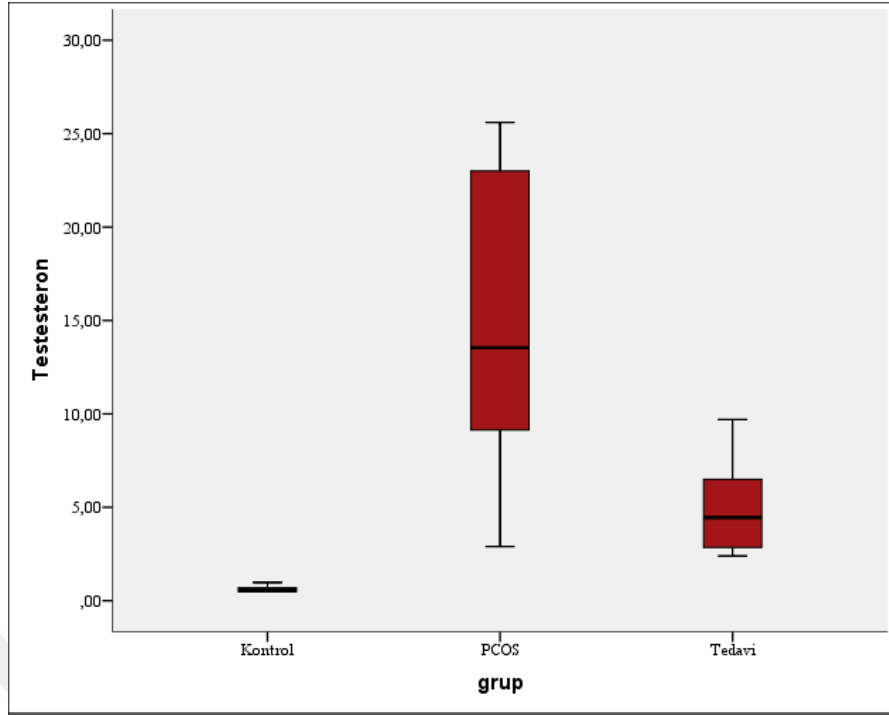
*Kruskal Wallis Test, ** Mann Whitney U test



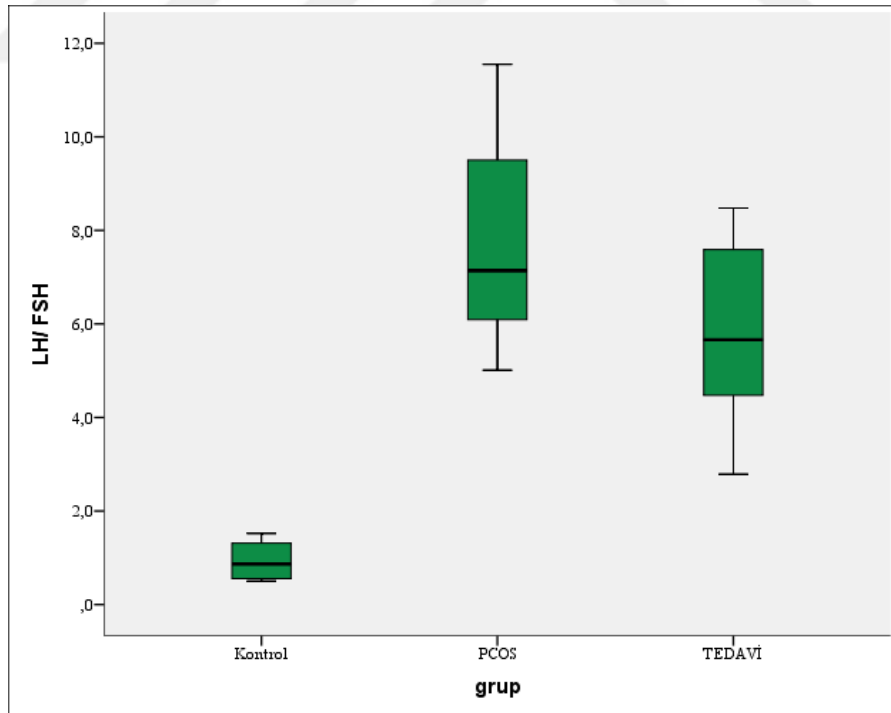
Şekil 3. Gruplara ait serum FSH değerleri.



Şekil 4. Gruplara ait serum LH değerleri.



Şekil 5. Gruplara ait serum testosteron değerleri.



Şekil 6. Gruplara ait serum LH/FSH değerleri.

4.3. Işıık Mikroskopik Bulgular

Folikül sayımı sonucu, primer ve sekonder folikül sayılarının kontrol, PKOS ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediğı saptandı. Tersiyer folikül sayısı medyan değerinin ise PKOS grubunda (med:0,5 min:0 max:0,2) kontrol grubuna (med:0,6 min:0 max:1) göre anlamlı olarak azaldığı ($p=0,008$); tedavi uygulanan grupta (med:0,5 min:0 max:1,6) ise PKOS grubuna göre arttığı ve aralarında anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p=0,030$). Atretik folikül sayısı medyan değerinin PKOS grubunda (med:10,7 min:7,2 max:12,8) kontrol grubuna (med:4,7 min:3,6 max:5,8) göre anlamlı olarak arttığı ($p=0,001$), tedavi grubunda (med:4,8 min:3,6 max:6,4) ise PKOS grubuna göre azaldığı ve kontrol grubuna yakın bir değere ulaştığı gözlemlendi. Kistik folikül sayısı medyan değerinin PKOS grubunda (med:1,6 min:1 max:2,8) kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdiği, tedavi uygulanan grupta (med:0,4 min:0 max:1) ise PKOS grubuna göre anlamlı derecede azalmakla birlikte ($p=0,001$) kontrol grubuna göre hala yüksek olduğu gözlemlendi. Korpus luteum sayısında da gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Çizelge 6).

Çizelge 6. Gruplara göre primer, sekonder, tersiyer, atretik, kistik foliküller ve korpus luteum dağılımları.

	Ort±SS Medyan(min-max)					
	Primer	Sekonder	Tersiyer	Atretik	Kistik	Korpus luteum
Kontrol grubu (n=8)	10,2±4,28 9,90(5,0-17,4)	3,4±0,92 3,60(2,2-4,4)	0,6±0,35 0,6(0-1)	4,7±0,78 4,7(3,6-5,8)	0±0 0(0-0)	0,4±0,49 0(0-0,1)
PKOS grubu (n=8)	11,1±2,51 11,70(7,4-14,2)	4,2±1,05 4,6(2,2-5,2)	0,1±0,1 0,5(0-0,2)	10,2±1,94 10,7(7,2-12,8)	1,7±0,63 1,6(1-2,8)	0,3±0,46 0(0-0,1)
Tedavi grubu (n=8)	9,4±2,15 8,4(7,4-13,16)	3±1,1 3,4(1,8-4,8)	0,7±0,59 0,5(0-1,6)	4,9±1,0 4,8(3,6-6,4)	0,5±0,4 0,4(0-1)	0,5±0,83 0(0-2)
P değeri						
3 grup karşılaştırması *	0,580	0,061	0,021	0,0001	0,0001	0,824
PKOS-Tedavi**	0,269	0,034	0,030	0,001	0,001	0,523
PKOS-Kontrol**	0,493	0,092	0,008	0,001	0,0001	0,699
Kontrol-Tedavi**	0,793	0,313	0,873	0,525	0,004	0,856

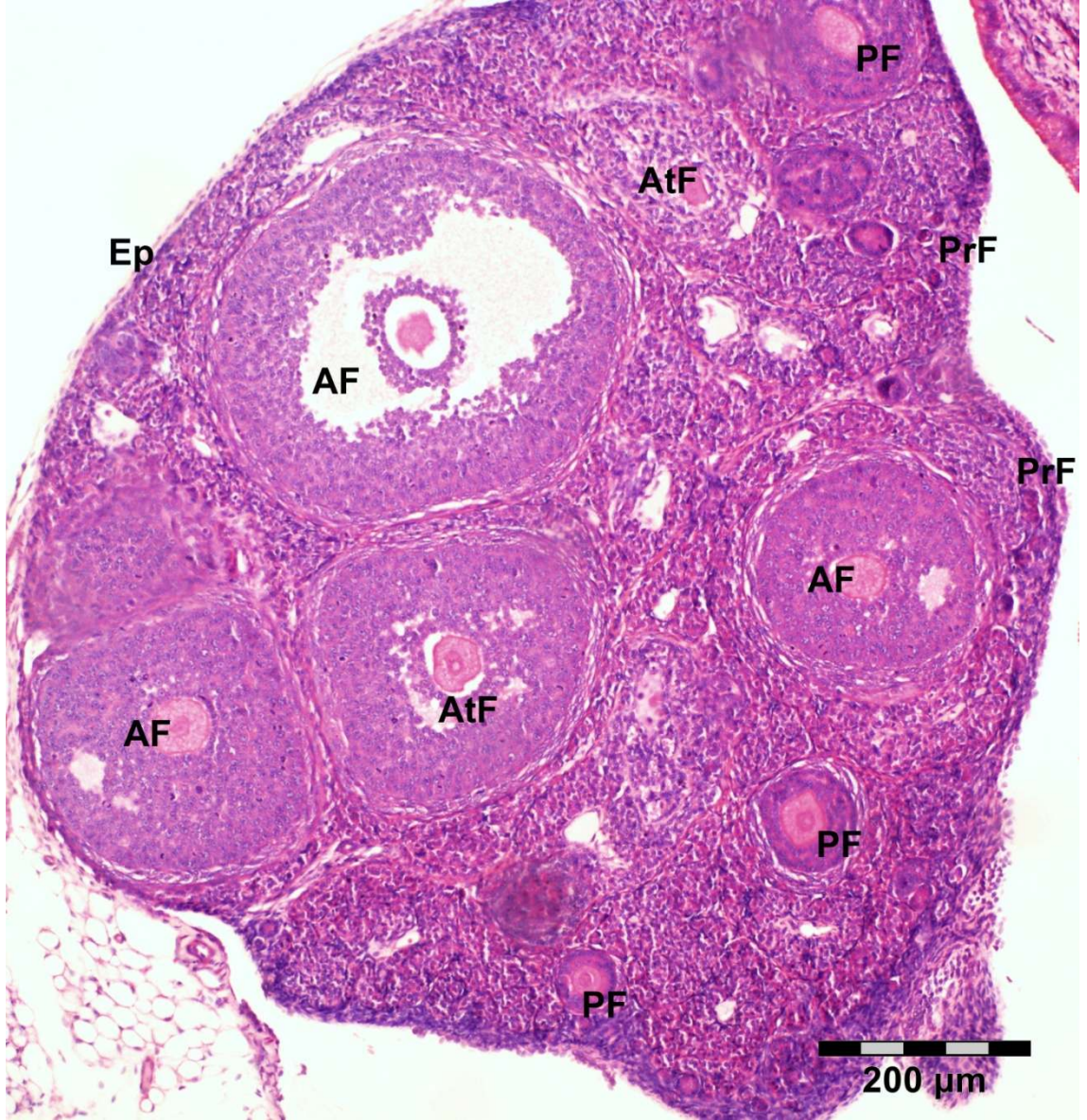
*Kruskal Wallis Test, ** Mann Whitney U testi.

4.3.1. 1.Grup

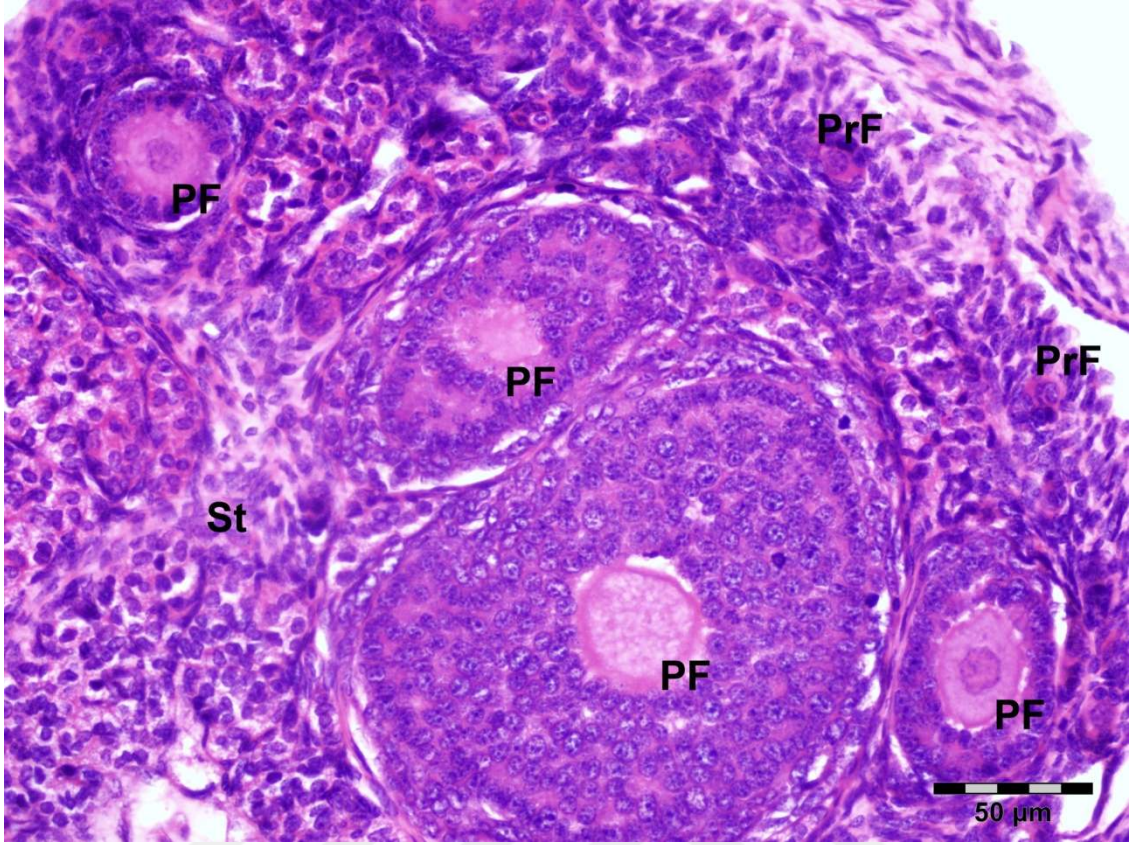
Kontrol grubundan elde edilen over kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde yüzeyin tek katlı kübik ve yer yer yassı hücrelerden oluşmuş epitel tabakası ile örtülü olduğu izlendi. Yüzey epitelinin altında sıkı bağ dokusundan oluşmuş tunika albuginea bulunmaktaydı. Tunika albugineanın altında uzanan kortekste, kompakt hücresel stroma içerisinde, çok sayıda primordiyal foliküller ile gelişim sürecinin daha ileri aşamalarındaki foliküller izlenmekteydi. Veziküler çekirdekli oosit ve onu çevreleyen tek tabakalı yassı foliküler hücrelerden oluşan çok sayıda küçük primordiyal foliküller gruplar halinde korteksin dış kısımlarında yerleşim göstermekteydi. Gelişmekte olan foliküllerin büyük bir kısmını oluşturan primer foliküller, veziküler bir çekirdek ve eozinofilik boyanmış sitoplazmaya sahip bir primer oosit ile oositin dışında, homojen görünümlü zona pellusida ve tek veya çok katlı kübik şekilli granüloza hücreleri içermekteydi. Korteks içerisinde yer alan sekonder ve daha ileri gelişim aşamasındaki foliküller de normal histolojik yapıya sahiptilerdi. Merkezi yerleşimli oosit etrafındaki çok katlı granüloza hücreleri arasında küçük

boşlukların belirdiği antral foliküller yanında, antrum gelişimini tamamlamış, ekzentrik yerleşimli primer oositler, antral kaviteyi saran granüloza hücreleri ve bunun dışındaki teka interna ve eksterna tabakalarından oluşan farklı büyüklükteki tersiyer foliküller izlenmekteydi. Normal yapıya sahip gelişen foliküllerin yanında, atretik değişiklikler gösteren foliküller de korteks içinde yer almaktaydı. Atretik foliküllerde granüloza hücrelerinde çekirdek densitesinin arttığı ve foliküllerin antrumlarında serbest halde granüloza hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi. İç kısımda yer alan ve kortekse göre daha ince olan medulla tabakasının çok sayıda geniş kan damarları içeren, gevşek, fibroelastik bağ dokusundan meydana gelmiş olduğu görüldü (Şekil 7, 8, 9).

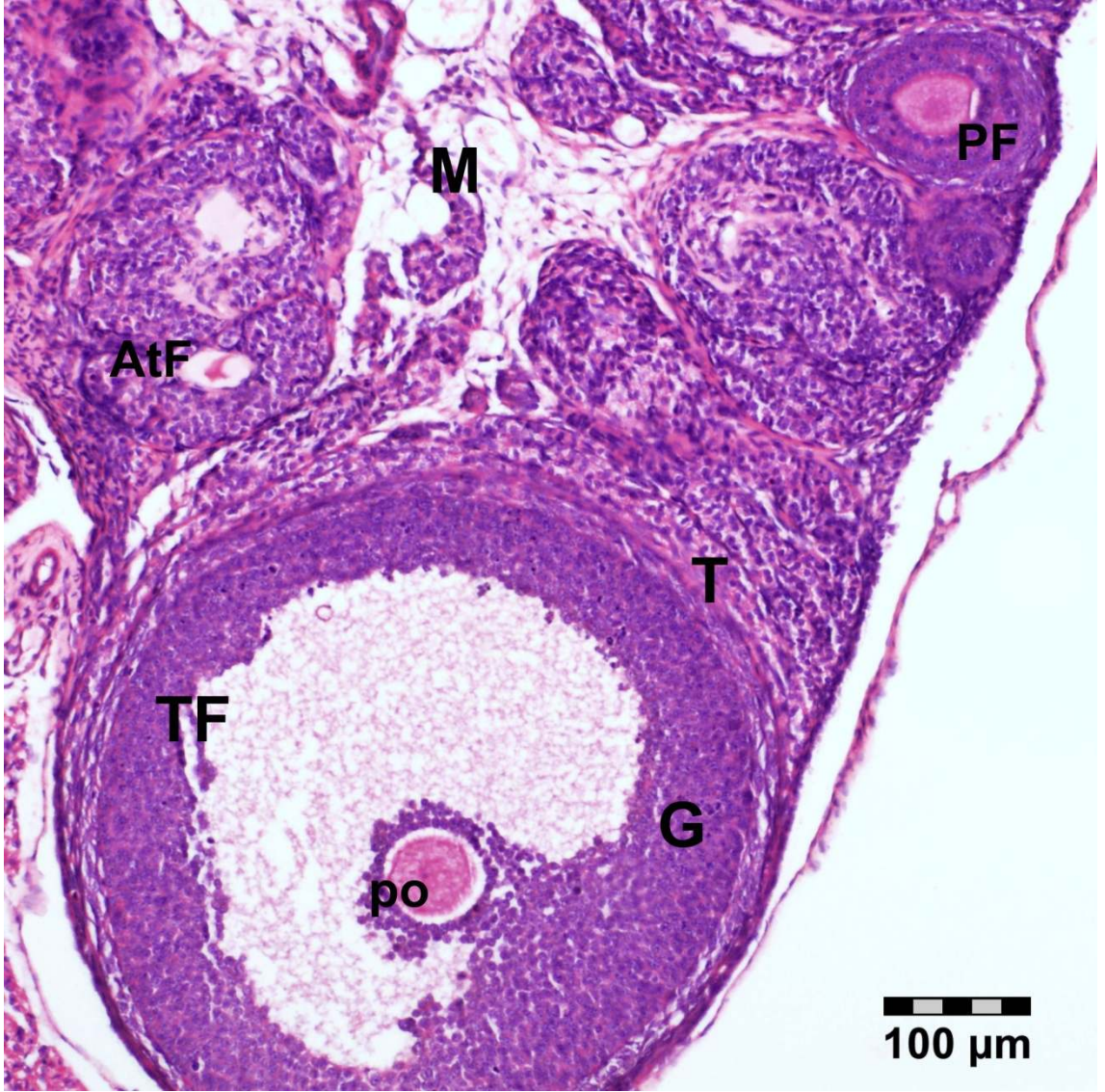




Şekil 7. 1. Grup. Kontrol grubuna ait overlerin dış yüzeyinde, tek katlı epitel hücreleri (Ep), primordiyal foliküller (PrF), gelişimin farklı evrelerindeki primer foliküller (PF) ve antral foliküller (AF) ile atretik foliküller (AtF) ve fibroelastik bağ dokudan oluşmuş medulla yapısı izlenmekte (M). Bar=200µm.



Şekil 8. 1. Grup (Kontrol grubu). Kortekste stroma (St) içerisinde yerleşim gösteren primordiyal foliküller (PrF), tek veya çok katlı granüloza hücre tabakasına sahip primer foliküller (PF) izlenmekte. Bar=50µm.



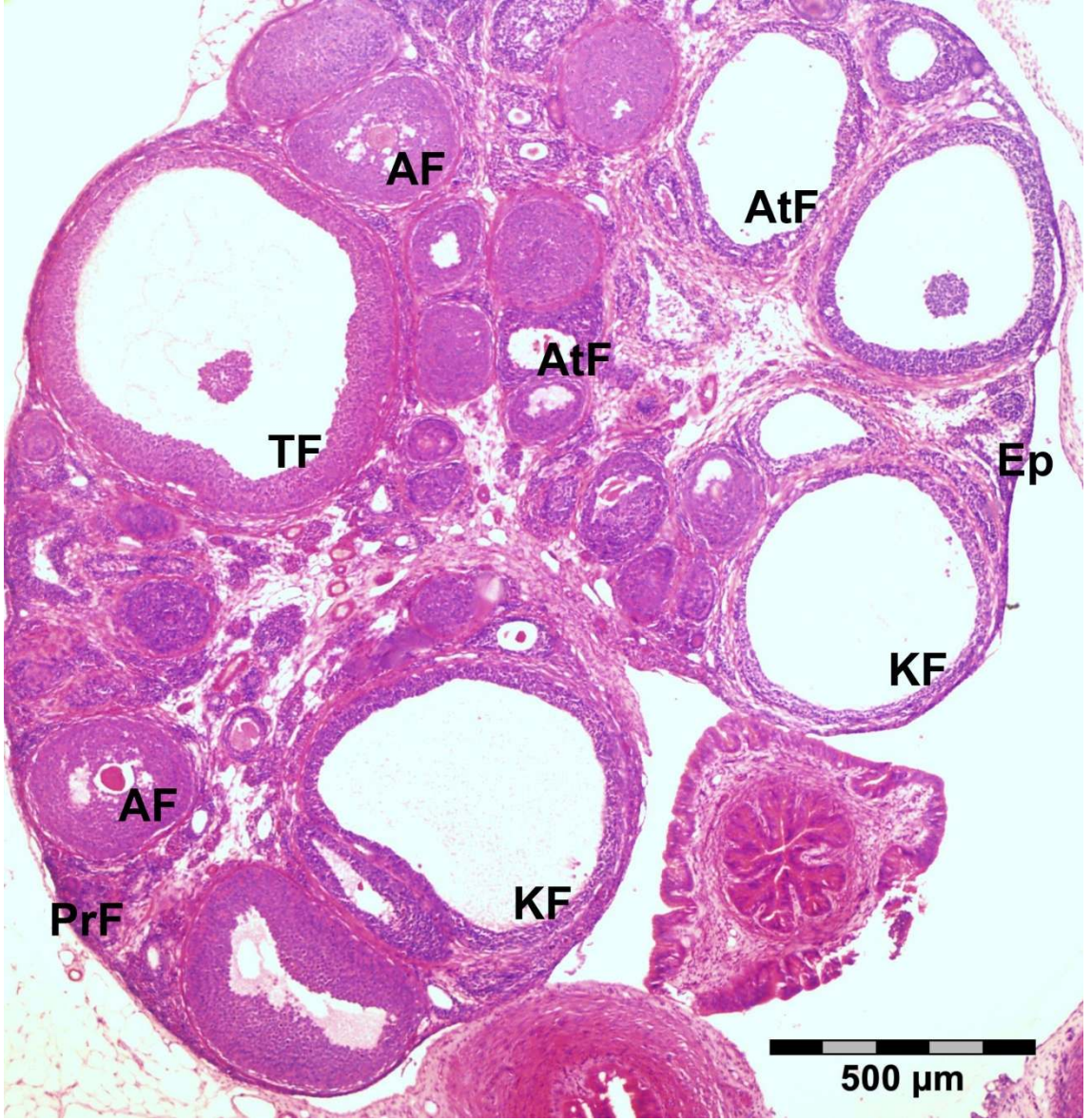
Şekil 9. 1. Grup (Kontrol grubu). Gelişimin farklı evrelerindeki primer foliküller (PF) ile primer oosit (po), çok katlı granüloza hücre tabakası (G) ve çevresindeki teka tabakası (T) ile antrum gelişimini tamamlamış tersiyer folikül (TF) ve atretik foliküller (AtF) izlenmekte. Medulla (M). Bar=100µm.

4.3.2. 2.Grup

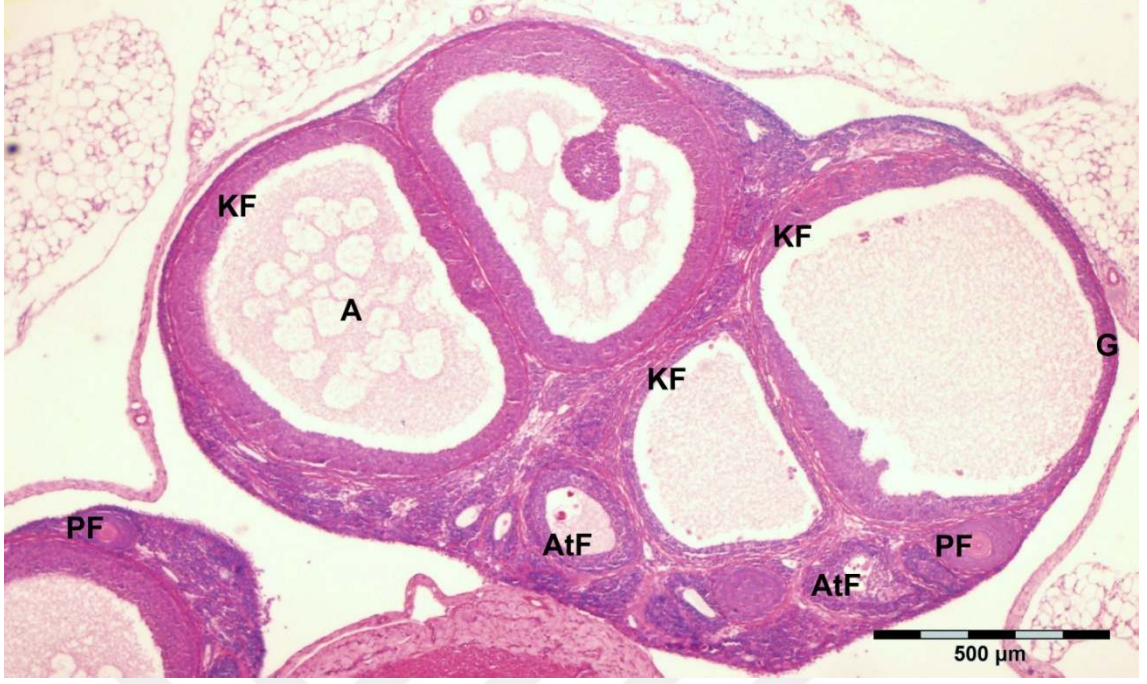
Polikistik over sendromu oluşturulmuş deney grubuna ait over kesitleri incelendiğinde; yüzeyde tek katlı kübik ve yer yer yassı hücrelerden oluşmuş bir epitel tabakası ve altında yerleşen sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea normal olarak izlendi. Tunika albugineanın altında uzanan korteksin dış kısmında gruplar halinde yerleşim gösteren, primer oosit ve onu saran yassı şekilli foliküler hücrelerden oluşan primordiyal foliküllerin normal yapıda olduğu gözlemlendi. Primordiyal foliküller yanında kortekste gelişimin farklı evrelerinde, değişik büyüklükte normal morfolojiye sahip foliküller ile atretik foliküllerin ve normal histolojik özelliklerini kaybetmiş çok sayıda kistik foliküllerin varlığı da izlendi. Medulla tabakası kontrol grubuna benzer şekilde kan damarlarından zengin fibroelastik bağ dokusu yapısındaydı (Şekil 10).

Normal histolojik özelliklere sahip gelişen foliküllerde merkezi yerleşimli oosit ve onu saran tek ya da çok katlı kübik şekilli foliküler hücreler kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydi. Bazı foliküllerde ise, granüloza hücrelerinin birbirleri ile olan ilişkilerini yitirerek antral boşluğa döküldüğü gözlemlendi. Atretik foliküllerde merkezi yerleşimli oositin sınırlarının düzensizleştiği, granüloza hücrelerinin densitelerinin arttığı izlendi (Şekil 11).

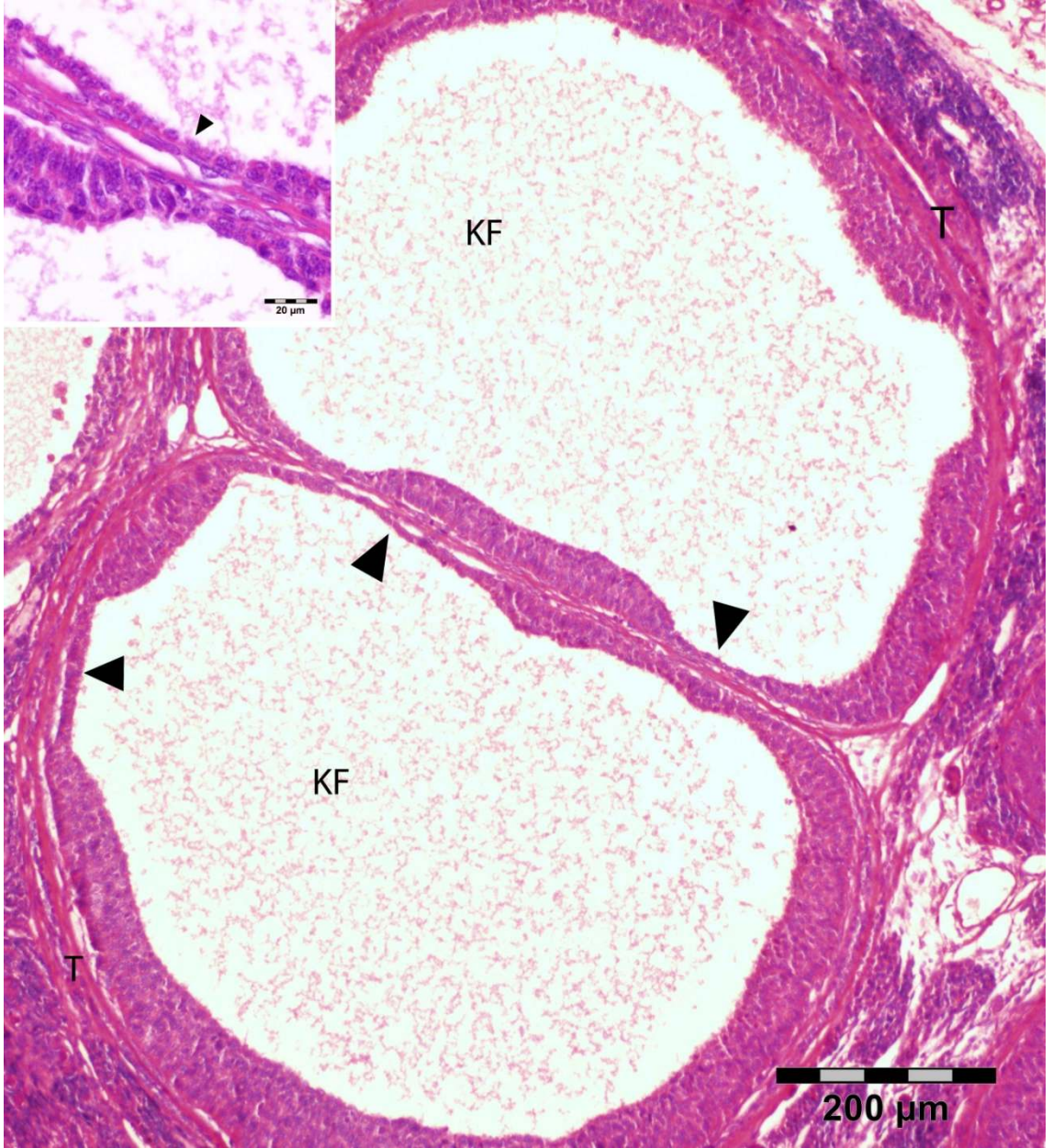
Kesitlerde izlenen çok sayıdaki kistik folikülde; antrumun oldukça genişlediği, granüloza tabakasının belirgin şekilde incelerek bazı bölgelerde 2-3, bazı alanlarda ise tek hücre tabakası halinde düzenlendiği ve antruma komşu granüloza hücrelerinin yassılaştığı gözlemlendi. Teka tabakasının oldukça belirginleştiği kistik foliküllerde oosit ve korona radyata yapıları izlenmedi (Şekil 12). Kistik formasyona geçiş aşamasındaki bazı foliküllerin antrumlarında makrofajların bulunduğu da görüldü (Şekil 13).



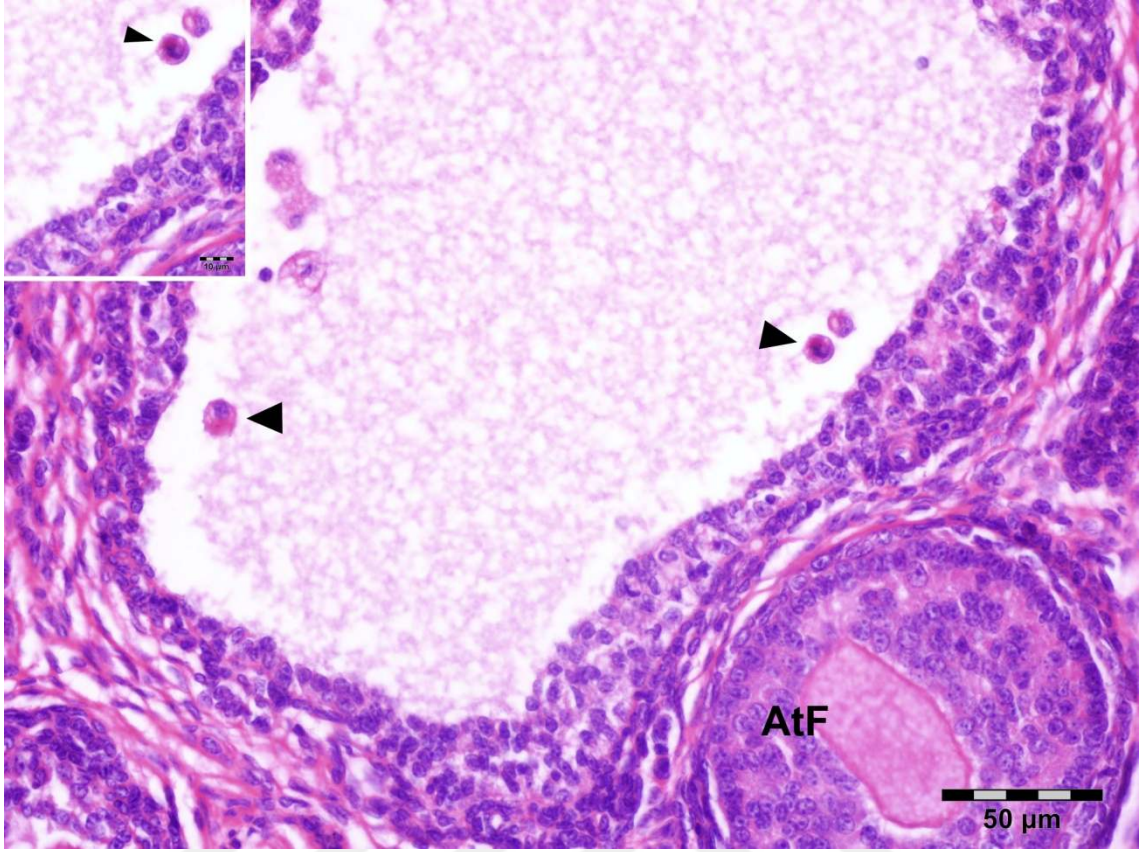
Şekil 10. 2. Grup (PKOS grubu). Over yüzey epitelinin (Ep) altında primordiyal foliküller (PrF), primer foliküller (PF), antral foliküller (AF), tersiyer folikül (TF) ve atretik foliküller (AtF) ile granüloza hücre tabakaları incelmış kistik yapıdaki foliküller (KF) gözlenmekte. Bar=500µm.



Şekil 11. 2. Grup (PKOS grubu). Normal yapıdaki primer foliküller (PF), atretik foliküller (AtF) ve antrumları (A) oldukça genişlemiş, granuloza hücre tabakaları (G) incelmış çok sayıda kistik folikül (KF) izlenmekte. Bar=500µm.



Şekil 12. 2. Grup (PKOS grubu). Granüloza hücre tabakasının oldukça incelerek bazı alanlarda tek katlı hale geldiği (ok başları), teka tabakaları belirgin (T), oldukça büyük çaplı kistik foliküller (KF) izlenmekte. Bar=200µm. **İnset;** Kistik folikül duvarındaki tek katlı granüloza hücre tabakası. Bar=20 µm.



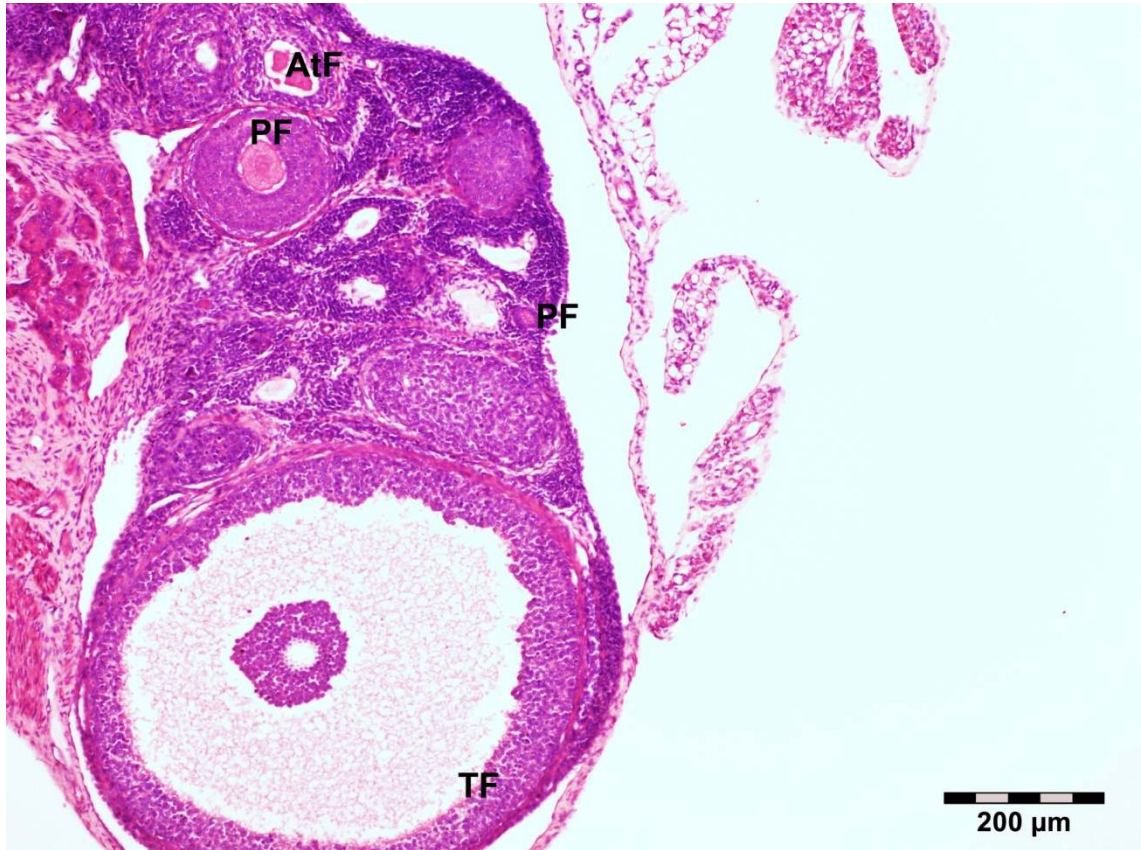
Şekil 13. 2. Grup (PKOS grubu). Kistik folikül duvarında yer yer oldukça incelmış granüloza hücre (GH) tabakası ve etrafında kalınlaşmış teka tabakası (T) ve antrumunda makrofajlar görülmekte. Primer folikül (PF). **İnset;** Kistik folikülün antrumundaki makrofajlar (ok başı).

4.3.3. 3.Grup

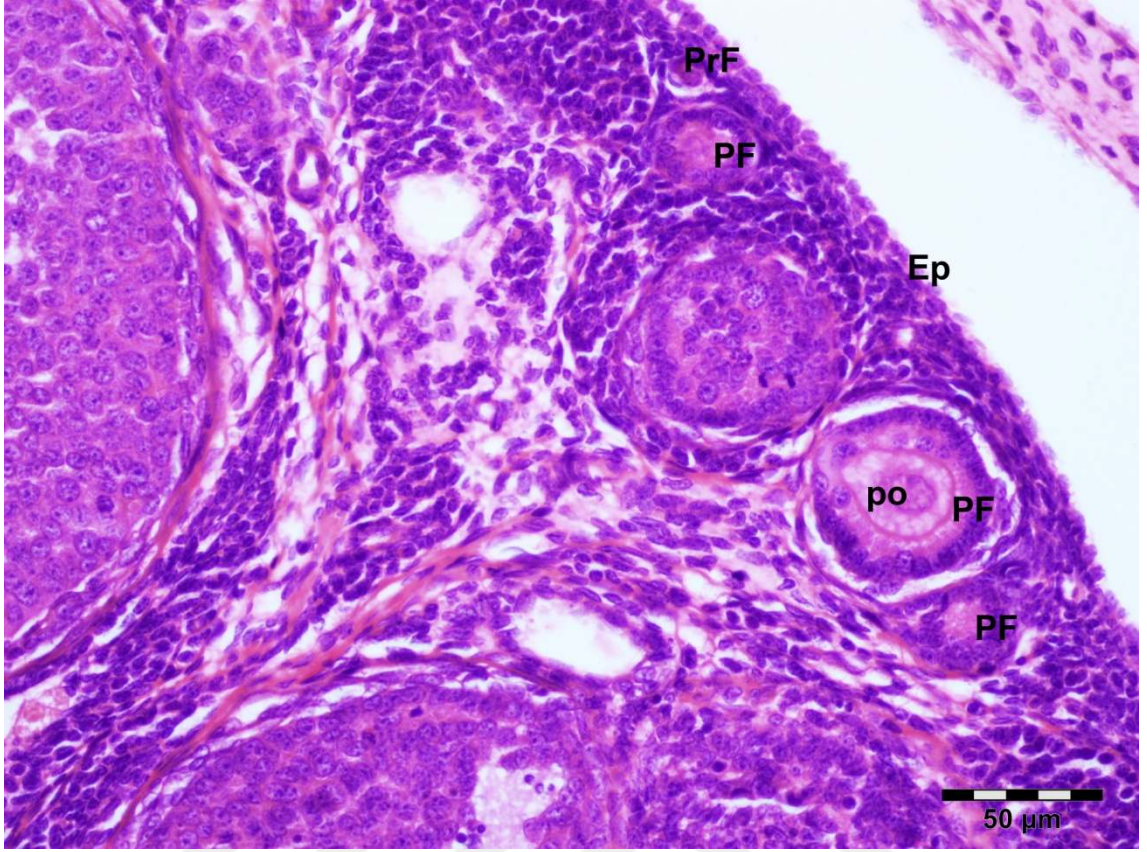
D vitamini verilen tedavi grubuna ait over kesitlerinin incelenmesinde; normal yapısal özelliklere sahip yüzey epiteli ve altında tunika albuginea tabakası izlenirken, kortekste çok sayıda normal yapıda primordiyal ve gelişen foliküller yanında, normal histolojik özelliklerini kaybetmiş, atretik ve az sayıda kistik yapıda foliküllerin varlığı dikkati çekti. Medulla tabakasında kan damarları içeren fibroelastik yapıda bağ dokusu normal histolojik yapısını korumaktaydı (Şekil 14).

Gruplar halinde izlenen, merkezi yerleşimli oosit ve onu saran yassı foliküller hücrelerden oluşan primordiyal foliküller yanında tek katlı kübik yapıda granüloza hücreleri ile sarılmış primer oositlerden oluşan primer foliküller de görülmekteydi (Şekil 15). Bazı kesitlerde kortekste büyük, soluk boyanan

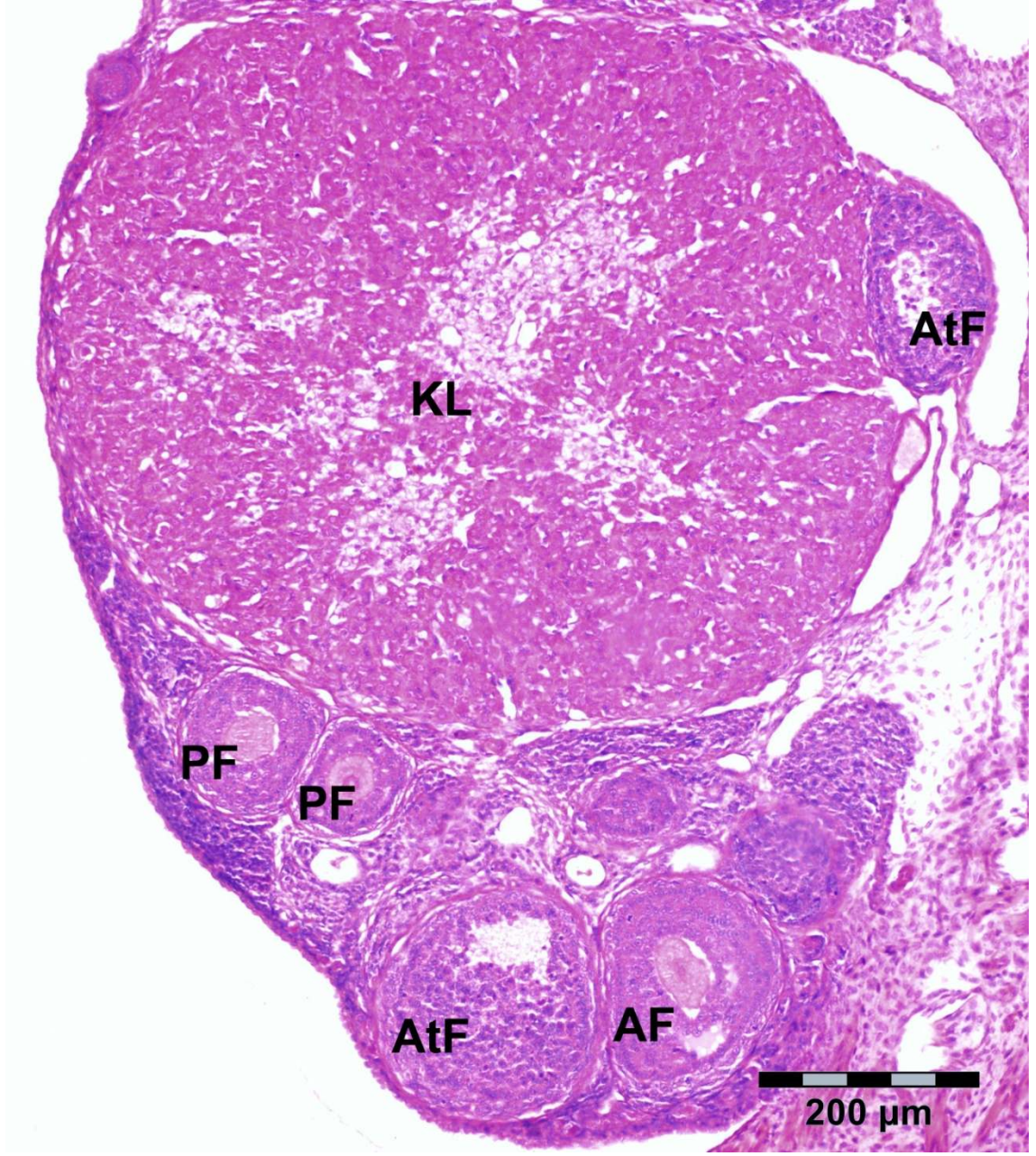
veziküler çekirdeğe sahip luteinize hücrelerin oluşturduğu korpus luteum yapıları da izlendi. Atretik foliküllerde ise oosit sınırlarının düzensizleştiği ve granüloza hücrelerinin çekirdeklerinde piknotik değişiklikler geliştiği gözlemlendi (Şekil 16). Kesitlerde 2. gruba göre kistik yapıdaki foliküllerin sayıca daha az olduğu ve çaplarının küçüldüğü gözlemlendi. Kistik yapıdaki bu foliküllerde granüloza hücre tabakasının kalınlığı bazı alanlarda daha belirgin olmak üzere azalmıştı (Şekil 17).



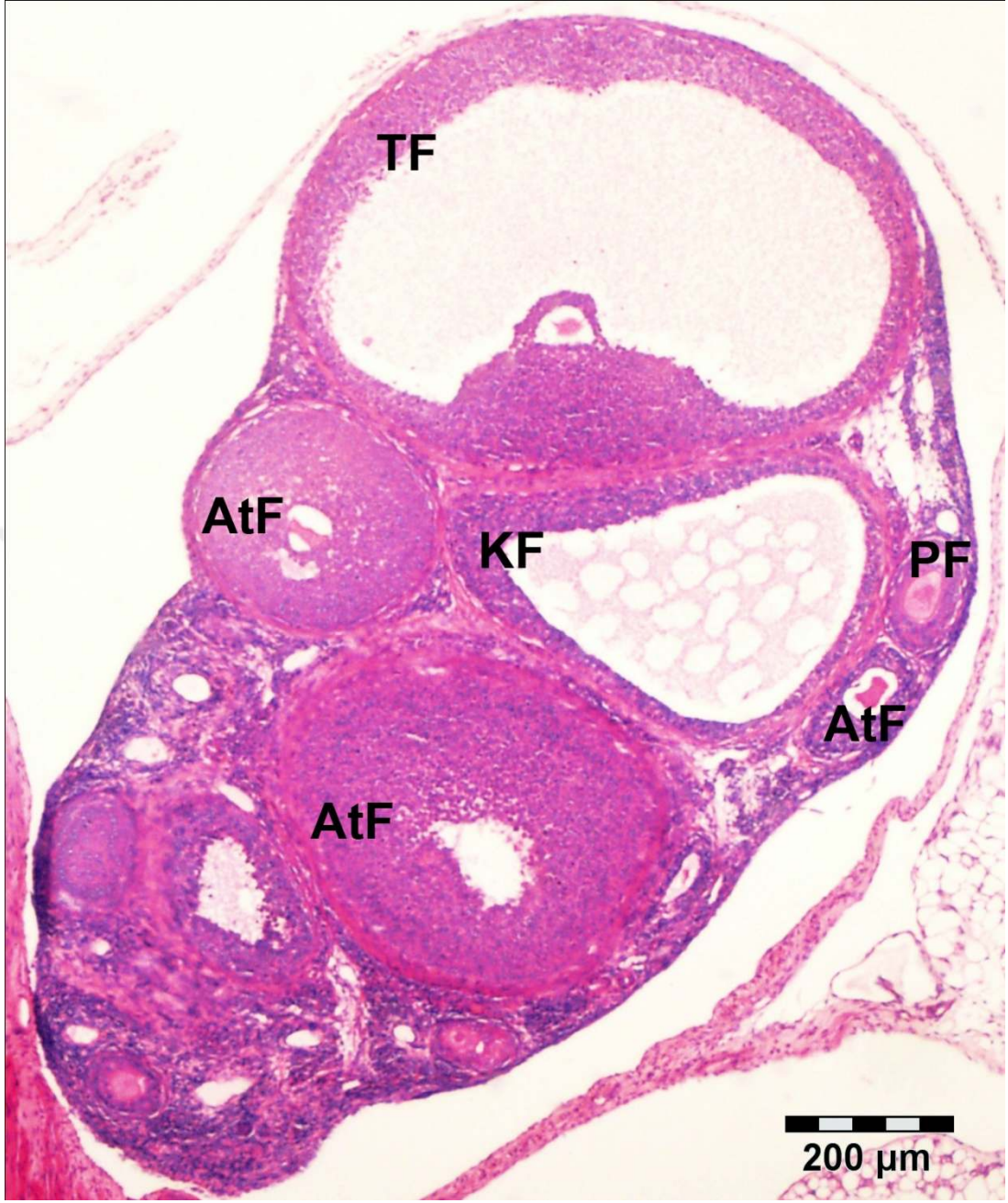
Şekil 14. 3. Grup (Tedavi grubu). Yüzey epiteli (Ep) altında farklı gelişim evrelerinde normal histolojik özelliklere sahip folikül yapıları ile atretik foliküller (AtF) izlenmekte. Tek ve çok tabakalı primer foliküller (PF). Bar=200µm.



Şekil 15. 3. Grup (Tedavi grubu). Tek katlı yüzey epiteli (Ep) altında korteks boyunca yerleşim gösteren normal yapıdaki primordiyal foliküller (PrF) ile zona pellusida ile sarılmış veziküler çekirdekli primer oosit (po) ve tek tabakalı granüloza hücrelerinden oluşan duvar yapısına sahip erken dönem primer foliküller (PF) izlenmekte. Bar=50µm.



Şekil 16. 3. Grup (Tedavi grubu). Over korteksinde yerleşen farklı gelişim evrelerindeki normal yapıda foliküller ile atretik foliküller (AtF) ve oldukça geniş bir korpus luteum (KL) yapısı izlenmekte. Primer foliküller (PF), antral folikül (AF). Bar=200μm.



Şekil 17. 3. Grup (Tedavi grubu). Primer foliküller (PF), tersiyer folikül (TF) ve atretik foliküller (AtF) ile duvar yapısındaki granüloza hücre tabakasının farklı kalınlıkta olduğu bir kistik folikül (KF) görülmekte. Bar=200μm.

4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular

4.4.1. 1.Grup

Kontrol grubuna ait over dokularından alınan elektron mikroskopik kesitlerde yüzey epitelini oluşturan tek katlı, kübik ve yer yer yassı şekilli hücrelerin düzensiz sınırlı çekirdeklerinin normal kromatin düzenlenmesine sahip oldukları görülmektedir. Periferik yerleşim gösteren heterokromatin granülleri çekirdek kılıfı iç yüzeyi boyunca uzanmaktaydı. Epitel hücrelerinin sitoplazmasında perinükleer yerleşimli organeller normal histolojik özelliklere sahipti ve apikal yüzeylerinden uzanan kısa mikrovilluslar yanında bazen primer silyum yapısı da bulunmaktaydı. Over yüzey epiteli, altında bulunan belirgin ve devamlılık gösteren bir bazal lamina tarafından tunika albugineadan ayrılmıştı (Şekil 18).

Sıkı bağ dokusundan oluşmuş tunika albuginea içerisinde, değişik yönlerde seyreden kollajen lifler arasında, heterokromatinden zengin bir çekirdek, sitoplazmalarında iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikülüm (GER) sisternaları, sferik şekilli mitokondriyonlar ve yaygın serbest ribozomlar içeren fibroblastlar bulunmaktaydı (Şekil 19).

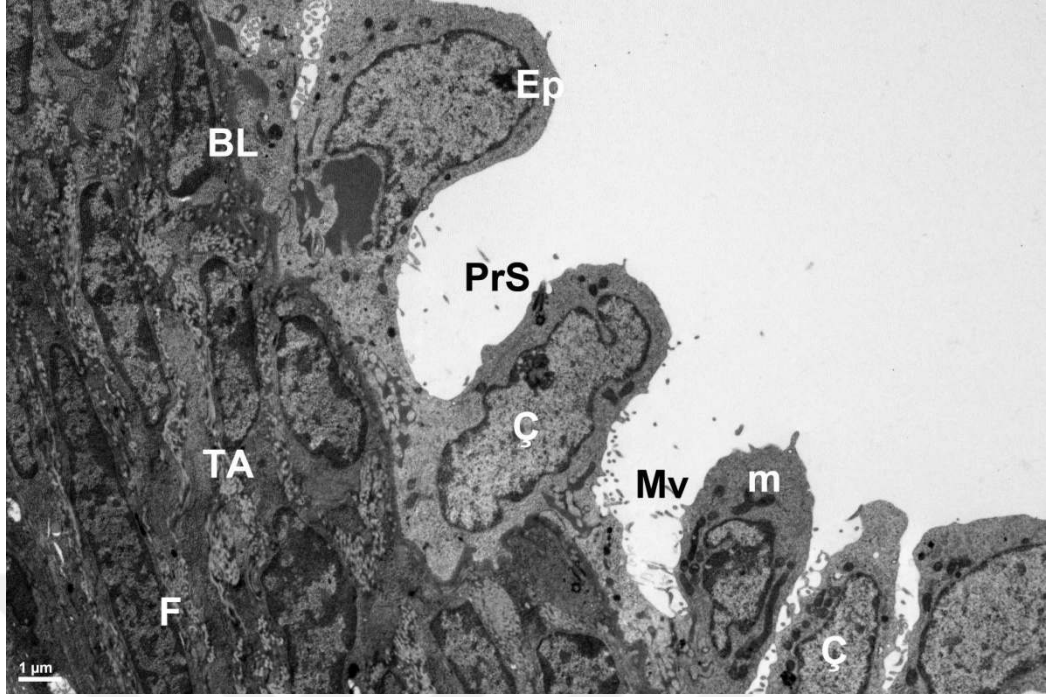
Over korteksinde, merkezi yerleşimli bir oosit ve onu çevreleyen yassı şekilli foliküler hücrelerden oluşan primordiyal foliküller izlenmekte olup, oositler yuvarlak şekilli, veziküler yapıda bir çekirdek ve belirgin çekirdekçiğe sahipti. Oosit sitoplazmasında lamellar tarzda düzenlenmiş kristaller içeren çok sayıda mitokondriyon bulunmaktaydı. Bunun yanında sitoplazmada, lizozomlar, GER sisternaları, belirgin Golgi kompleksi ve serbest ribozomların varlığı izlendi. Foliküler hücreler ince, uzun şekilli olup çekirdekleri derin indentasyonlar göstermekte ve belirgin bir çekirdekçik içermektedirler. Hücre sitoplazması içerisinde mitokondriyonlar, GER sisternaları, serbest ribozomlar, lizozomal yapılar içeren folliküler hücreler, ince bir bazal lamina ile ovaryan stromadan ayrılmışlardı (Şekil 20).

Gelişen folikülerde, erken dönemde oositlerin belirgin çekirdekçikler içeren sferik şekilli ökromatik bir çekirdeğe sahip olduğu, etrafında zona pellusidanın gelişmeye başladığı ve onun dışında bir bazal lamina ile stromal

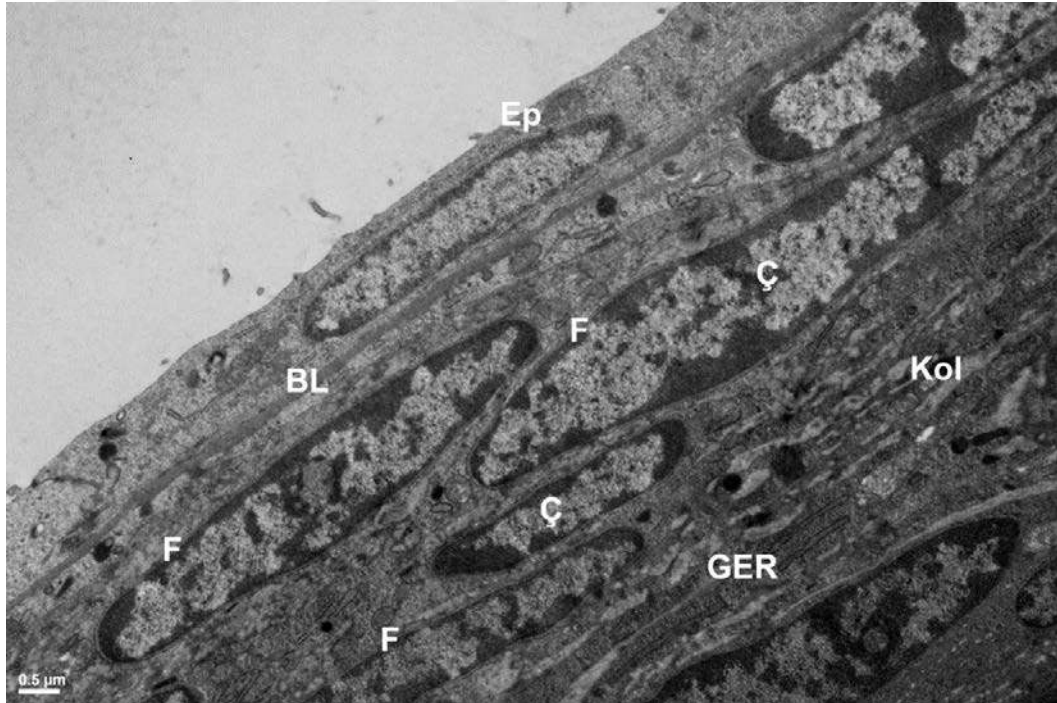
hücrelerden ayrılan tek katlı kübik yapıda granüloza hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 21). Daha ileri gelişim evresindeki primer foliküllerde, granüloza hücrelerinin çok katlı hale geldiği düzensiz sınırlı hücre çekirdeklerinin belirgin bir çekirdekçiğe sahip olduğu izlendi. Hücrelerin sitoplazmasında granüler endoplazmik retikulum (GER) sisternaları, Golgi kompleksi, mitokondriyonlar ve serbest ribozomlar bulunmakta olup bazı hücrelerin mitotik figürler gösterdiği izlenmekteydi (Şekil 22). Bir bazal lamina ile granüloza hücrelerinden ayrılmış olan teka interna tabakasındaki iç şekilli hücrelerin çekirdek ve kromatin dağılımları normal yapıda olup sitoplazmalarında, mitokondriyonlar ve lipid damlacıkları bulunmaktaydı (Şekil 23).

Normal gelişim sürecindeki foliküllerin yanısıra kesitlerde atretik foliküller de gözlenmekteydi. Atreziye giden çok katlı granüloza hücre tabakasına sahip primer foliküllerde oosit sitoplazmasında vakuoller gözlenmekteydi. Oositin etrafını saran zona pellusidanın densitesinde artma, granüloza hücrelerinde ise çekirdek sınırlarında düzensizleşme, sitoplazmik densitede artma, mitokondriyonlarda dejenerasyon, lizozomal yapılar, lipid damlacıklarının varlığı dikkat çekici olup, folikülü dıştan saran bazal laminada ise düzensizleşme gözlemlendi (Şekil 24).

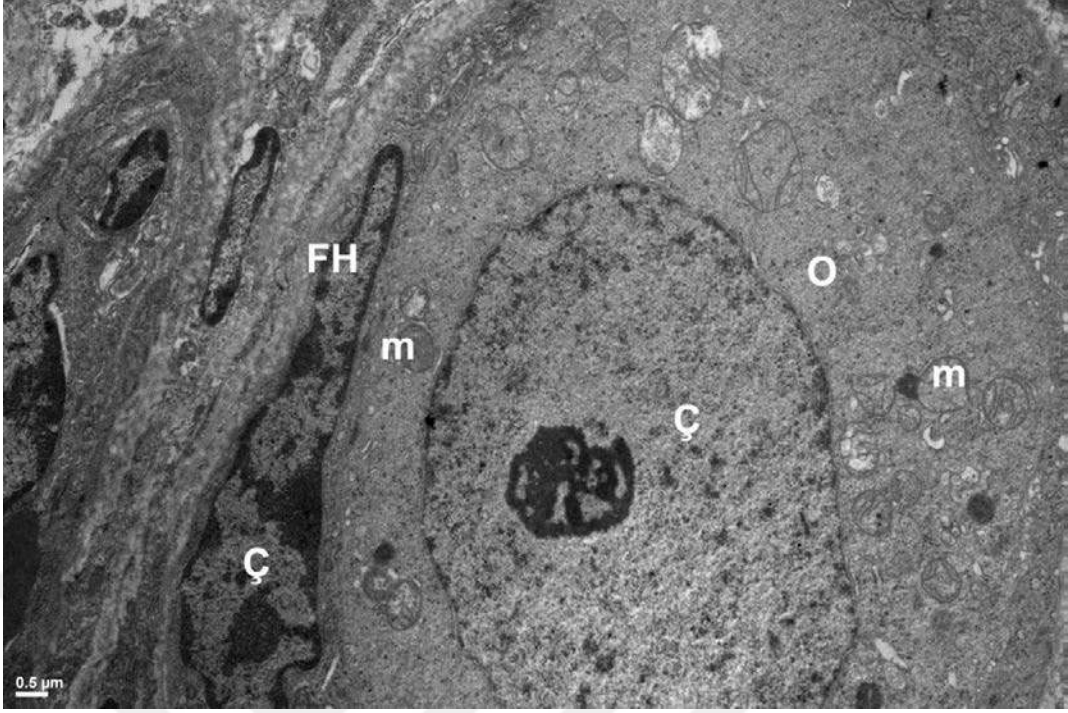
Stroma içerisinde fibroblastlara benzer histolojik yapıda stromal hücreler, interstisyel hücreler, bunların arasında uzanan kollajen lifler ve kan damarları bulunmaktaydı. İnterstisyel hücreler, sitoplazmasındaki çok sayıda lipid damlacıkları, gelişmiş agranüler endoplazmik retikülüm (SER) sisternaları, tübüler tipte kristalar içeren mitokondriyonları ve Golgi kompleksi ile steroid sentezleyen hücre yapısındaydı (Şekil 25).



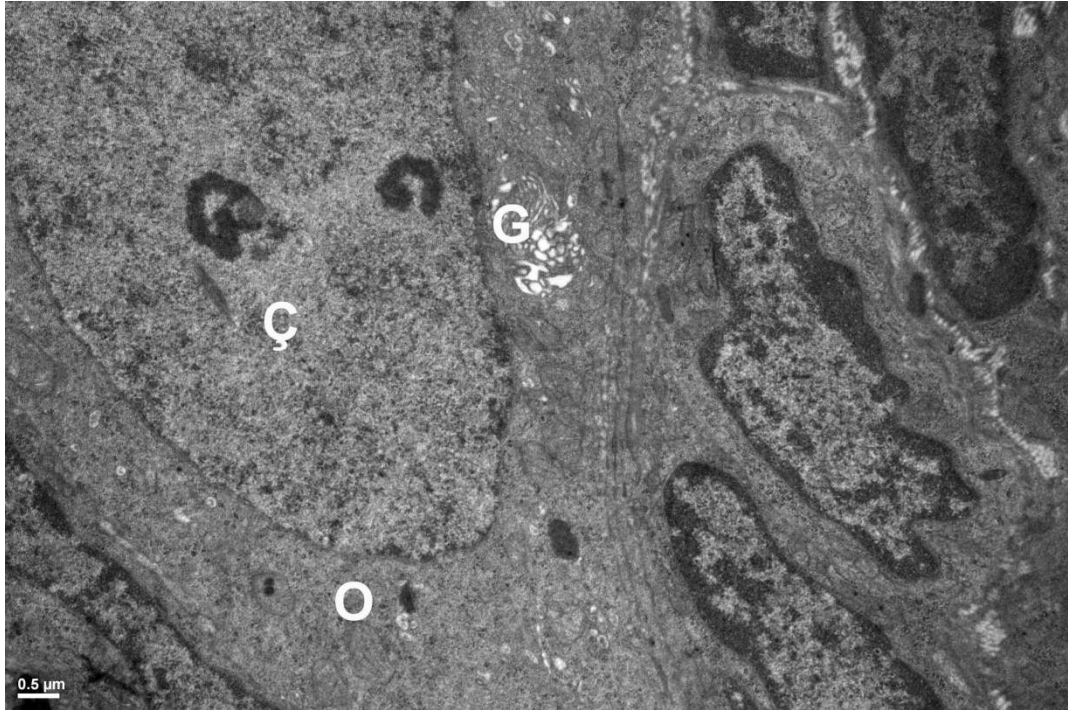
Şekil 18. 1. Grup (Kontrol grubu). Over yüzeyinde indentasyonlar gösteren çekirdekler (Ç), sahip kübik epitel hücrelerinin (Ep) apikal yüzeylerindeki mikrovilluslar (Mv) ve primer silyum (PrS) yapısı izlenmekte. Bazal lamina (BL), tunika albuginea (TA), mitokondriyonlar (m), fibroblast (F) Bar= 1 µm.



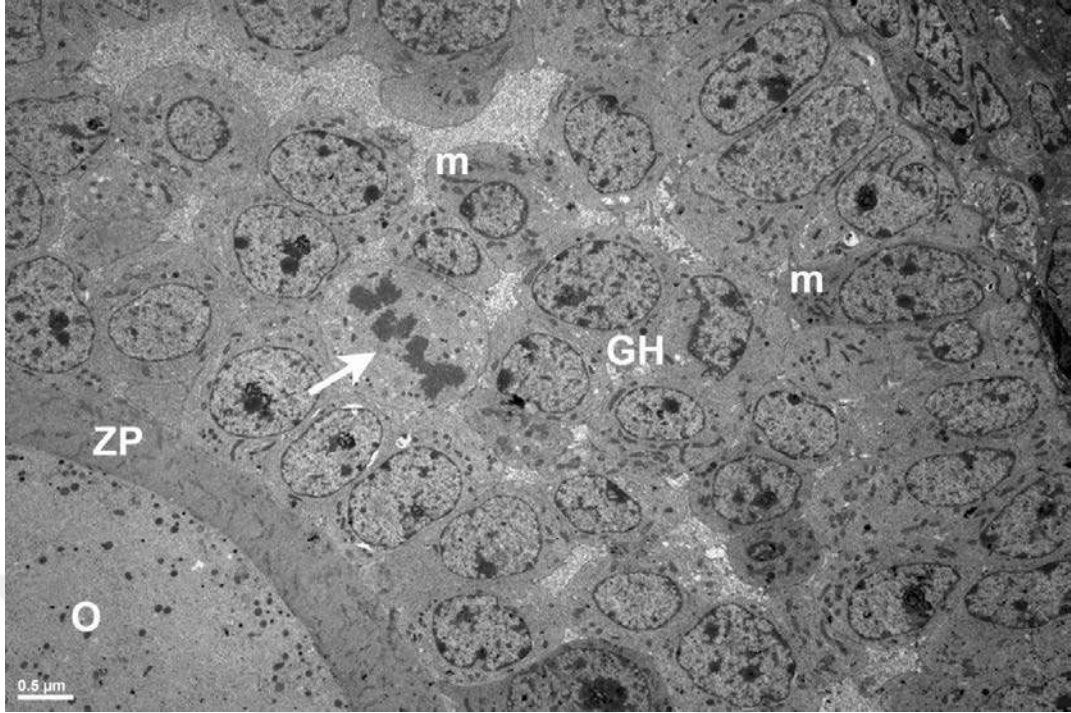
Şekil 19. 1. Grup (Kontrol grubu). Tunika albuginea içerisinde kollajen lifler (Kol) arasında, heterokromatinden zengin çekirdekleri (Ç) ve belirgin granüler endoplazmik retikulum sisternaları (GER) bulunan fibroblastlar (F) izlenmekte. Epitel (Ep), bazal lamina (BL). Bar= 0,5 µm.



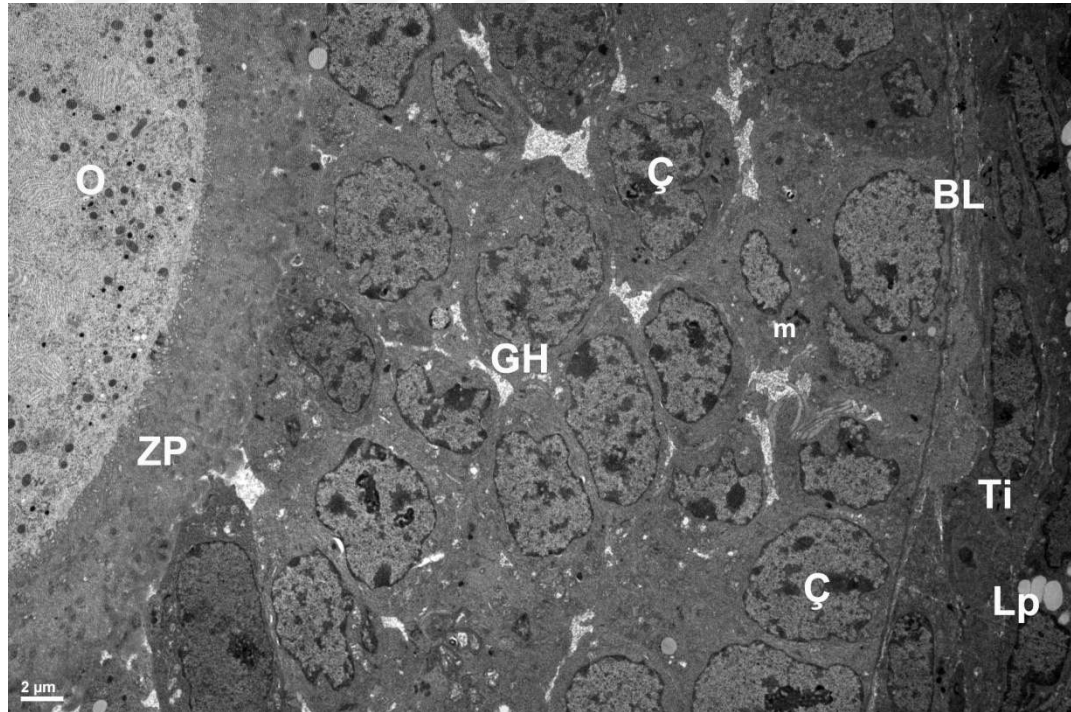
Şekil 20. 1. Grup (Kontrol grubu). Primordiyal folikülde merkezi yerleşimli oosit (O), oositi çevreleyen yassı foliküler hücreler (FH). Çekirdek (Ç), mitokondriyonlar (m). Bar= 0,5 µm.



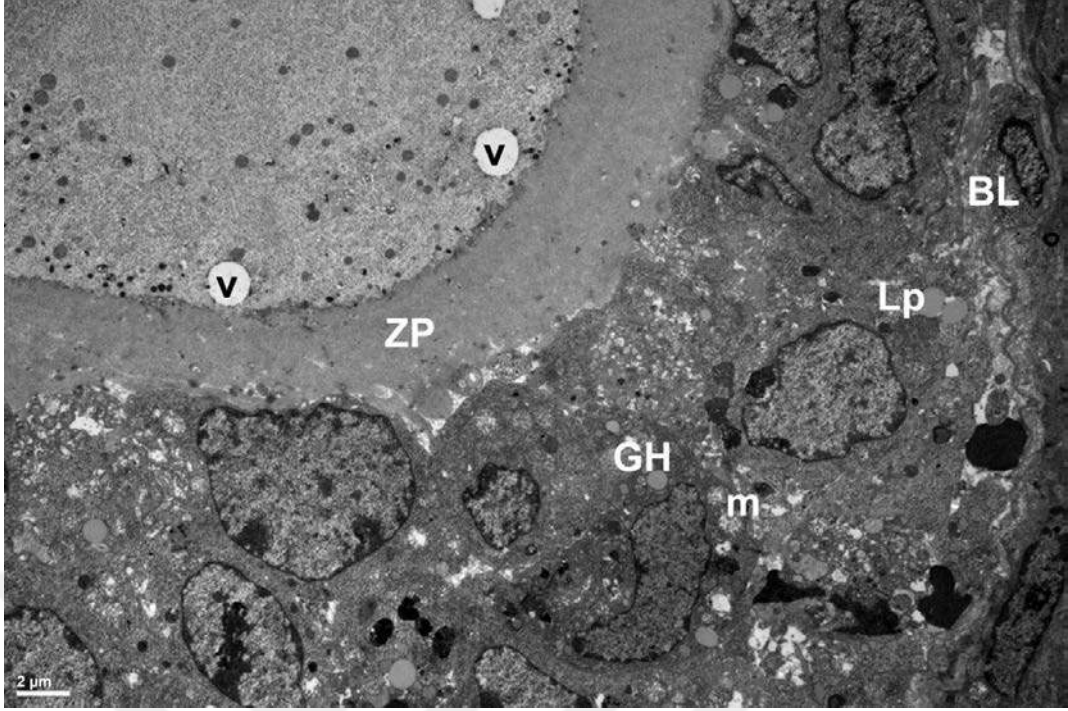
Şekil 21. 1. Grup (Kontrol grubu). Gelişen foliküldeki ökromatik çekirdeğe (Ç) sahip primer oosit (O) ve sitoplazmasında gelişmiş Golgi kompleksi (G) izlenmekte. Bar= 0,5µm.



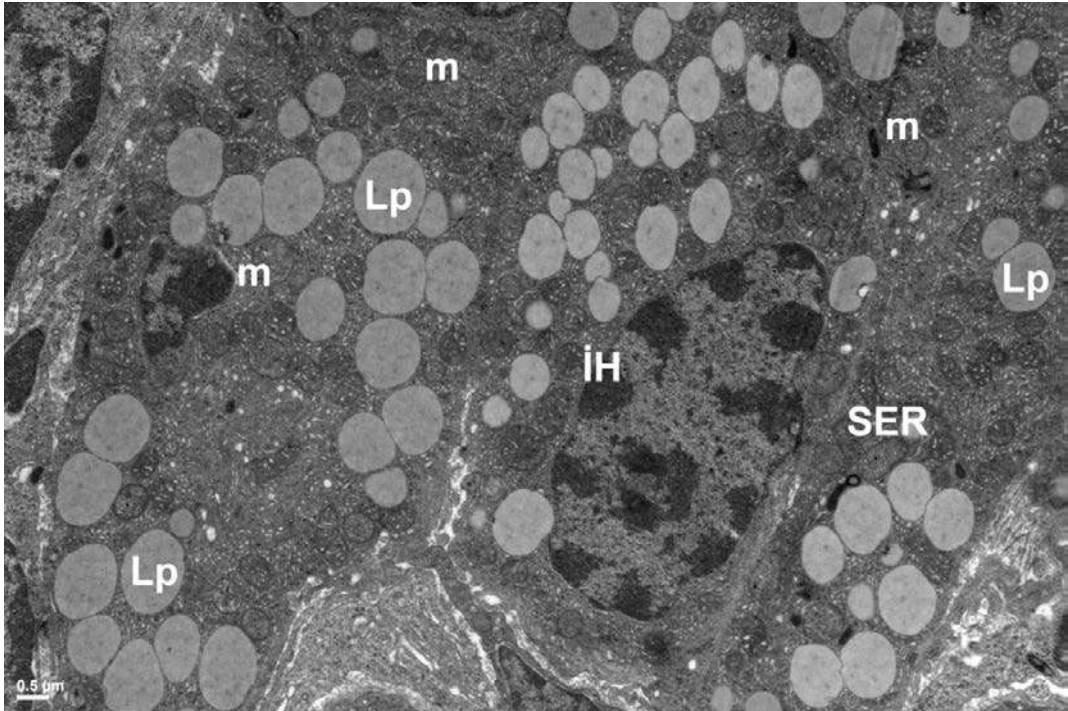
Şekil 22. 1. Grup (Kontrol grubu). İleri gelişim evresindeki primer folikülde çok tabakalı granüloza hücreleri (GH) ve bazı hücrelerde mitotik figürlerin (ok) varlığı izlenmekte. Oosit (O), zona pellusida (ZP), mitokondriyonlar (m). Bar= 0,5 µm.



Şekil 23. 1. Grup (kontrol grubu). Primer oosit (O), etrafını saran zona pellusida (ZP) ve çok katlı granüloza hücre (GH) tabakasına sahip primer folikül yapısı izlenmekte. Devamlılık gösteren bazal lamina (BL), teka interna hücreleri (Ti), Çekirdekler (Ç), mitokondriyonlar (m) ve lipid damlacıkları (Lp). Bar= 2 µm.



Şekil 24. 1. Grup. Kontrol grubuna ait atretik bir folikülde, oosit sitoplazmasındaki vakuol yapıları (V), kalınlığı artmış zona pellusida (ZP), elektron dens görünümlü granüloza hücreleri (GH), dejenerasyon gösteren mitokondriyonlar (m), lipid damlacıkları (Lp) ve düzensiz bazal lamina (BL) izlenmekte. Bar= 2 µm.



Şekil 25. 1. Grup (Kontrol grubu). Sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları (Lp) içeren interstisyel hücreler (İH), lipid damlacıkları arasında tübüler kristal mitokondriyonlar (m) ve gelişmiş agranüler endoplazmik retikulum (SER) izlenmekte. Bar= 0,5 µm.

4.4.2. 2.Grup

Polikistik over sendromu oluşturulan deney grubundaki over kesitlerinde; yüzey epitelini oluşturan hücreler tek katlı kübik ve yer yer yassı görünümde olup apikal yüzeylerinde kısa mikrovilluslar yer almaktaydı. Hücrelerin düzensiz sınırlı çekirdeklerinde periferik yerleşim gösteren heterokromatin granülleri çekirdek kılıfı iç yüzeyi boyunca uzanırken, nükleoplazma boyunca ökromatin granülleri bulunmaktaydı. Komşu yüzey epitel hücreleri arasında, lateral plazma membranında bağlantı kompleksleri izlenmekte olup, hücrelerin sitoplazmalarında belirgin GER sisternaları, küçük sferik şekilli çok sayıda mitokondriyonlar ve sitoplazma boyunca dağılmış ribozomlar bulunmaktaydı. Yüzey epitelini oluşturan hücreler, ince ve devamlılık gösteren bir bazal lamina ile tunika albugineadan ayrılmıştı (Şekil 26).

Sıkı bağ dokusundan oluşmuş tunika albuginea tabakası, düzensiz sınırlı, iğ şekilli çekirdekleri ve ince, uzun sitoplazmaları ile fibroblastlar ve bunların arasında yer alan yaygın kollajen liflerden oluşmaktaydı (Şekil 27).

Yüzey epitelinin hemen altındaki over korteksine yerleşmiş olan primordiyal foliküller genellikle normal morfolojiye sahip olup, kontrol grubundaki primordiyal foliküller ile benzer ultrastrüktürel özellikler göstermekteydiler. Oldukça geniş sferik bir çekirdek içeren oositin etrafı tek katlı foliküler hücrelerle çevriliydi. Ooplazma içerisinde çok sayıda, lamellar tarzda düzenlenmiş kristalar içeren mitokondriyonlar, genişlemiş Golgi kompleksi ve ribozomlar bulunmaktaydı. Tek katlı foliküler hücreler ise ince, uzun şekilli, derin indentasyonlar içeren bir çekirdek yapısına ve normal kromatin dağılımına sahipti. Foliküler hücreler devamlılık gösteren bir bazal lamina ile stromadan ayrılmıştı (Şekil 28).

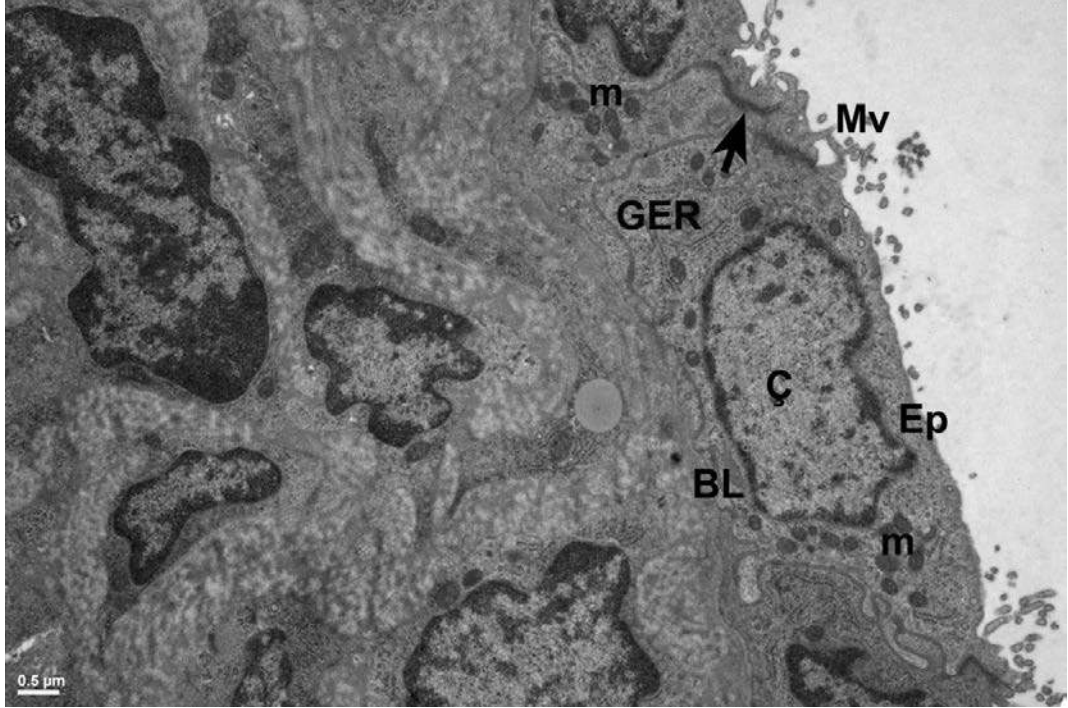
Primer foliküller merkezi yerleşimli bir oosit ve oositi çevreyen tek veya çok katlı granüloza hücrelerinden oluşmaktaydı. Birbirlerine paralel tarzda düzenlenmiş membranöz yapıların varlığı ile karakterize oosit sitoplazması içerisinde serbest ribozomlar yaygın biçimde dağılmış olarak bulunmaktaydı. Bunun yanında, çok sayıda lamellar tarzda düzenlenmiş kristalar içeren sferik şekilli mitokondriyonlar ve kortikal granüller izlenmekteydi. Oositin etrafında belirgin bir zona pellusida tabakası mevcuttu. Oositin yüzeyinden çıkan

mikrovillusların oldukça yaygın olduğu, zona pellusida içerisine uzanan granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantıları ile ilişkide oldukları görülmekteydi (Şekil 29). Oosit etrafına dizilmiş olan granüloza hücrelerinin normal kromatin dağılımına sahip sferikal şekilli çekirdeklerinde belirgin 1-2 çekirdekçiğin varlığı gözlenmekte olup, bazı hücrelerin mitotik figürler gösterdiği izlenmekteydi. Sitoplazmada ise ince uzun çok sayıda mitokondrionlar, Golgi kompleksi ve GER sisternaları mevcuttu. Bazı mikrograflarda oosite yakın yerleşimli granüloza hücrelerinde oosite doğru uzanan primer silyum yapısı dikkat çekmekteydi (Şekil 30).

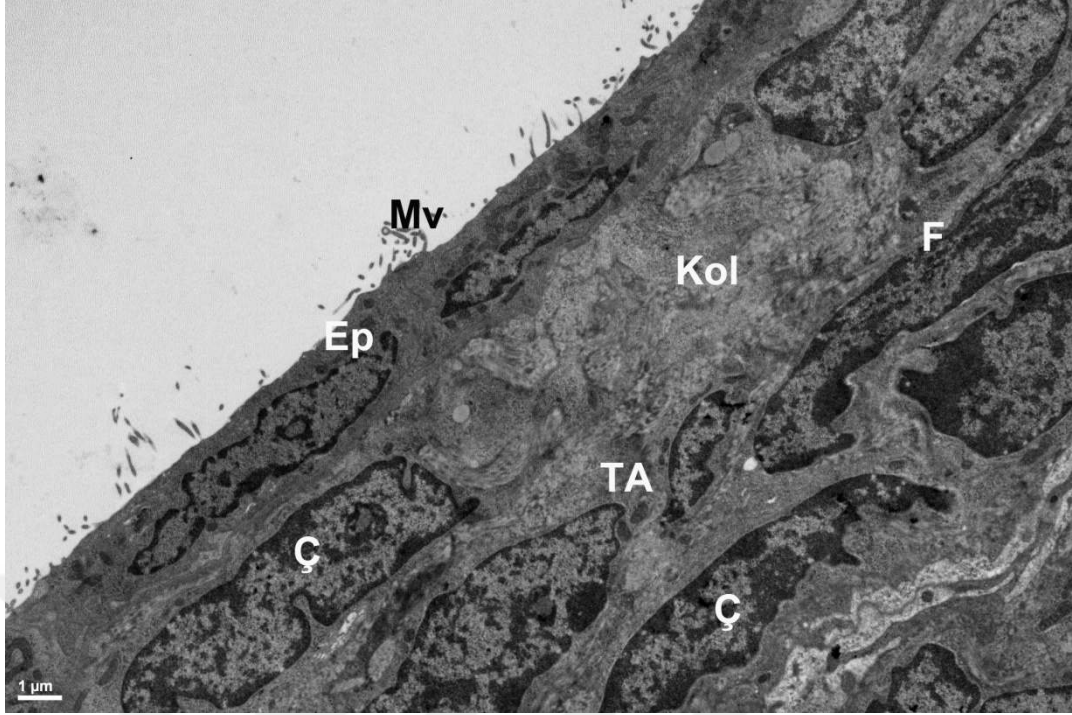
Gelişim evresine uygun normal histolojik özelliklere sahip foliküllerin yanı sıra dejeneratif değişiklikler gösteren foliküller de dikkat çekmekteydi. Bazı erken dönem primer foliküllerde oosit sitoplazmasında genişlemiş Golgi alanları, mitokondriyal dejenerasyon, multiveziküler cisimcikler izlenmekte olup, oositi çevreleyen foliküler hücrelerde de dejeneratif değişikliklerin geliştiği gözlemlendi (Şekil 31). Daha ileri aşamadaki primer foliküllerde ise oosit sitoplazmasında paralel düzenlenmiş membranöz yapıların ve kortikal granüllerin arttığı, zona pellusidanın homojen yapısını yitirdiği gözlenmekte olup, granüloza hücrelerinde mitokondriyal dejenerasyon bulunmaktaydı (Şekil 32). Bazı foliküllerde ise granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların azaldığı ve hücrelerin birbirlerinden ayrıldığı görüldü. Granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında GER sisternalarının oldukça genişlediği ve içteki hücreler ile zona pellusida arasındaki bağlantının azaldığı gözlemlendi. Oosit ile zona pellusida arasında da geniş boşluklar oluşmuştu (Şekil 33). Bunun yanında, oosit apoptozu gerçekleşen foliküller de mevcuttu. Bu foliküllerde oosit çekirdeğinde fragmentasyon gözlenmekte olup, zona pellusida oldukça kalınlaşmış ve granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantıları ile oosit mikrovillusları arasındaki bağlantı azalmıştı. Ayrıca granüloza hücrelerinin sitoplazmasında nekrotik yapılar, vakuoller ve lipid artışı gözlenmekteydi (Şekil 34).

Kistik foliküllerde granüloza hücre tabakasının belirgin olarak incelendiği dikkati çekmekteydi. 1-2 hücre kalınlığında izlenen bu tabakada granüloza hücrelerinin yassılaştığı görülmekteydi. Granüloza tabakasını dıştan saran teka tabakası ise oldukça kalınlaşmıştı (Şekil 35).

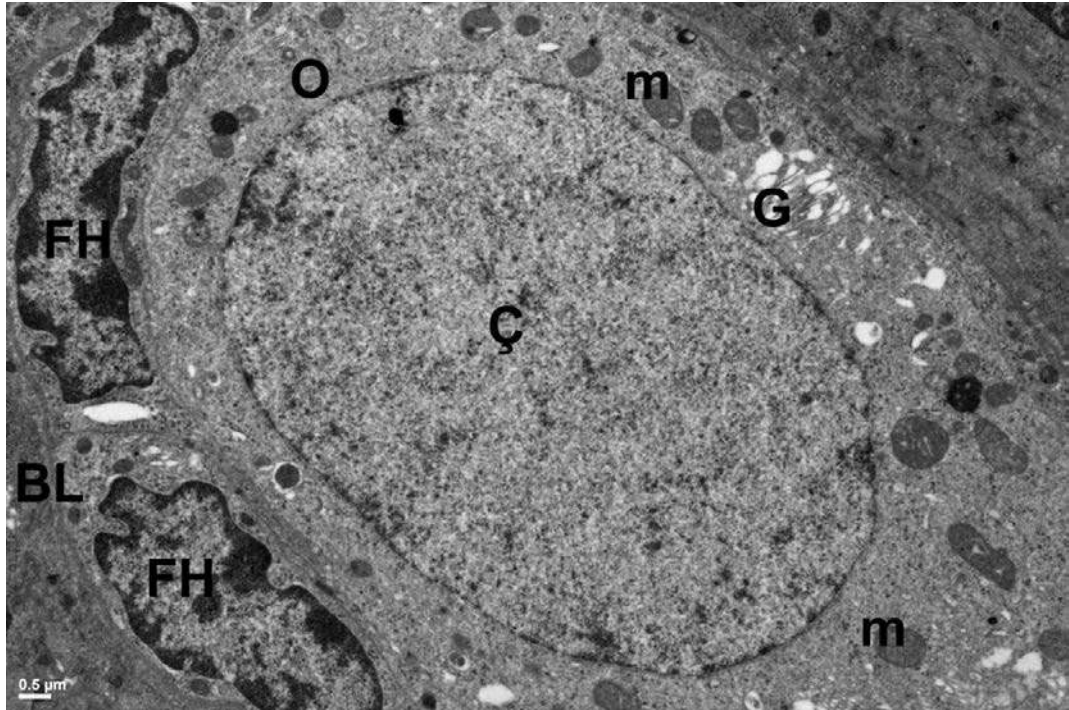
İnterstisyel alanda bulunan ve steroid salgılayan hücrelerin sitoplazmalarında ise bol miktarda lipid damlacıklarının varlığı dikkat çekiciydi. Bazı hücrelerde çok sayıda küçük ve orta büyüklükte lipid damlacığı tüm sitoplazmayı işgal etmişken (Şekil 36), bazı lipid damlacıklarının ise oldukça büyük olduğu ve çekirdeğe yakın bir çapa ulaştığı gözlemlendi (Şekil 37). Lipid damlacıklarının arasında çok sayıda, değişik büyüklükte, poligonal veya fusiform şekilli, kolesterol kristallerinin varlığı dikkat çekmekteydi (Şekil 38). Bazı interstisyel hücrelerde ise hücre çekirdeklerinin heterokromatinden zengin hale geldiği ve perinükleolar sisternalarının genişlemiş olduğu gözlemlendi (Şekil 39).



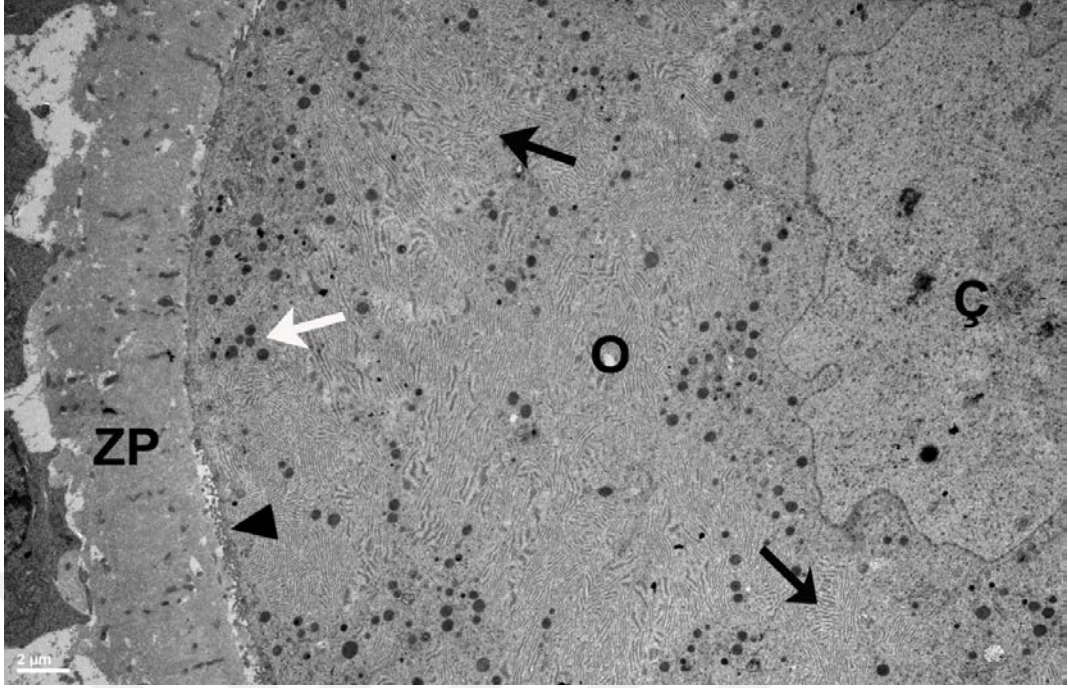
Şekil 26. 2. Grup (PKOS grubu). Tek katlı yassı epiteli hücreleri (Ep), apikal yüzeylerindeki mikrovilluslar (Mv), indentasyonlar gösteren çekirdek (Ç), granüler endoplazmik retikulum sisternaları (GER), mitokondriyonlar (m), komşu epitel hücreleri arasındaki bağlantı kompleksleri (ok) ve bazal lamina(BL) izlenmekte. Bar= 0,5 µm.



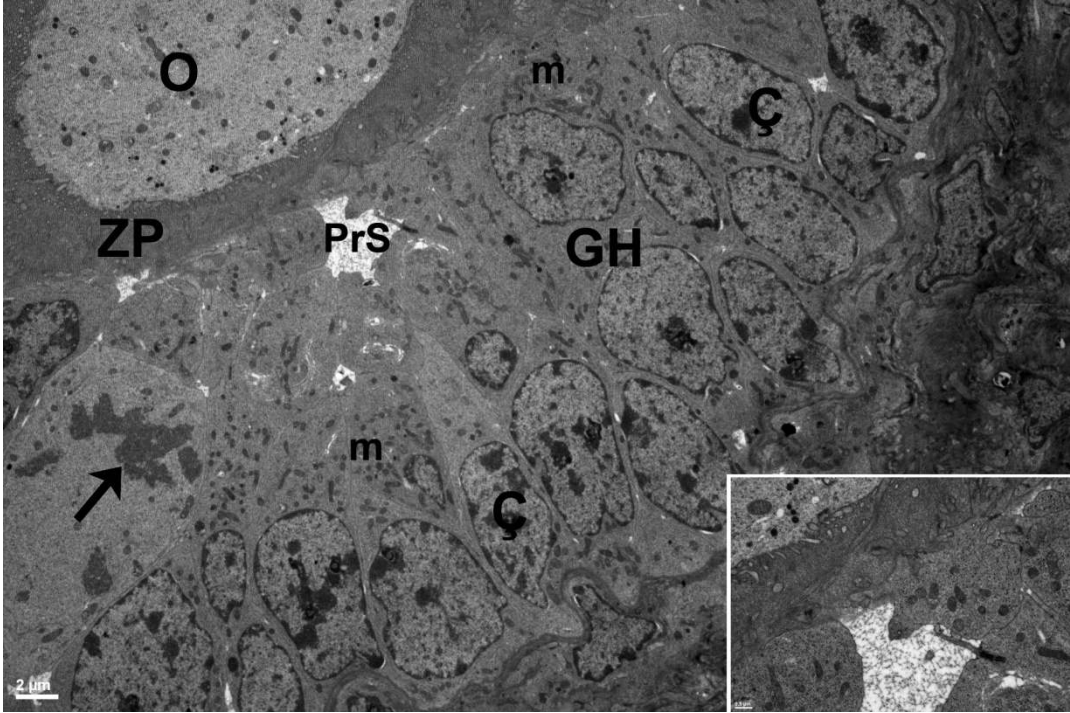
Şekil 27. 2. Grup (PKOS grubu). Tunika albuginea tabakası (TA) içerisinde yerleşmiş iğ şekilli çekirdeğe (Ç) sahip fibroblastlar (F) ve aralarında uzanan kollajen lifler (Kol) izlenmekte. Epitel (Ep), mikrovilluslar (Mv). Bar=1µm.



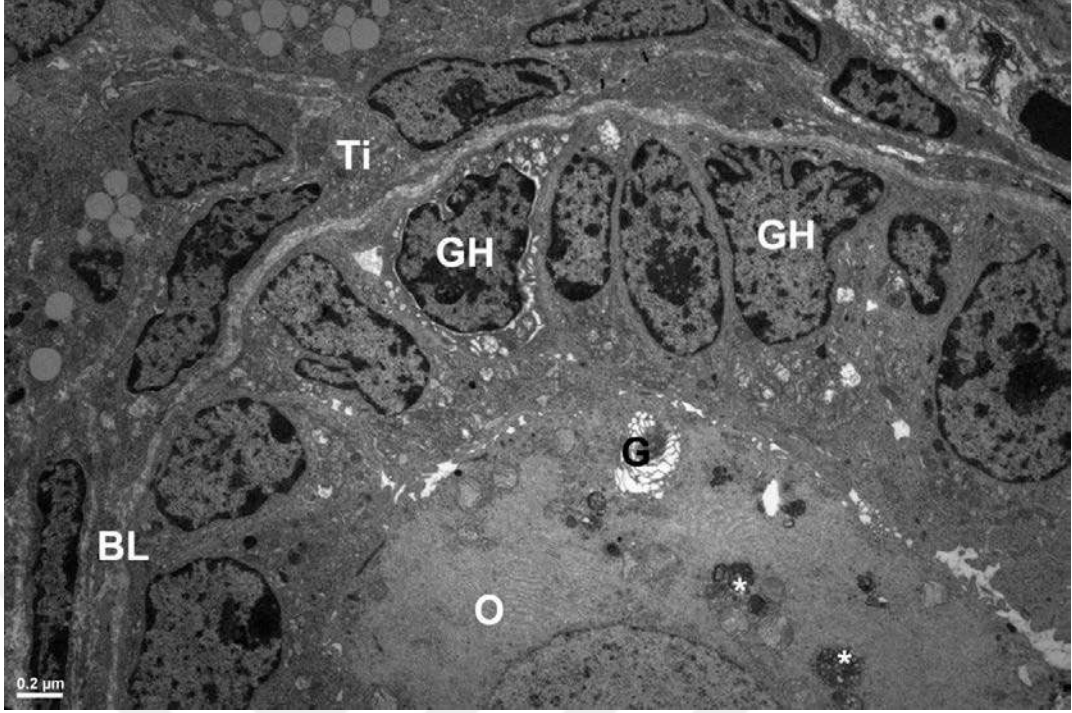
Şekil 28. 2. Grup (PKOS grubu). Normal yapıdaki primordiyal folikülde veziküler çekirdeğe (Ç) sahip, merkezi yerleşimli oosit (O), ooplazma içindeki mitokondriyonlar (m), genişlemiş Golgi kompleksi (G), oositi çevreleyen foliküler hücreler (FH) ve altında uzanan bazal lamina (BL) izlenmekte. Bar= 0,5 µm.



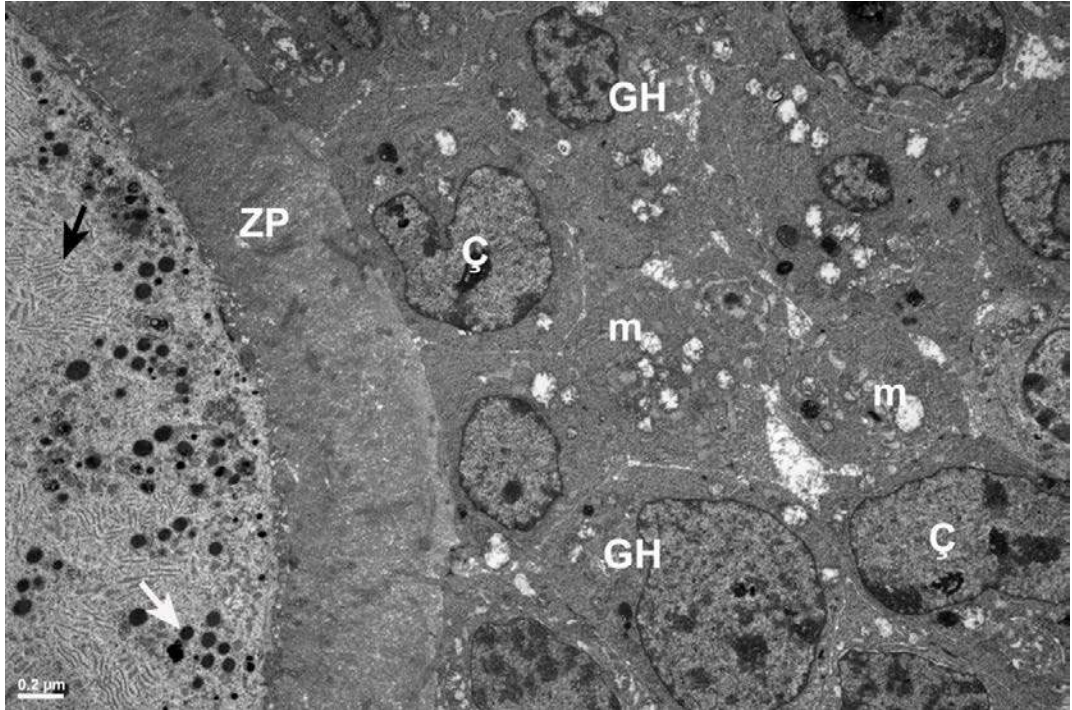
Şekil 29. 2. Grup (PKOS grubu). Ökromatik çekirdekli (Ç) primer oosit (O), ooplazmada paralel tarzda düzenlenmiş membranöz yapılar (siyah ok), kortikal granüller (beyaz ok), oositin etrafını saran zona pellusida (ZP) ve içerisine uzanan oosite ait mikrovilluslar (ok başı) izlenmekte. Bar= 2 µm.



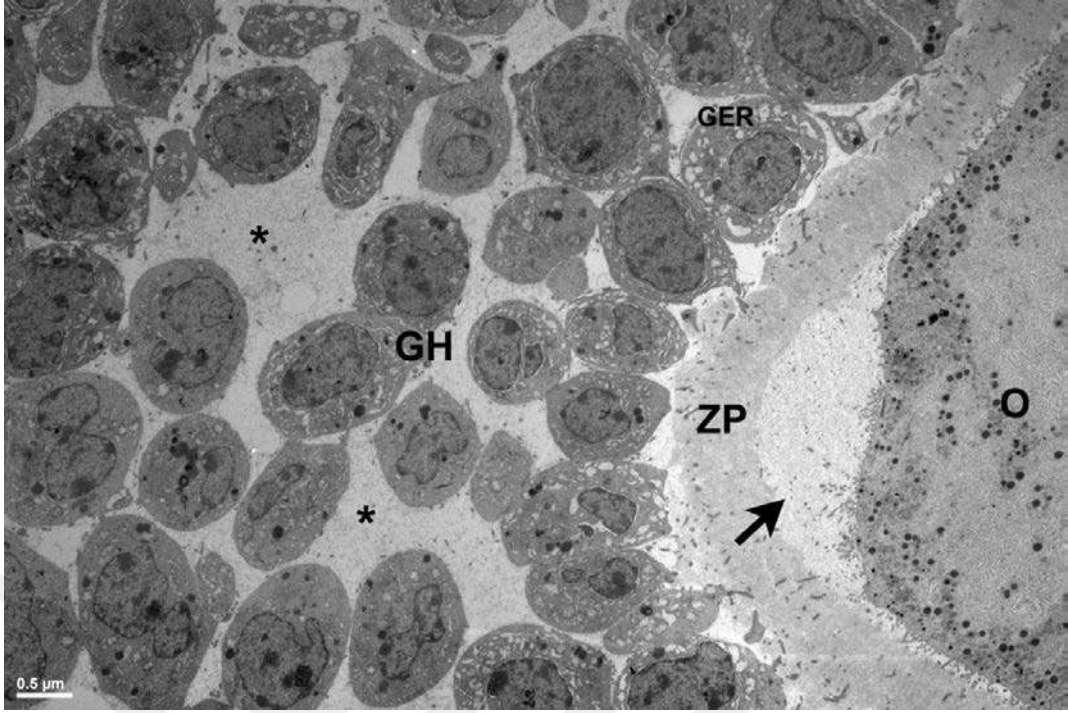
Şekil 30. 2. Grup (PKOS grubu). Sferikal bir çekirdeğe sahip (Ç) granüloza hücreleri (GH), mitotik figürler (ok), primer silyum yapısı (PrS), granüloza hücre sitoplazmasında yerleşim gösteren mitokondriyonlar (m) izlenmekte. Oosit (O), zona pellusida (ZP). Bar= 2 µm. İnset; primer silyum yapısı (PrS).



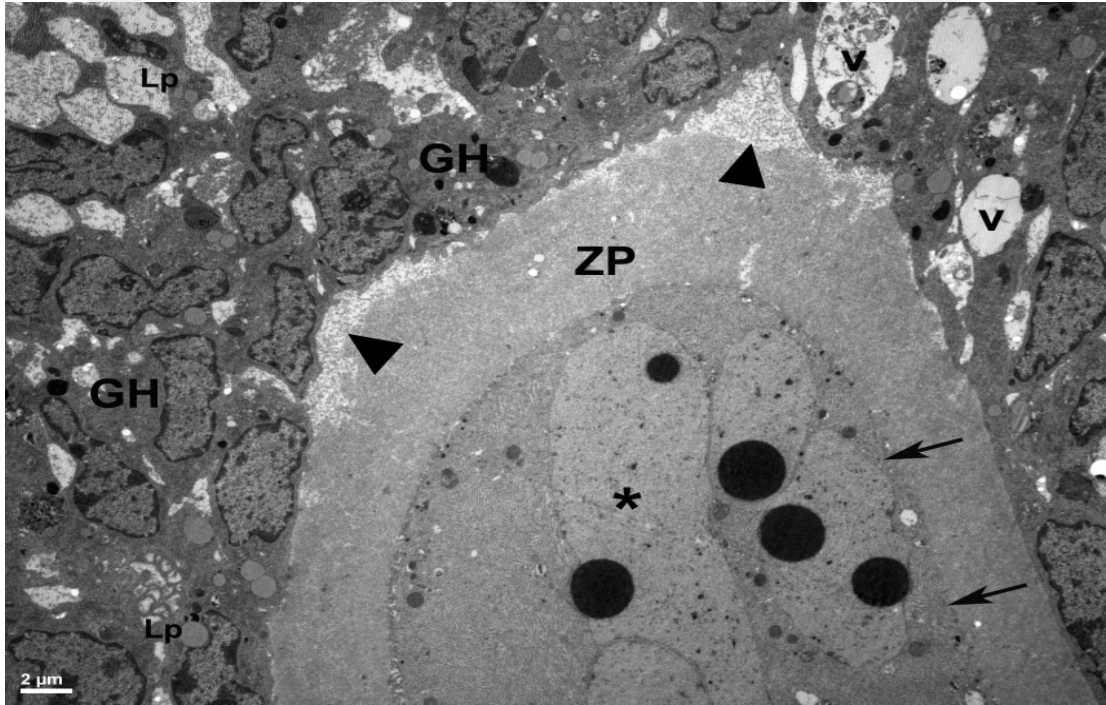
Şekil 31. 2. Grup (PKOS grubu). Multiveziküler cisimcikler (*) ve genişlemiş golgi kompleksi (G) içeren primer oosit (O) ve etrafını saran ve dejeneratif değişiklikler gösteren granüloza hücreleri (GH) izlenmekte. Bazal lamina (BL), teka interna tabakası (Ti). Bar=0,2µm.



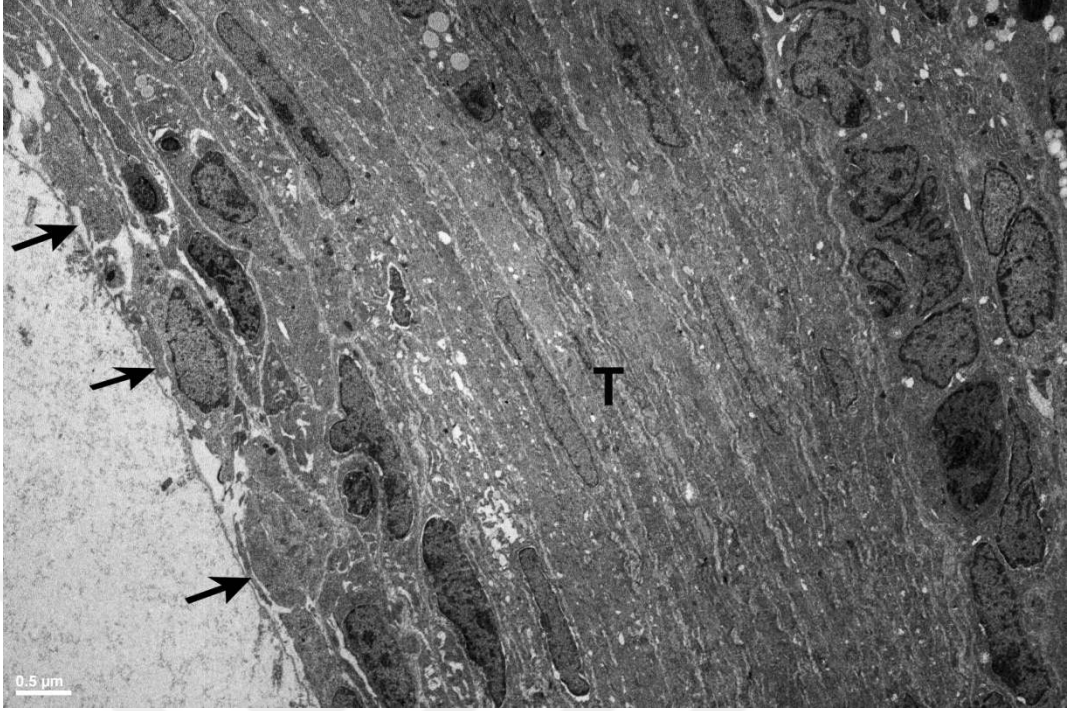
Şekil 32. 2. Grup (PKOS grubu). Oosit sitoplazmasında belirgin membranöz yapılar (siyah ok), kortikal granüllerde artma (beyaz ok), elektron dens görünümlü kalınlaşmış zona pellusida tabakası (ZP) ve onu saran çok katlı granüloza hücreleri (GH) izlenmekte. Dejenerasyon gösteren mitokondriyonlar (m), çekirdek (Ç). Bar=0,2µm.



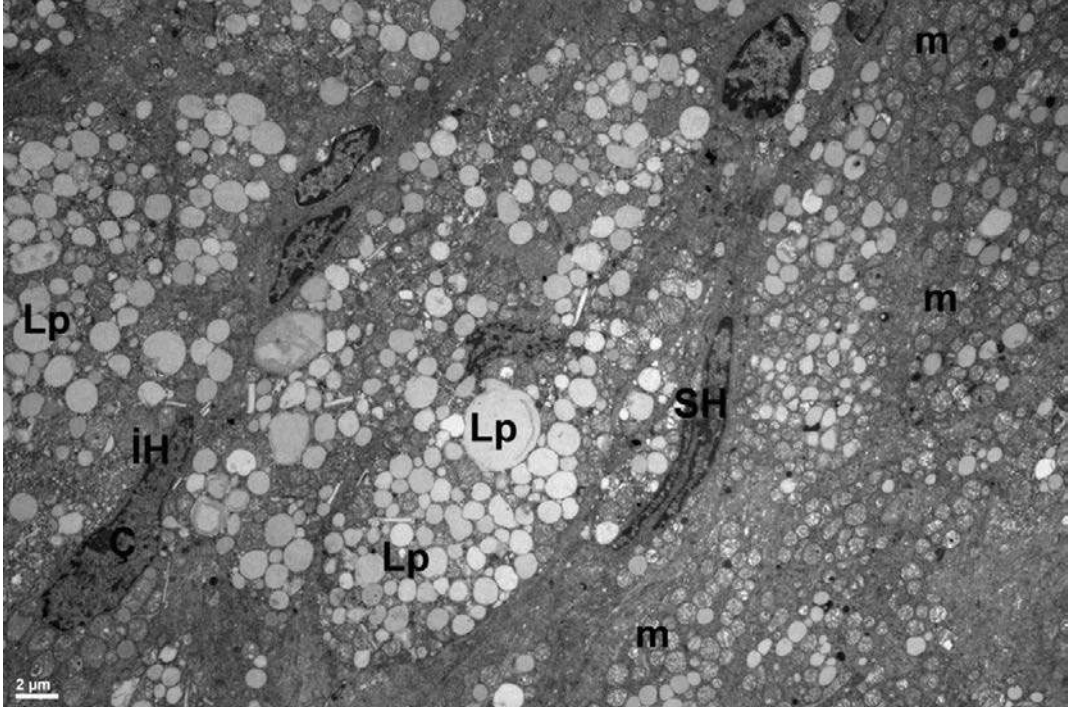
Şekil 33. 2. Grup (PKOS grubu). Hücreler arası bağlantılarını kaybeden granüloza hücreleri (GH) arasında geniş boşlukların oluştuğu (*), hücrelerde granüler endoplazmik retikulum sisternalarının genişlediği (GER), zona pellusida (ZP) ve oositin (O) birbirinden ayrıldığı (siyah ok) görülmekte. Bar= 0,5 µm.



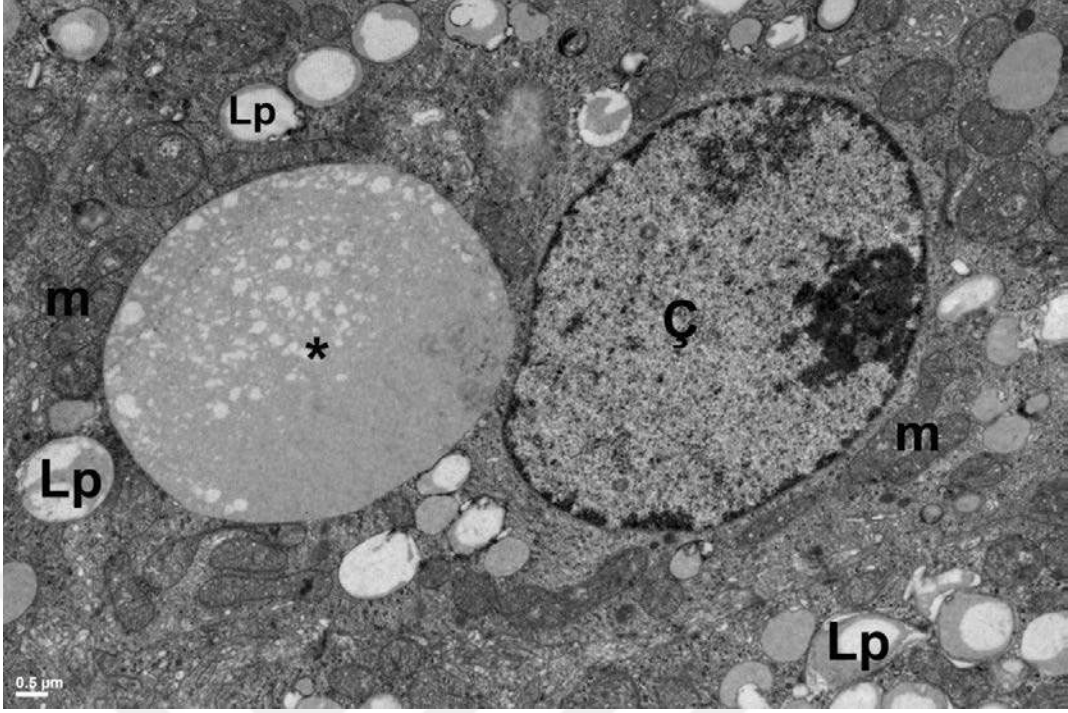
Şekil 34. 2. Grup (PKOS grubu). Apoptotik oosit çekirdeği (*), zona pellusida (ZP) yapısında bozulma (ok başı), oosit mikrovilluslarında azalma (ok) izlenmekte. Dejeneratif değişiklikler gösteren granüloza hücrelerinin (GH) zona pellusidadan ayrıldığı görülmekte. Lipid damlacıkları (Lp), vakuoler yapılar (V). Bar= 2 µm.



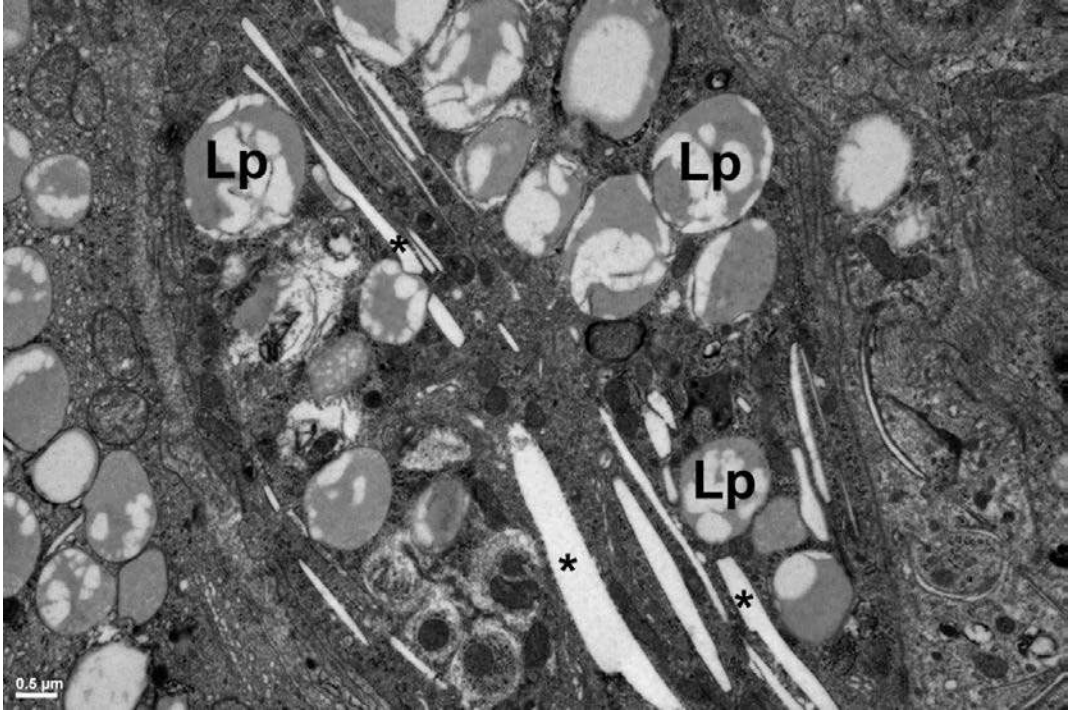
Şekil 35. 2. Grup (PKOS grubu). Kistik folikülde granüloza tabakasının inceldiği ve hücrelerin yassılaştığı (ok), teka tabakasının (T) ise oldukça kalınlaştığı izlenmekte. Bar= 0,5µm.



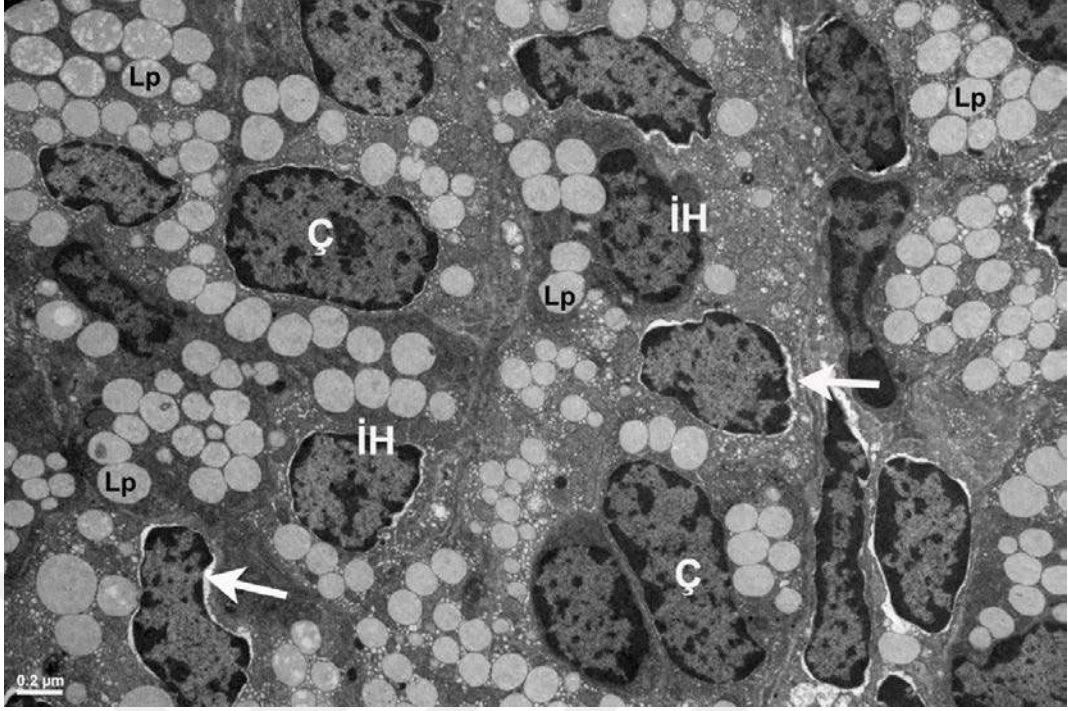
Şekil 36. 2. Grup (PKOS grubu). İnterstisyel alanda sitoplazmalarında çok sayıda, değişik büyüklükte lipid damlacıkları (Lp) içeren interstisyel hücreler (İH) ve aralarında stromal hücreler (SH) izlenmekte. Çekirdek (Ç), mitokondriyon (m). Bar= 2 µm.



Şekil 37. 2. Grup (PKOS grubu). İnterstisyel hücrede çekirdeğe (Ç) yakın büyüklükte lipid damlacığı (*) ile çok sayıda küçük lipid damlacıkları (Lp) ve tübüler kristalî mitokondriyonlar (m) izlenmekte. Bar= 0,5 µm.



Şekil 38. 2. Grup (PKOS grubu). İnterstisyel hücrelerde lipid damlacıklarının (Lp) arasında, çok sayıda poligonal ve fusiform şekilli kolesterol kristallerinin (*) bulunduğu görülmekte. Bar= 0,5 µm.



Şekil 39. 2. Grup (PKOS grubu). Çok sayıda lipid damlacığı (Lp) içeren interstisyel hücrelerde (İH) çekirdeklerin (Ç) heterokromatinden zengin hale geldiği ve perinükleer sisternaların genişlediği (oklar) izlenmekte. Bar= 0,2µm.

4.4.3. 3.Grup

D vitamini uygulanan tedavi grubuna ait over kesitlerinde; over yüzeyini örten epitel hücrelerinin çekirdeklerinin derin indentasyonlar gösterdiği ve kromatin dağılımlarının normal olduğu izlendi. Az sayıda organel içeren elektron dens görünümlü hücrelerin apikal yüzeylerinde az sayıda kısa, kalın mikrovillus yapıları gözlenmekteydi. Bazal lamina ile epitel tabakasından ayrılan tunika albuginea çok sayıda kollajen lifler ve fibroblastlar içermekteydi (Şekil 40).

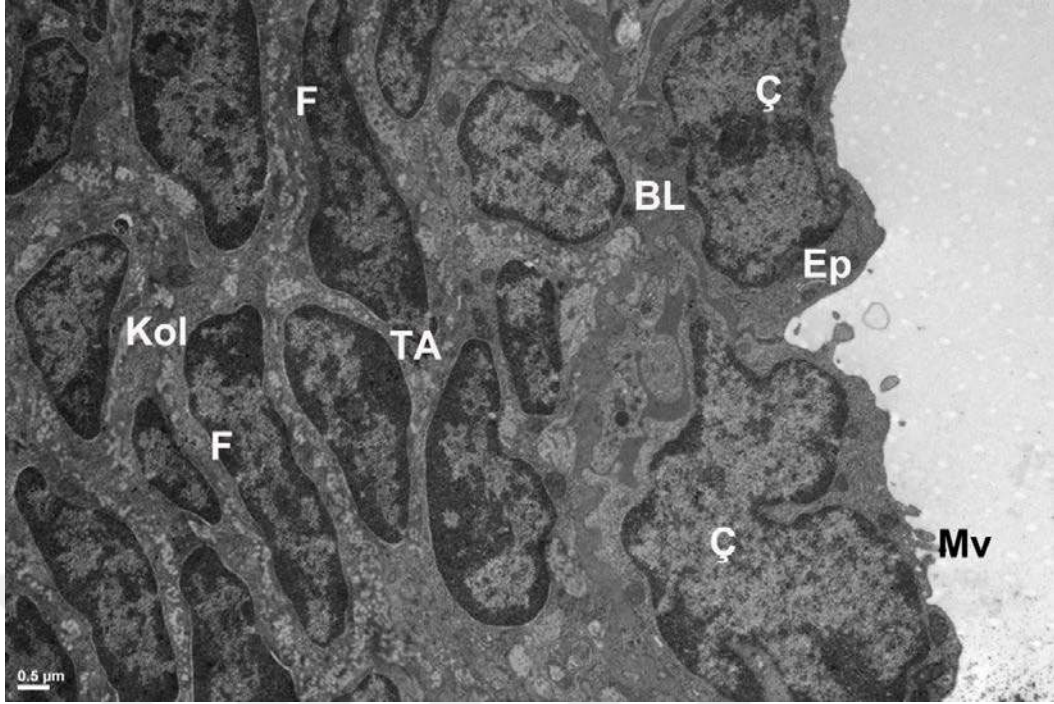
Oosit ve onu saran yassı foliküler hücreleriyle normal yapıdaki primordiyal foliküllerde, merkezi yerleşimli sferikal bir çekirdeğe sahip olan oositin sitoplazmasında belirgin Golgi kompleksi, sferikal şekilli mitokondriyonlar ve sitoplazma boyunca yayılmış serbest ribozomlar mevcuttu. Granüloza hücreleri, düzensiz sınırlı, kromatinden zengin bir çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip olup tek sıra halinde oosit etrafında dizilmiş olup ince bir bazal lamina ile ovaryan stromadan ayrılmaktaydılar (Şekil 41).

Gelişimin ileri aşamasındaki foliküllerde ise birbirine paralel düzenlenmiş membranöz yapılar içeren oosit sitoplazmasında serbest ribozomlar ve

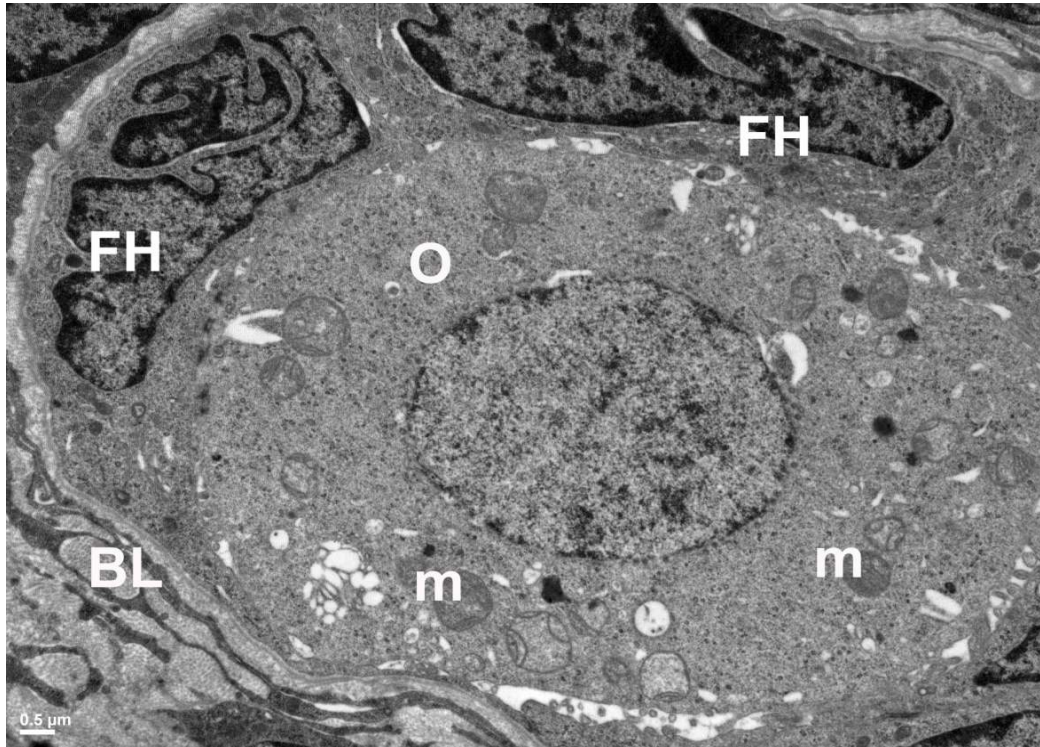
mitokondriyonlar yaygın olarak bulunmaktaydı. Kortikal granüller periferel bölgede oosit membranının iç yüzeyi boyunca yerleşim göstermekteydi. Dıştan oositi saran zona pellusida içerisinde oosite ait mikrovilluslar ile granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantıları arasındaki ilişki belirgin olarak izlenmekteydi (Şekil 42). Antral foliküllerde ise aralarında sıvı dolu boşluklar belirmiş olan granüloza hücreleri normal ultrastrüktürel yapıya sahip olup; bazı hücrelerde mitotik figürler belirgin olarak gözlenmekteydi (Şekil 43).

Normal yapıdaki foliküllerin yanı sıra, PKOS grubuna göre daha az sayıda bulunan kistik foliküllerde antrumu saran granüloza hücre tabakasında belirgin oranda incelme dikkati çekmekteydi. Bazı mikrograflarda tek hücre kalınlığında gözlenen granüloza hücre tabakası dışında, PKOS grubuna göre kalınlığı azalmış teka hücre tabakası bulunmaktaydı (Şekil 44).

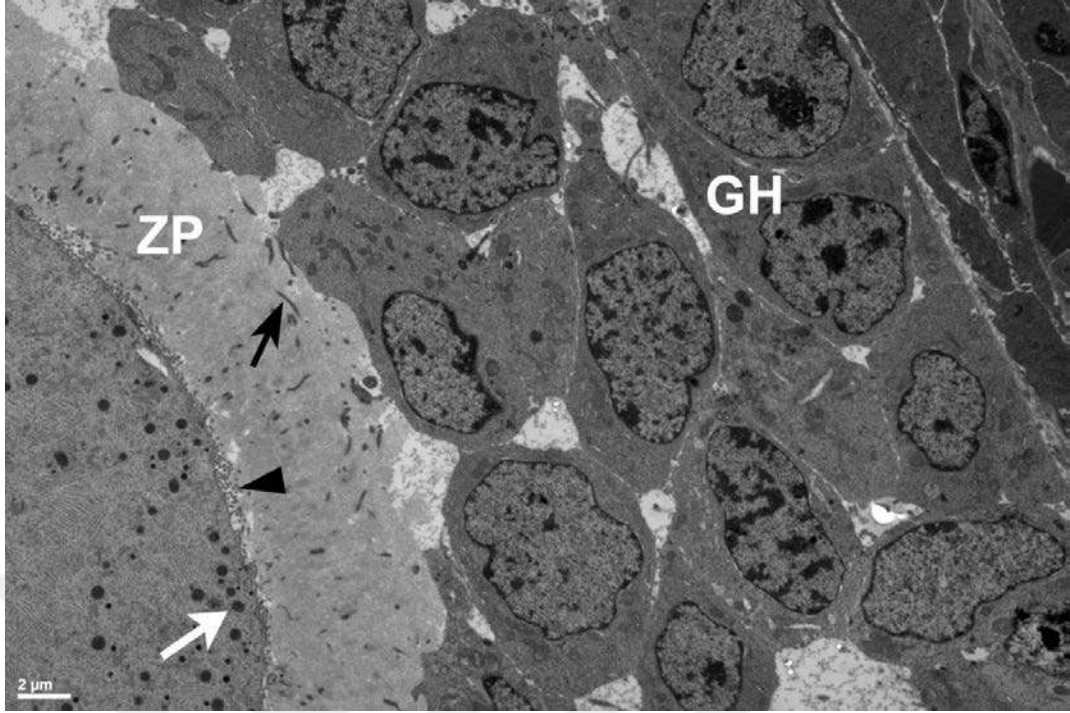
Stromada gözlenen interstisyel hücreler normal histolojik özelliklere sahip olup kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydiler. Sitoplazmasında çok sayıda lipid damlacıkları içeren interstisyel hücreler arasında fibroblastlara benzer görünümlü, fusiform şekilli çekirdekleri ve belirgin GER sisternaları ile stromal hücreler gözlenmekteydi (Şekil 45).



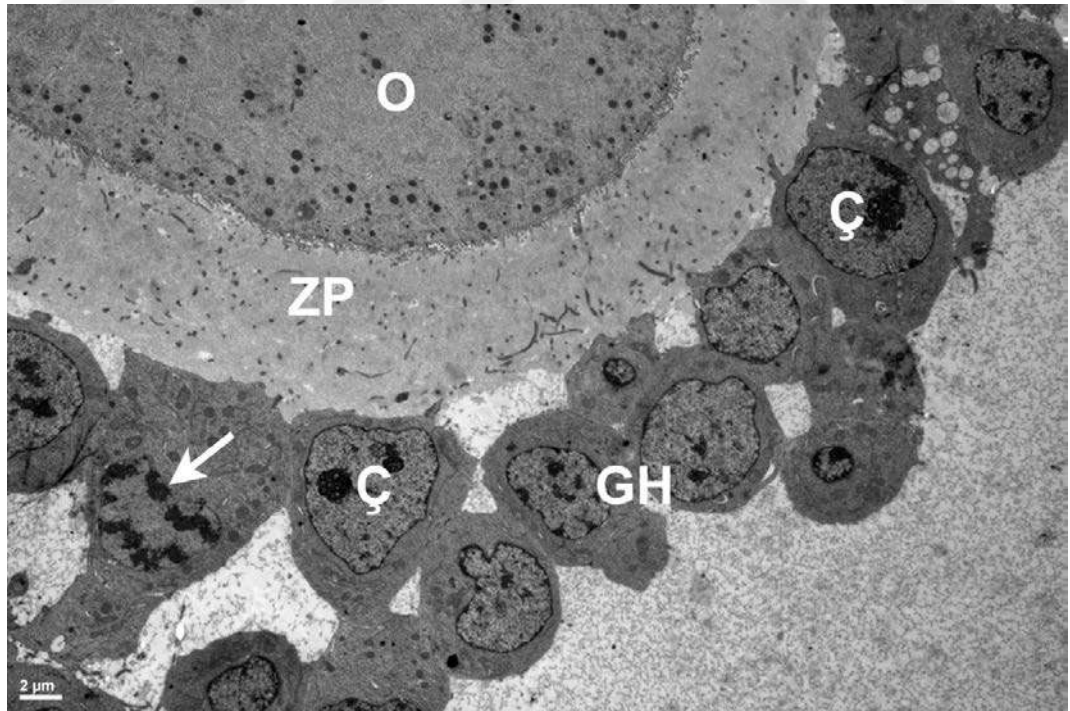
Şekil 40. 3. Grup (Tedavi grubu). İndentasyon gösteren çekirdeğe (Ç) sahip hücrelerden oluşan yüzey epiteli (Ep), apikal yüzeylerindeki mikrovilluslar (Mv), epitel altında uzanan bazal lamina (BL) ile tunika albuginea (TA) içerisindeki fibroblastlar (F) ve kollajen lifler (Kol) izlenmekte. Bar= 0,5 µm.



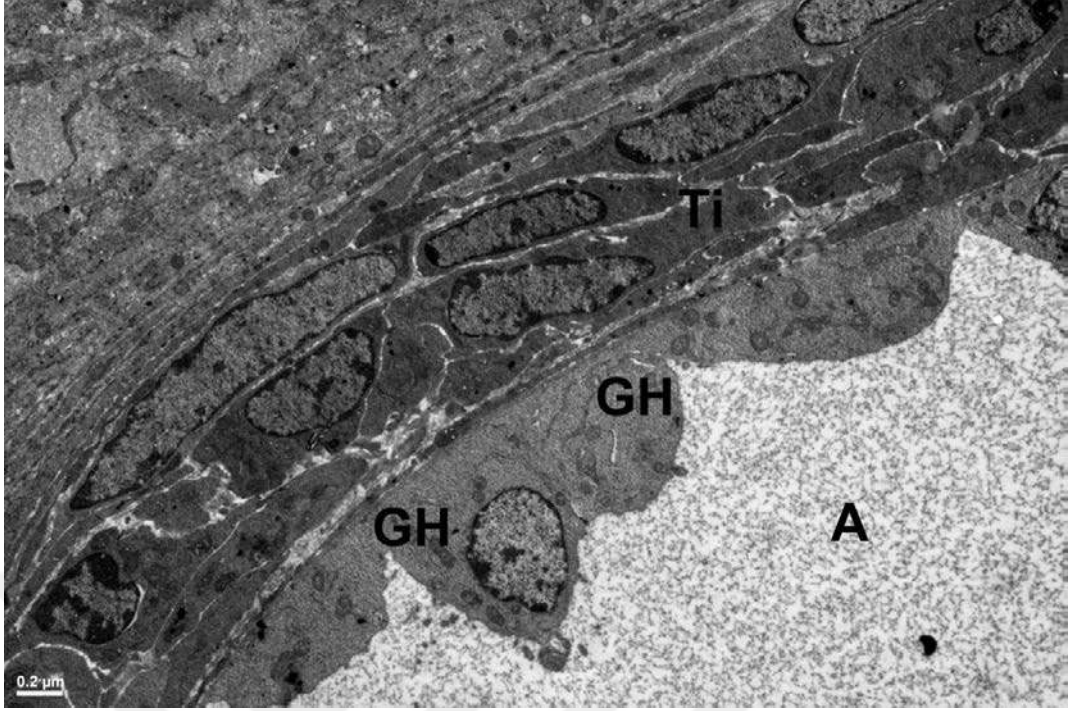
Şekil 41. 3. Grup (Tedavi grubu). Primordiyal foliküle ait merkezi yerleşimli oosit (O) ve onu saran foliküler hücreler (FH), bazal lamina (BL), mitokondriyonlar (m). Bar= 1 µm.



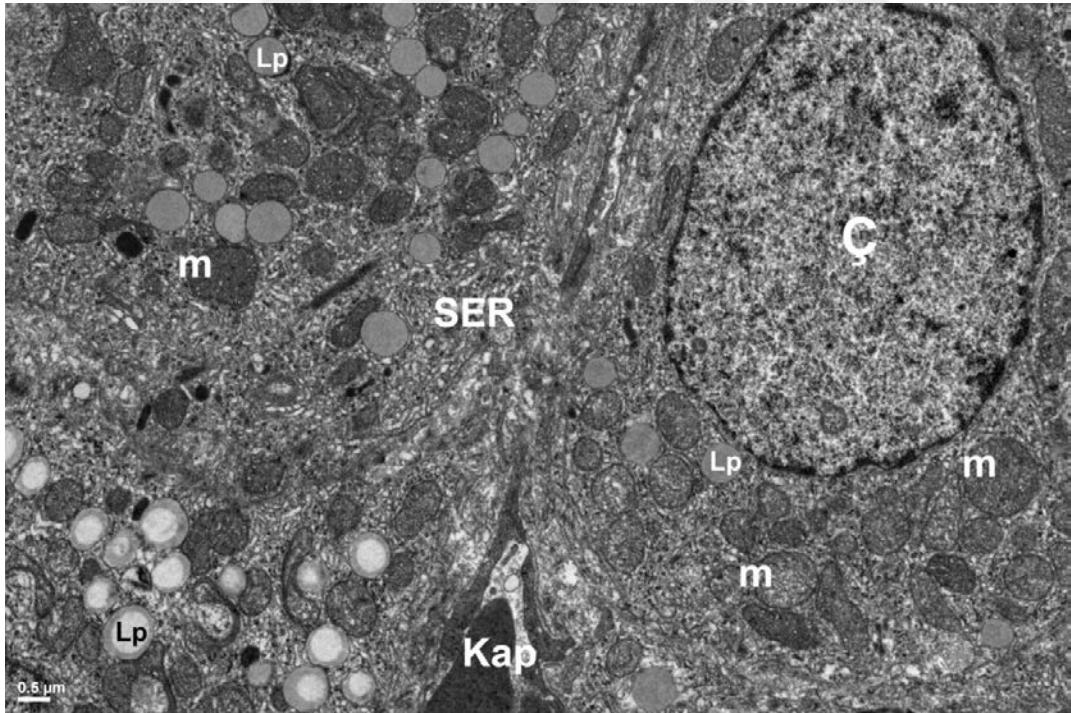
Şekil 42. 3. Grup (Tedavi grubu). Gelişimin ileri aşamasındaki folikülde oosit sitoplazmasında periferik yerleşim gösteren kortikal granüller (beyaz ok), oositi saran zona pellusida (ZP) tabakası içinde uzanan oosit mikrovillusları (ok başı) ile granüloza hücrelerinin (GH) sitoplazmik uzantıları (siyah ok) gözlenmekte. Bar= 0,2 µm.



Şekil 43. 3. Grup (Tedavi grubu). Antral folikülde sferikal şekilli çekirdeklere (Ç) sahip granüloza hücreleri (GH) arasında mitotik figürlerin (beyaz ok) bulunduğu görülmekte. Oosit (O), zona pellusida (ZP). Bar= 2 µm.



Şekil 44. 3. Grup (Tedavi grubu). Tek tabakalı granüloza hücreleri (GH) ile döşeli kistik folikül yapısı izlenmekte. Antrum (A), teka interna (Ti). Bar= 0,2 μ m.



Şekil 45. 3. Grup (Tedavi grubu). İnteristiyel alanda tübüler kristal mitokondriyonlar (m), gelişmiş agranüler endoplazmik retikulum (SER) ve çok sayıda lipid damlacıkları içeren (Lp) interistiyel hücreler izlenmekte. Çekirdek (Ç), kapillerler (Kap). Bar= 0,5 μ m.

5. TARTIŞMA

Oligo veya anovulasyon, menstruel bozukluk, hiperandrojenizm bulguları ve polikistik overlerle karakterize bir hastalık olan PKOS'nun patofizyolojisi, çok sayıda klinik ve deneysel veriye rağmen halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Hipotalamo-hipofizer, kardiyovasküler ve endokrin sistemleri içeren multisistemik ve reproduktif bir hastalık olan bu sendromda ortaya çıkan metabolik ve hormonal bozuklukların etkisiyle overler bu kompleks patolojinin en önemli bileşeni haline gelmektedir. Etyopatogenezi tam olarak bilinmediği için, günümüzde tedavi seçenekleri de genellikle semptomlara yöneliktir^{2,63}.

Son zamanlarda PKOS patogeneziyle ilişkili olarak farklı tedavi seçeneklerinin gündeme gelmesiyle birlikte araştırmacılar da bu konular üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Örneğin hastalığın patogenezinde öne sürülen insülin direnci ve hiperglisemiye düzenlemekte kullanılan metforminin, PKOS'lu hastalarda lipid profilini değiştirerek vücut ağırlığını azalttığı ve menstrüel siklusları düzenlediği kaydedilmiştir⁶⁵. Başka bir ilaç olan exenatid ise PKOS beraberinde gelişen insülin direncini azaltmak için kullanılmakta ve böylece insülin direncine paralel olarak gelişen hiperandrojenizm, overde fonksiyonel değişiklikler ve reproduktif bozuklukların iyileşmesini sağlamaktadır⁶⁶. Bunun yanında son yıllarda D vitamini tedavisi PKOS'nda semptomların giderilmesi için yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve yapılan araştırmalarda daha çok tedavinin hormonal ve metabolik sonuçları rapor edilmiştir^{7,8}. İnsan çalışmalarında ortaya çıkan etik ve teknik sınırlamalardan dolayı araştırmacılar çalışmalarında PKOS hayvan modellerini kullanmaya yönelmişlerdir. PKOS'lu kadınlar ile birebir aynı özellikleri gösteren herhangi bir hayvan modeli henüz bulunmamakla birlikte, bu modellerin prelinik çalışmaların oluşturulmasında, PKOS'nun nedenlerinin ve semptomlarının araştırılmasında, hormonal bozuklukların ve ovaryan yapının değerlendirilmesinde kullanışlı olduğu görülmüştür. Memeliler arasında sıçan ve fareler, kısa süren üreme ve östrus siklusuna ve gestasyonal periyoda sahip olup, hiperandrojenizm, çok sayıda kist oluşumu ve metabolik bozukluklar gibi PKOS belirtilerini gösterebilmektedir⁶⁷.

PKOS hayvan modelleri başlıca DHEA, dihidrotestosteron (DHT), estradiol valerate (EV) ve letrozol gibi hormonlar ile oluşturulabilmektedir⁶⁸. Yapılan birçok araştırmaya göre DHEA ile oluşturulan PKOS hayvan modelleri, insan PKOS'nun pek çok belirtisini gösterebilmekte olup, mekanizması tam olarak bilinmemektedir. DHEA uygulanan farelerden alınan over kesitlerinin histolojik değerlendirmesi sonucu over korteksinde çok sayıda atretik foliküller ve incelmış granüloza hücre tabakası içeren farklı büyüklükte kistik foliküllerin olduğu gözlenmiştir⁶⁹. Bunun yanında DHEA uygulaması yapılan fare overlerinde foliküler kist oluşumunun arttığı ve özellikle 23 günlük hayvanlara 20 gün süreyle yapılan uygulamanın kist gelişiminde daha etkili olduğu kaydedilmiştir. Puberte, sıçanlarda doğumdan sonra 35-40. günlerde insanlarda ise 12-14 yaşlarında başlamaktadır. Bu yüzden; DHEA uyarımlı PKOS'nun, insanlarda meydana gelen PKOS'nun erken başlangıcıyla (yaklaşık 15 yaş) uyum gösterdiği belirtilmiştir¹¹.

Yapılan literatür araştırmasında, PKOS'nda D vitamini desteğinin over histolojik yapısı üzerine etkilerini gösteren ışık ve elektron mikroskopik düzeyde bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızda; prepubertal dönemdeki sıçanlarda DHEA uygulaması ile PKOS oluşturularak, FSH, LH, LH/FSH ve testosteron değerleri ile overdeki yapısal değişiklikler D vitamini tedavi grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Deney sonunda tüm grumlardan alınan kan örneklerinin biyokimyasal verileri karşılaştırıldığında, PKOS modelinde LH seviyesinde oldukça belirgin olmak üzere serum FSH ve LH değerlerinin arttığı gözlemlendi. LH düzeyindeki belirgin artış LH/FSH oranının da artmasına yol açmakta, yetersiz kalan FSH sonucu foliküler maturasyon engellenmektedir. PKOS'nda görülen aşırı androjenin ana kaynağı overlerdir. Steroidler, birlikte çalışan teka ve granüloza hücreleri tarafından üretilirken, LH teka hücrelerini uyararak kolesterolden androstenedion üretilmesini sağlar. Daha sonra, androstenedion granüloza hücrelerinde FSH bağımlı aromataz ile östrojene dönüştürülürken polikistik overlerde testosteronu metabolize olmaktadır⁷³.

Çalışmamızda PKOS grubunda artan LH ve LH/FSH seviyelerine paralel olarak testosteron seviyesinde de artış gözlenmiş olup serum seks hormon

seviyelerinde gözlenen bu değişiklikler DHEA indüklü PKOS modelinde beklenen hormonal değişikliklerle uyumlu bulunmuştur. Nitekim Zhang ve arkadaşları DHEA'un ovaryan ve uterin hiperfibrozise yol açtığını gösteren çalışmalarında serum testosteron, LH ve LH/FSH seviyelerinin kontrol gruplarına kıyasla belirgin biçimde arttığını gözlemlemişlerdir⁷¹. Lai ve arkadaşları PKOS fare modelinde yüksek yağ içerikli besin diyetinin metabolik bozukluklara yol açtığını gösterdikleri çalışmalarında, DHEA uygulamasının serum testosteron seviyelerinde büyük artışa yol açtığını ve bunun da PKOS beraberinde gelişen hiperandrojenizm kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir⁷². Bazı kaynaklarda ise gerek serum testosteron gerekse serum LH seviyelerinde PKOS modeline zıt düşen sonuçlar rapor edilmiş olup bunun PKOS modeli oluşturmada başvurulacak farklı hormon çeşitlerinin etki mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Estradiol valerate indüklü PKOS sıçan modelinde oositlerin ultrastrüktürel yapısı ve in vitro maturasyonu üzerine metforminin etkilerinin incelendiği bir çalışmada serum testosteron seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı rapor edilmiştir⁶⁸. Tessaro ve arkadaşları ise 20 gün süreyle uygulanan DHEA ile PKOS oluşturdıkları fare modelinde, düşük doz oral FSH kullanımının folikül gelişimi üzerine etkilerini inceleyerek, DHEA'un LH üzerine daha önceki çalışmalarda gözlenen bilindik etkisinin dışında bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında serum testosteron değerlerinin PKOS grubunda kontrol grubuna göre belirgin şekilde artarken, serum LH seviyelerinin şaşırtıcı bir şekilde azaldığını kaydetmişlerdir⁷³.

Çalışmamızda PKOS modelinde yükselen hormon değerlerinin D vitamini tedavisi sonucu anlamlı olarak azaldığı saptandı. Tedavi grubunda serum FSH düzeyi kontrol grubuyla benzerlik göstermekteyken, serum LH, LH/FSH ve testosteron düzeylerinin ise belirgin şekilde azaldığı ancak kontrol grubuna göre hala yüksek olduğu görüldü (Çizelge 5). Yapılan bazı çalışmalarda da PKOS'lu kadınlarda uygulanan D vitamini tedavisini takiben hormonal ve metabolik değişikliklerde düzelme görüldüğü kaydedilmiş, bunun mekanizması tam olarak ortaya konulmamakla birlikte bu konu hakkında çeşitli görüşler ileri sürülmüştür⁸. D vitamininin etki mekanizması hem sellüler ve hem de genetik yollarla yönetilmekte olup vitamin D gen transkripsiyonu, iskelet, paratiroid

bezleri ve overler gibi birçok dokuda yayılmış bulunan D vitamini reseptörleri (VDR) ile gerçekleştirilmektedir⁷⁴. VDR'nin; LH, SHBG, testosteron ve insülin seviyeleri ile insülin direnci üzerine olan etkileri PKOS patogenezi ile ilişkilendirilmiştir⁷⁵. Bazı araştırmacılar PKOS'lu kadınlarda serum insülin seviyeleri ve insülin direnci ile VDR gen polimorfizmi arasında önemli bir ilişki olduğunu belirtirken⁷⁶, bazıları da VDR'nin, aromataz gen ekspresyonunu düzenlemek ve ekstraselüler kalsiyum homeostazisini devam ettirmek yoluyla overdeki östrojen biyosentezinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir⁷⁷.

Çalışmamızdaki folikül sayım sonuçları değerlendirildiğinde; primer folikül, sekonder folikül ve korpus luteum sayılarının gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptandı. Tersiyer folikül sayısı PKOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken; tedavi uygulanan grupta PKOS grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. Atretik ve kistik folikül sayısının ise PKOS grubunda anlamlı derecede artış gösterdiği ve tedavi sonucu tekrar azaldığı saptandı (Çizelge 6). Bu bulgulara dayanarak, atrezinin ileri gelişim dönemindeki foliküllerde belirgin olması ve antral foliküllerin kistik yapı kazanmasıyla birlikte tersiyer folikül sayısının azaldığı düşünüldü. Nitekim tedavi grubunda atretik ve kistik folikül sayısının azalmasıyla birlikte tersiyer folikül sayısında da artış gözlenmiştir. Androjenlerin immatür sıçanlara olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada; kısa dönem uygulama süresinin polikistik over morfolojisine sebep olurken orta dönem uygulama süresinin atreziye yol açtığı rapor edilmiştir. Rhesus maymunları ile yapılan başka bir çalışmada ise kısa dönem yüksek dozda androjen uygulaması ile uzun dönem daha düşük dozda androjen uygulamasının benzer sonuçlar verdiği ve her iki uygulamada da küçük folikül yüzdesinde bir artış gerçekleştiği rapor edilirken⁷⁸, başka bir çalışmada araştırmacılar ekzojen androstenedion uygulanan sıçan overlerinde korpus luteum miktarının sayıca azalmakla birlikte hala mevcut olduğunu kaydetmişlerdir⁷⁹.

Mariana ve arkadaşları PKOS oluşturulmuş sıçan modelinde metforminin foliküler gelişim ve ovaryan anjiyogenez üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında; primer foliküllerin PKOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdiğini ve metformin tedavisinden sonra kontrol grubuna

yakın değerlere ulaştığını gözlemlemişlerdir. Sekonder (erken antral) folikül sayılarının ise PKOS grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir değişiklik göstermediğini ve metformin tedavisinden sonra sekonder folikül yüzdesinin belirgin biçimde arttığını kaydetmişlerdir. Atretik folikül sayısının ise kontrol ve PKOS grupları arasında değişiklik göstermediğini fakat metforminin atretik folikül oranını belirgin derecede azalttığını vurgulamışlardır. Araştırmacılar korpus luteum yüzdesinin PKOS grubunda kontrol grubuna göre azalma gösterdiğini; metformin uygulamasından sonra ise korpus luteum yüzdesinin kontrol grubuna yakın değerlere ulaştığını, PKOS grubunda kist sayısında belirgin artış olduğunu ve metformin tedavisi ile birlikte kist sayısının azaldığını rapor etmişlerdir⁶⁵. Ikeda ve arkadaşlarının 7, 15 ve 30 gün boyunca DHEA uygulamasının folikül gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada, 7. günde kontrol grupları ile DHEA grupları arasında foliküler gelişim açısından bir fark görülmezken; 15.günde DHEA uygulanan grupta polikistik over morfolojisinin geliştiği gözlenmiştir. 30 günlük DHEA uygulaması sonrası ise 15.güne benzer olarak polikistik over morfolojisi yanında daha geniş kistik foliküller izlenmiştir. 30. günde folikül yüzdelere bakıldığında ise primer ve atretik foliküllerin kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı; erken preantral-erken antral folikül yüzdesinin ise belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir⁷⁸. Lai ve arkadaşları PKOS fare modelinde yaptıkları çalışmada; geniş antral folikül sayısının DHEA uygulanan grupta kontrol grubuna oranla belirgin biçimde arttığını saptamışlardır⁷². Tessaro ve arkadaşları ise PKOS fare modelinde DHEA uygulanan grupta küçük antral folikül sayısının azaldığını, atretik/kistik yapı gösteren geniş antral folikül sayısının ise arttığını rapor etmişlerdir⁷³. Tüm bu çalışmaların sonucu olarak; PKOS ile birlikte, foliküler büyümede durma ve dejeneratif değişikliklerin geliştiği belirtilmektedir. Bunun yanında; kistik düzenlenme gösteren foliküller ise artmaktadır. Bunun yetersiz FSH sekresyonuna ve prematür granüloza hücre farklılaşmasına bağlı olarak gelişmiş olabileceği belirtilmiştir⁵¹.

Sunulan çalışmada grupların ışık ve elektron mikroskopik bulguları karşılaştırıldığında; ışık mikroskopik kesitlerde yüzey epiteli, hemen altında bulunan tunika albuginea ve korteksteki çok sayıda primordiyal folikül ile

gelişimin farklı evlerindeki foliküllerin varlığıyla kontrol grubunda overlerin normal bir yapı sergilediği görülmekteyken (Şekil 7,8,9), DHEA uygulanan PKOS grubunda foliküllerde yapısal değişiklikler gözlemlendi. İnsan PKOS belirtilerine paralel olarak; overlerde çok sayıda atretik ve kistik foliküllerin varlığı dikkat çekiciydi. Antrumları foliküler sıvı birikiminden dolayı oldukça genişlemiş haldeki kistik foliküllerin granüloza hücre tabakaları incelmış ve teka interna tabakaları belirgin hale gelmişti. Oosit ve korona radyata yapılarının bulunmadığı kistik foliküllerde granüloza hücre tabakasının antruma bakan yüzeyinde hücrelerin yassılaştığı ve bazı foliküllerde antrum içerisinde makrofajların bulunduğu izlendi (Şekil 13). Ovaryan foliküllerde atrezinin normal süreç içerisinde erken postnatal ve prepubertal dönemlerde hem primordiyal hem de gelişen foliküllerde görüldüğü bilinmektedir²⁷. Ancak çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PKOS grubunda artan testosteron düzeyi ile uyumlu olarak atretik foliküllerde de artma olduğu gözlemlenmiştir. Nitekim yapılan birçok çalışmada, androjenlerin foliküler atreziyi düzenlediği, örneğin testosteronun sıçan overlerinde somatik hücre atrezisini artırdığı⁸⁰ ve büyümekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinde östrodiyolün antiapoptotik etkisini antagonize ettiği rapor edilmiştir.⁸¹ Bir başka çalışmada ise androjen uygulaması yapılan trans bireylerin overlerinde atretik folikül sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir⁷⁸.

Elektron mikroskopik kesitlerde, PKOS grubunda, granüloza hücrelerinde dejeneratif değişiklikler, oosit apoptozu ve zona pellusidada kalınlaşma izlendi. Aynı zamanda granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların azaldığı ve hücrelerin birbirlerinden ayrıldığı, kistik foliküllerde granüloza hücre tabakasının belirgin olarak incelendiği teka interna tabakasının ise kalınlaştığı gözlemlendi. Bu yapısal değişikliklerin DHEA uygulamasıyla yükselen testosteron seviyesi sonucu foliküler gelişimin bozulmasına ve artan atreziye bağlı olarak geliştiği düşünüldü. Nitekim Lee ve arkadaşları çalışmalarında foliküler gelişimin her aşamasında granüloza hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinin yüksek seviyelerde Connexin (Cx43) içerdiğini ve Cx43 ekspresyonunun foliküler gelişim süresince artarak foliküler atreziyle birlikte azaldığını belirtmişler, anormal androjen konsantrasyonları ve Cx43 ekspresyonunu PKOS patogenezi

ile ilişkilendirerek D vitamininin Cx43 downregülasyonunu önlediğini ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar, yüksek doz testosteron uygulaması ile granüloza hücrelerinde Cx43 ekspresyonunun azaldığını ve bunun D vitamini tedavisi ile tersine çevrilebileceğini kaydetmişlerdir⁸².

PKOS grubunun elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi sırasında dikkati çeken bir diğer bulgu da granüloza hücrelerinde primer silyumların varlığıydı. Çoğu memeli hücrelerinin apikal yüzeylerinde gözlenebilen bu organellerin mekano ve kemosensör olarak fonksiyon gördüğü bilinmekte olup, over yüzey epitel hücreleri ile preantral ve antral foliküllere ait granüloza hücrelerinde primer silyumların normal olarak bulunduğu rapor edilmiştir. Granüloza hücrelerinde bulunan primer silyumun reseptör fonksiyonu görerek folikülün ve oositin olgunlaşmasında ve folikülün ovulasyona hazırlanmasında rol oynadığı belirtilerek, PKOS'lu kadınlarda silyum yapısında oluşabilecek bozukluklar sonucunda ovulasyonun engellenebileceği ve kistik foliküllerin oluşabileceği bildirilmiştir⁸³. Abdul-Majeed ve Nauli yayınladıkları derleme çalışmasında böbrek, karaciğer, pankreas ve over gibi visseral organların polikistik hastalıklarında yapı ve fonksiyonları bozulmuş primer silyum yapılarının gözlemlendiğini ve bunların kist oluşumunda rol oynadığını belirterek vücudumuzdaki hormonal düzenlemeyle silyar bozukluk arasındaki ilişkinin aydınlatılması gerektiğini rapor etmişlerdir⁸⁴.

PKOS model grubunun mikrograflarında interstisyel alanda steroid salgılayan hücrelerin sitoplazmalarında lipid birikimi ve kolesterol kristallerinin varlığı da dikkat çekiciydi. Bu bulgular bize model grupta teka-interstisyel hücrelerde proliferasyonla birlikte steroidojenik kapasitenin de arttığını düşündürdü. Gerçekten de Kodaman ve arkadaşları PKOS patogenezine yönelik olarak yaptıkları çalışmada teka-interstisyel hücre proliferasyonu ile birlikte steroidojenik enzim aktivitesinde de artış meydana geldiğini belirterek bunun oksidatif stres veya bozulmuş insülin sinyalizasyonu ile ilişkili olarak steroidojenik enzimlerin tekal ekspresyonlarının artması sonucu gelişmiş olabileceğini öne sürmüşlerdir⁷⁰. Okutsu ve arkadaşları, ekzojen androstenedion uygulaması sonrası overlerde granüloza hücrelerinin bol miktarda lipid damlacıkları içerdiklerini, oositi bulunmayan ve ince granüloza

hücre tabakasına sahip geniş antral foliküllerin (foliküler kistler) iç yüzünde yassı ve epiteloid hücrelerin bulunduğunu, kist oluşumuna bağlı olarak apoptotik hücre sayısında artış ile birlikte makrofajların görüldüğünü kaydetmişlerdir. Ayrıca granüloza hücrelerinde luteinizasyondan sorumlu enzimlerin ekspresyonlarını tespit eden araştırmacılar, foliküler kistlerin antral foliküllerden meydana geldiğini ve androstenediyon uygulamasının ovaryan folikül gelişiminin ileri aşamalara ulaşmasını ve ovulasyonu engellediğini belirtmişlerdir⁷⁹. Zhang ve arkadaşları DHEA ile PKOS oluşturulan grupların over kesitlerinde, teka interna tabakaları oldukça belirgin içi sıvı dolu kistik foliküllerin sayıca artış gösterdiğini rapor etmişlerdir⁷¹. Tessaro ve arkadaşları ise çalışmalarında; DHEA uygulamasıyla geniş foliküllerde granüloza hücre tabakasının incelendiğini ve teka hücre tabakasının kalınlaştığını kaydetmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar tarafından kistik folikül oluşumunun yanı sıra atrezide ilerleme ve granüloza hücrelerinde piknotik değişikliklerin meydana geldiği, bazal membranın kesintili bir yapı gösterdiği, granüloza hücrelerinin birbirinden ayrıldığı, folikül duvarının iç kısmında yassılaştırmış epiteloid karakterdeki hücrelerin ve folikül sıvısı içerisinde makrofajların bulunduğu rapor edilmiştir⁷³.

Çalışmamızda, D vitamini tedavisi sonrası ovaryan folikül yapılarında iyileşme gözlenmiş olup benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalarda endokrin mekanizmaların foliküler gelişim, folikül seçimi ve foliküler atrezi üzerinde kritik rol oynadığı belirtilmiş olup, PKOS'nda testosteron artışının granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesi ve 17 β -östradiol sekresyonunu etkilediği ve folikül gelişimini bozduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar testosteronun özellikle erken gelişim dönemindeki foliküller üzerine etki ettiğini ve 1,25-D3'ün testosteronun bu etkisini azalttığını ileri sürmüşlerdir⁸². D vitamini eksikliği PKOS'lu hastalarda ortak risk faktörü olarak değerlendirilmekte olup, folikül gelişimi üzerine etkilerine bakıldığında; D vitamini eksikliğin Ca⁺ regülasyonunu bozduğu ve bunun sonucunda PKOS'lu kadınlarda foliküler gelişimin durduğu, buna bağlı olarak menstruasyon ve fertilité bozukluklarının meydana geldiği rapor edilmiştir⁶³. Bazı deneysel çalışmalarda, VDR-eksik mutant farelerde, günlük D vitamini desteğinin intestinal kalsiyum emilimini artırdığı, PKOS semptomlarını

ve gonadal disfonksiyonu tedavi ettiđi belirlenmiřtir⁸. Ott ve arkadařları PKOS'lu kadınlarda dūřuk hamilelik ve folikūl geliřim oranlarının, dūřuk veya eksik 25(OH)D seviyeleri ile iliřkili olduđunu rapor etmiřler ve ovaryan stimūlasyon uygulaması gōren PKOS'lu infertil kadınlarda D vitamini desteđinin yararlı etkileri olabileceđini ileri sūrmūřlerdir⁸⁵. Bunun yanında, IVF tedavisi gōren kadınlarda serum ve folikūler sıvıda D vitamini dūzeyinin yūkseklēđi ile artan hamilelik bařarısı iliřkilendirilmiřtir⁶³.

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde DHEA ile oluşturulan PKOS sıçan modelinde elde edilen bulguların PKOS'lu kadınlarda gōzlenen bulgular ile genellikle benzerlik gōsterdiđi ve D vitamini tedavisinin overdeki yapısal ve hormonal değeriklikler ūzerinde olumlu etkilerinin bulunduğu kanaatine varıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

DHEA ile oluşturulan PKOS sıçan modelinde, D vitamini tedavisinin over üzerine etkilerinin biyokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik düzeyde karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği bu çalışma sonucunda;

1. Serum FSH, LH değerleri, LH/FSH oranı ve testosteron düzeyi PKOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.
2. Tedavi grubunda FSH, LH değerleri, LH/FSH oranı ve testosteron düzeyi PKOS grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu.
3. Tedavi sonunda FSH değeri kontrol grubuyla benzerlik gösterirken, LH, LH/FSH ve testosteron değerleri kontrol grubuna göre hala yüksek bulundu.
4. Folikül sayımı sonucu, primer folikül, sekonder folikül ve korpus luteum sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.
5. Tersiyer folikül sayısının PKOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tedavi uygulanan grupta ise PKOS grubuna göre artarak kontrol grubuyla benzerlik gösterdiği saptandı.
6. Atretik folikül sayısının PKOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tedavi grubunda ise PKOS grubuna göre azaldığı ve kontrol grubuna yakın bir değere ulaştığı gözlemlendi.
7. Kistik folikül sayısı PKOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermişti ve tedavi uygulanan grupta kistik folikül sayısı anlamlı derecede azalmakla birlikte, kontrol grubuna göre hala yüksekti.
8. Işık mikroskopik olarak PKOS grubunda çok sayıda atretik ve kistik folliküllerin bulunduğu, kistik foliküllerde oosit ve korona radyatanın gözlenmediği, antrumun oldukça genişlediği, granüloza tabakasının belirgin şekilde incelendiği ve teka tabakasının kalınlaştığı izlendi.
9. Işık mikroskopik olarak tedavi grubunda kistik yapıdaki foliküllerin sayıca daha az olduğu ve çaplarının küçüldüğü gözlemlendi.

10. Elektron mikroskopik düzeyde, PKOS ve tedavi gruplarında bulgular ışık mikroskopik bulgularla uyumluydu.

Bu bulgular ışığında, çalışmamızda kullanılan DHEA sıçan modeli, hormon düzeyleri nedeniyle hiperandrojeneminin bir göstergesi olup çalışmaya ait sonuçların, hiperandrojenik ve hiperinsülinemik fenotipteki kadınlarda görülen PKOS ile benzerlik göstermesi muhtemeldir. Aynı şekilde diğer rodent modellerinin (prenatal dönemde androjenize edilen fareler, estradiol valerate kullanımı vb.) farklı PKOS kadın fenotipi özelliklerine benzerlik göstermesi de olasıdır. Uygulanan modellerde zamanlama, androjen uygulamasının süresi ve verilen hormon miktarının farklılığından dolayı, sonuçlarda da farklılıklar gözlenebilmektedir. Bu nedenle; tüm PKOS'lu kadınların aynı fenotipik özellikleri sergileyemeyeceği ve farklı PKOS fenotipine sahip hastaların overlerinde gözlenen değişikliklerin değerli bilgiler kazandırabileceği akılda tutulmalıdır.

Sonuç olarak, PKOS 1935'te tanımlanmış olmasına rağmen günümüzde patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır ve her geçen gün farklı tedavi yöntemleri önerilmektedir. Çalışmamızda tedavi yöntemlerinin bir yenisini olarak son zamanlarda sıkça kullanılan D vitamini desteğinin metabolik sorunları düzeltici etkisinin yanında, overdeki yapısal değişiklikleri etkileyip etkilemediği değerlendirilmiştir. Daha önce PKOS'unda D vitamini tedavisinin over üzerine etkilerini inceleyen herhangi elektron mikroskopik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden yaptığımız çalışma, bu konudaki ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

Çalışmanın değerlendirilmesi sonucu, PKOS grubunda gözlenen hormonal ve yapısal değişiklikler üzerine D vitamininin olumlu etkileri görülmekle birlikte daha uzun süre kullanımıyla tedavinin etkisinin artabileceği düşünüldü. D vitamininin uzun süre kullanımıyla ilgili daha fazla çalışmanın yapılması ve etkilerine yönelik bilgilerin artmasıyla birlikte PKOS'lu hastalarda bir tedavi seçeneği olarak kabul görebileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. **DUNAIF A.** Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis. *Endocrine Reviews*, **1997**; 18:6 774–800.
2. **Sirmans S M, Pate K A.** Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Epidemiology*, **2014**; 6 1–13.
3. **Talbott E O, Zborowskii J V, Boudraux M Y.** Do women with polycystic ovary syndrome have an increased risk of cardiovascular disease? Review of the evidence. *Minerva Ginecol*, **2004**; 56:1 27-39.
4. **Alexander C J, Tangchitnob E P, Lepor N E.** Polycystic ovary syndrome: a major unrecognized cardiovascular risk factor in women. *Rev Cardiovasc Med*, **2009**; 10 2:83-90.
5. **Wehr E, Pilz S, Schweighofer N, Giuliani A, Kopera D, Pieber T R, Pietsch O B.** Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology*, **2009**; 161 575–58.
6. **Krul-Poel Y H M, Snacke C, Louwers Y, Lips P, Lambalk C B, Laven J S E, Simsek S.** The role of vitamin D in metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *European Journal of Endocrinology*, **2013**; 169 853–865.
7. **Pludowski P, Holick M F, Pilz S, Wagner C L, Hollis B W, Grant W B, Shoenfeld Y, Lerchbaum E, Llewellyn D J, Kienreich K, Soni M.** Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—A review of recent evidence. *Autoimmunity Reviews*, **2013**; 12: 976–989.
8. **Lerchbaum E, Pietsch B O.** Vitamin D and fertility: a systematic review. *European Journal of Endocrinology*, **2012**; 166 765–778.
9. **Panidis D, Balaris C, Farmakiotis D, Rousso D, Kourtis A, Balaris V, Katsikis I, Zournatzi V, Kandarakis E D.** Serum Parathyroid Hormone Concentrations Are Increased in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Clinical Chemistry*, **2005**; 51:9.
10. **Patra S K, Nasrat H, Goswami B, Jain A.** Vitamin D as a predictor of insulin resistance in Polycystic Ovarian Syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **2012**; 6:146–149.
11. **Jang M, Lee M J, Lee J M, Bae C S, Kim S H, Ryu J H, Cho I H.** Oriental Medicine Kyung-Ok-Ko Prevents and Alleviates Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovarian Syndrome in Rats. *PLoS ONE*, **2014**; 9 2: e87623.
12. **Wang F, Zhang Z, Wang Z, Xiao K, Wang Q, Su J.** Expression and clinical significance of the HIF-1 α /ET-2 signaling pathway during the development and treatment of polycystic ovary syndrome. *J Mol Hist*, **2015**; 46:173–181.
13. **Masszi G, Novak A, Tarszabo R, Horvath E M, Buday A, Ruisanchez E, Tokes A M, Sara L, Benko R, Nadasy G L, Revesz C, Hamar P, Benyó Z, Varbiro S.** Effects of vitamin D3 derivative – calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model. *Pharmacological Reports*, **2013**; 65 476-483.

14. **Masszi G, Benko R, Csibi N, Horvath E M, Tokes A M, Novak A, Beres N J, Tarszabo R, Buday A, Repas C, Bekesi G, Patocs A, Nadasy G L, Hamar P, Benyo Z, Varbiro S.** Endothelial relaxation mechanisms and nitrate stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Life Sciences*, **2013**; 93:133–138.
15. **Sára L, Nádasy G, Antal P, Szekeres M, Kiss A M, Horváth E M, Tőkés A M, Masszi G, Monos E, Várbiro S.** Arterial biomechanics in a rat polycystic ovary syndrome model – Effects of parallel vitamin D3 treatment. *Acta Physiologica Hungarica*, **2012**; 99:3 279–288.
16. **Garg G, Kachhawa G, Ramot R, Khadgawat R, Tandon N, Sreenivas V, Kriplani A, Gupta N.** Effect of vitamin D supplementation on insulin kinetics and cardiovascular risk factors in polycystic ovarian syndrome: a pilot study. *Endocrine Connection*, **2015**; 4: 108–116.
17. **Selimoglu H, Duran C, Kiyici S, Ersoy C, Guclu M, Ozkaya G, Tuncel E, Erturk E, Imamoglu S.** The effect of vitamin D replacement therapy on insulin resistance and androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, **2010**; 33:4 234-238.
18. **Ross MH, Pawlina W.** Histology: A text and atlas. 6th ED, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2011**; 830 – 845.
19. **Mescher A L.** Junqueira's Basic Histology. 13th ED, The McGraw-Hill Companies, Inc., **2013**; Chapter 22.
20. **Boubekri A, Gernigon-Spychalowicz T, Khammar F, Exbrayat J M.** Histological and immunohistological aspects of the ovarian cycle of the algerian wild sand rat, *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, **2007**; 45:1, 41-49.
21. **Nilsson E E, Kezele P, Skinner M K.** Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2002**; 188: 65-73.
22. **Silva-Buttkus P D, Jayasooriya G S, Mora J M, Mobberley M, Ryder T A, Baithun M, Stark J, Franks S and Hardy K.** Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *Journal of Cell Science*, **2008**; 121:23.
23. **Devine P J, Payne C M, McCuskey M K, Hoyer P B.** Ultrastructural Evaluation of Oocytes During Atresia in Rat Ovarian Follicles. *Biology of Reproduction*, **2000**; 63:1245–1252.
24. **Magoffin D A, Weitsman S R.** Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Luteinizing Hormone (LH) Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression and LH-Stimulated Signal Transduction in Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells. *Biology of Reproduction*, **1994**; 51:766-775.
25. **Oshea J D.** An Ultrastructural Study of Smooth Muscle-like Cells in the Theca Externa of Ovarian Follicles in the Rat. *Anat. Rec. Journal.*, **1969**; 167: 127-140.
26. **Picton H, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **1998**; 145:27–37.
27. **Guigon C J, Magre S.** Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. *Biology of Reproduction*, **2006**; 74:450–458.
28. **Satoh M.** The histogenesis of the gonad in rat embryos. *J Anat.* **1985**; 143: 17–37.

29. **Rajah R, Glaser E M, Hirshfield A N.** The Changing Architecture of the Neonatal Rat Ovary During Histogenesis. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, **1992**; 194:177-192.
30. **Neill J D.** Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. *3rd Edition, London, USA, Elsevier Academic Press, 2006.*
31. **Guraya SS, Uppal J.** Morphological and histochemical studies on the foetal and postnatal ovaries of the field rat (*Millardia melitana*). *Acta Morphol Neerl Scand.* **1978**; 16 4:287-304.
32. **Cossigny D A, Findlay J K, Drummond A E.** The effects of FSH and activin A on follicle development in vitro. *Reproduction*, **2012**; 143 221–229.
33. **Silva J F, Ocarino N M, Serakides R.** Luteal activity of pregnant rats with hypo-and hyperthyroidism. *Journal of Ovarian Research*, **2014**; 7:75.
34. **Kierszenbaum A L.** Histoloji ve Hücre Biyolojisi & Patolojiye Giriş. *Palme Yayınları, Ankara. 2006.*
35. **Choi J Y, Jo M W, Lee E Y, Choi D S.** AKT is involved in granulosa cell autophagy regulation via mTOR signaling during rat follicular development and atresia. *Reproduction*, **2014**; 147:73–80.
36. **B. F. Kingsbury.** Atresia and the interstitial cells of the ovary. *American Journal of Anatomy.* **1939**; 65:2 309–331.
37. **Carithers J R, Green J A.** Ultrastructure of rat ovarian interstitial cells I. Normal structure and regressive changes following hypophysectomy. *Journal of Ultrastructure Research.* **1972**; 39:3-4 239-25.
38. **Cappellen W A.** Ovarian follicle dynamics in the rat: regulation and flexibility. *Erasmus University Rotterdam.* **1998**; 19-20.
39. **Paccola C C, Resende C G, Stumpp T, Miraglia S M, Cipriano I.** The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim. Reprod.*, **2013**; 10:4 677-683.
40. **Gulinello M.** Behavioral Core Protocols and Training, Estrous Cycle Staging: The Rodent Estrous Cycle. *Albert Einstein College of Medicine. Behavioral Core Facility.*
41. **Marcondes F K, Bianchi F J, Tanno A P.** Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.*, **2002**; 62 4A:609-14.
42. **SPORNITZ UM, SOCIN C D, DRAVID A A.** Estrous Stage Determination in Rats by Means of Scanning Electron Microscopic Images of Uterine Surface Epithelium. *THE ANATOMICAL RECORD*, **1999**; 254:116–126.
43. **WESTWOOD F R.** The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, **2008**; 36: 375-384.
44. **İde T, Mülazımoğlu B.** Ratlarda Bakım ve Beslenme. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 45-47.
45. **Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR.** A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem*, **2005**; 80 2:79-87.
46. **March W A, Moore V M, Willson K J, Phillips D I W, Norman R J, Davies M J.** The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction*, **2010**; 544–551.

47. **Cirik D A, Dilbaz B.** What do we know about metabolic syndrome in adolescents with PCOS? *J Turk Ger Gynecol Assoc*, **2014**; 15: 49-55.
48. **Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale H F, Futterweit W, Janssen O E, Legro R S, Norman R J., Taylor A E, Witchel S F.** POSITION STATEMENT: Criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2006**; 91: 4237–4245.
49. **Teede H, Deeks A, Moran L.** Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Medicine*, **2010**; 8:41.
50. **Abbott D H, Dumesic D A, Franks S.** Developmental origin of polycystic ovary syndrome – a hypothesis. *Journal of Endocrinology*, **2002**; 174, 1–5.
51. **Chang R J, Cook-Andersen H.** Disordered follicle development. *Mol Cell Endocrinol.*, **2013**; 3730 : 51–60.
52. **Franks S, Hardy K.** Aberrant follicle development and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Annals of Endocrinology*, **2010**; 71: 228-230.
53. **Dewailly D, Lujan M E, Carmina E, Cedars M I, Laven J, Norman R J, Escobar-Morreale H F.** Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Human Reproduction Update*, **2014**; 334–352.
54. **Hughesdon PE.** Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet Gynecol Surv.*, **1982**; 37 2:59-77.
55. **Webber L J, Stubbs S, Stark J, Trew G H, Margara R, Hardy K, Franks S.** Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*, **2003**; 362: 1017–21.
56. **Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale H F, Franks S, Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R, Pfeifer M, Pignatelli D, Pugeat M, Yildiz B O.** The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *European Journal of Endocrinology*, **2014**; 171:1–29.
57. **Mesbah F, Moslem M, Vojdani Z, Mirkhani H.** Does metformin improve in vitro maturation and ultrastructure of oocytes retrieved from estradiol valerate polycystic ovary syndrome-induced rats. *Journal of Ovarian Research*, **2015**; 8:74.
58. **Lerchbaum E, Rabe T.** Vitamin D and female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **2014**; 26:145–150.
59. **Irani M, Merhi Z.** Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. *Fertil Steril*, **2014**; 102:460–8.
60. **He C , Lin Z, Robb S W, Ezeamama A E.** Serum Vitamin D Levels and Polycystic Ovary syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, **2015**; 7:4555-4577.
61. **Jia XZ, Wang M, Zhang N, Guo LN, Zhen XL, Li H, Wei L.** Effect of vitamin D on clinical and biochemical parameters in polycystic ovary syndrome women: A meta-analysis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **2015**; 41 11:1791-802.
62. **Raja-Khan N, Shah J, Stetter C M, Lott Mary E J, Kunselman A R, Dodson W C, Legro R S.** High-dose Vitamin D Supplementation and Measures of Insulin Sensitivity in Polycystic Ovary Syndrome: a Randomized Controlled Pilot Trial. *Fertil Steril*, **2014**; 1016: 1740–1746.

63. **Thomson R L, Spedding S, Buckley J D.** Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, **2012**; 77:343–350.
64. **Mehmet K.** Elektron mikroskopi teknikleri. *ÇÜTF Dergisi*. **1984**.
65. **Di Pietro M, Parborell F, Irusta G, Pascuali N, Bas D, Bianchi M S, Tesone M, Abramovich D.** Metformin regulates ovarian angiogenesis and follicular development in a female Polycystic Ovary Syndrome rat model. *Endocrinology*, **2015**; 156 4:1453-63.
66. **Tao X, Zhang X, Ge S, Zhang E, Zhang B.** Expression of SIRT1 in the ovaries of rats with polycystic ovary syndrome before and after therapeutic intervention with exenatide. *Int J Clin Exp Pathol*, **2015**; 8 7:8276-8283.
67. **Walters K A, Allan C M, Handelsman D J.** Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.*, **2012**; 86 5:149.
68. **Mesbah F, Moslem Mohsen, Vojdani Zahra, Mirkhani H.** Does metformin improve in vitro maturation and ultrastructure of oocytes retrieved from estradiol valerate polycystic ovary syndrome-induced rats. *Journal of Ovarian Research*, **2015**; 8:74.
69. **Luchetti C G, Solano M E, Sander V, Arcos M L, Gonzalez C, Di Girolamo G, Chiocchio S, Cremaschi G, Motta A B.** Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol.*, **2004**; 64 1-2:59-74.
70. **Pinar H. Kodaman.** Statins: Do they have potential in the treatment of polycystic ovary syndrome? *Semin Reprod Med.*, **2008**; 26 1: 127–138.
71. **Zhang X, Zhang C, Shen S, Xia Y, Yi Long, Gao Q, Wang Yong.** Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Human Reproduction*, **2013**; 3074–3085.
72. **Lai H, Jia X, Yu Q, Zhang C, Qiao J, Guan Y, Kang J.** High-Fat Diet Induces Significant Metabolic Disorders in a Mouse Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Biol Reprod.*, **2014**; 91 5:127.
73. **Tessaro I, Modina S C, Franciosi F, Sivelli G, Terzaghi L, Lodde V, Luciano A M.** Effect of oral administration of low-dose follicle stimulating hormone on hyperandrogenized mice as a model of polycystic ovary syndrome. *Journal of Ovarian Research*, **2015**; 8:64.
74. **Jones G, Strungell S A, Deluca H F.** Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, **1998**; 1194-1221.
75. **Ranjad F, Mahban A, Shemirani A I, Mahmoudi T , Vahedi M, Nikzamir A, Zali M R.** Influence of gene variants related to calcium homeostasis on biochemical parameters of women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet*, **2011**; 28:225–232.
76. **Mahmoudi T.** Genetic variation in the vitamin D receptor and polycystic ovary syndrome risk. *Fertil Steril*, **2009**; 92: 1381-3.
77. **Kinuta K. Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y.** Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads. *Endocrinology*, **2000**; 141 4:1317-24.
78. **Ikeda K, Baba T, Morishita M, Honnma H, Endo T, Kiya T, Saito T.** Long term treatment with dehydroepiandrosterone may lead to follicular atresia through interaction with anti-Mullerian hormone. *J Ovarian Res.*, **2014**; 30 7:46.

79. **Okutsu Y, Itoh MT, Takahashi N, Ishizuka B.** Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary. *Fertil Steril*, **2010**; 93 3:927-35.
80. **Azzolin GC, Saiduddin S.** Effect of androgens on the ovarian morphology of the hypophysectomized rat. *Proc Soc Exp Biol Med.*, **1983**; 172 1:70-3.
81. **Billig H, Furuta I, Hsueh A J.** Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.*, **1993**; 133 5:2204-12.
82. **Lee CT, Wang JY, Chou KY, Hsu MI.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases testosterone-induced 17beta-estradiol secretion and reverses testosterone-reduced connexin 43 in rat granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2014**; 12:90.
83. **Teilmann S C, Byskov A G, Pedersen P A, Wheatley D N, Pazour G J, Christensen S T.** Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Mol Reprod Dev.* , **2005**; 71 4:444-52.
84. **Abdul-Majeed S, Nauli S M.** Polycystic diseases in visceral organs. *Obstet Gynecol Int.*, **2011**; 2011:609370.
85. **Ott J, Wattar L, Kurz C, Seemann R, Huber JC, Mayerhofer K, Vytiska-Binstorfer E.** Parameters for calcium metabolism in women with polycystic ovary syndrome who undergo clomiphene citrate stimulation: a prospective cohort study. *Eur J Endocrinol.*, **2012**; 166 5:897-902.

ÖZGEÇMİŞ

Latife Seyran Çelik 1989'da Mersin'de doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Mersin'de tamamladı. 2013'de Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Mezuniyetini takiben 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Latife Seyran Çelik hala aynı anabilim dalında eğitim-öğretimini sürdürmektedir.

