



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**PKOS MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
ADJUVANLARIN ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE VE
İNFERTİLİTE ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
Özlem ORUÇ

Tez Danışmanı
PROF. DR. Yıldız UYAR

Manisa, 2022

ÖNSÖZ

Asistanlığım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Yıldız UYAR'a;

Asistanlık süresi boyunca tecrübe, beceri ve bilgilerini bizlere aktaran sayın hocalarım Prof. Dr. Semra Oruç Koltan, Prof. Dr. Naci Kemal Kuşçu, Prof. Dr. Tevfik Güvenal, Prof. Dr. Aslı Göker, Prof. Dr. Burcu Artunç Ülkümen ve Doç. Dr. Pınar Solmaz Hasdemir'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanış aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Seda Vatansever'e ve Doktora Öğr. Üyesi Tuna Önal'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda görevli asistan arkadaşlarım ve uzmanlığını alıp aramızdan ayrılmış doktor arkadaşlarıma;

Rotasyonlarım sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tüm hocalarıma, uzman ve asistan meslektaşlarıma;

Uzmanlık eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm hemşire arkadaşlarıma, poliklinik ve servisimizdeki tüm tıbbi sekreter ve yardımcı sağlık personellerimize içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini daima yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde sonsuz emek, özveri ve fedakarlıkların sahibi canım annem Nermin ORUÇ'a ve biricik kardeşim İbrahim ORUÇ'a tüm içtenliğimle ayrı ayrı teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Özlem ORUÇ

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. PKOS patogenezi	10
Tablo 2. OGTT Değerler	15
Tablo 3. PKOS Ve Obezite	21
Tablo 4. Ayırıcı Tanı Özellikleri	24
Tablo 5. Parafin Doku Takip Protokolü	33
Tablo 6. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü	34
Tablo 7. İmmunhistokimyasal Analiz Protokolü	36
Tablo 8. Tüm deney gruplarına ait FSH, LH ve Testosteron için ELISA analizi sonuçları (ortalama $\pm$ std sapma)	39
Tablo 9. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait $\alpha\beta 3$ integrin H-Skor değerleri	50
Tablo 10. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait LIF H-Skor değerleri	52
Tablo 11. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait MUC-1 H-Skor değerleri	54
Tablo 12. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait EGF H-Skor değerleri	56

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Polikistik overlerin ultrasonografik ve makroskobik görüntüsü	7
Şekil 2. Modifiye Ferriman-Gallwey Skorlaması	13
Şekil 3.Quercetin Molekülü	27
Şekil 4. Letrozol uygulaması sonunda Kontrol, PKOS ve Sham gruplarına ait vücut ağırlığının karşılaştırılması	38
Şekil 5. Tüm gruplara ait glukoz tolerans testi grafiği	39
Şekil 6. Kontrol grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri	40
Şekil 7.PKOS grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri.	41
Şekil 8.PKOS+Etanol grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri.	42
Şekil 9.PKOS+Quercetin grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri	43
Şekil 10.PKOS+İrisin grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri	44
Şekil 11.PKOS+GH grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri	45
Şekil 12.Foliküllerde GDF9'un ekspresyonu	46
Şekil 13.Foliküllerde GDF9'un ekspresyonu	46
Şekil 14.Foliküllerde BMP15'in ekspresyonu	47
Şekil 15.Foliküllerde BMP15'in ekspresyonu	48
Şekil 16.Tüm gruplara ait uterus dokularında $\alpha\beta 3$ integrin immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik	49
Şekil 17.Uterusta $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonu	50
Şekil 18.Uterusta $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonu	51
Şekil 19.Tüm gruplara ait uterus dokularında LIF immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik	52

Şekil 20.Uterusta LIF ekspresyonu	53
Şekil 21.Uterusta LIF ekspresyonu	53
Şekil 22.Tüm gruplara ait uterus dokularında MUC-1 immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik	54
Şekil 23.Uterusta MUC-1 ekspresyonu	55
Şekil 24.Uterusta MUC-1 ekspresyonu	55
Şekil 25.Tüm gruplara ait uterus dokularında EGF immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik	56
Şekil 26.Uterusta EGF ekspresyonu	57
Şekil 27.Uterusta EGF ekspresyonu	57



KISALTMALAR

AES: Androjen Excess Society

AMH: anti mülleriyan hormon

ark.: arkadaşları

AS: androstenedion

ASRM: American Society for Reproductive Medicine

BMI: vücut kitle indeksi

CRP: C-Reaktif protein

CMC: Karboksimetilselüloz

DHT: Dihidrotestosteron

DM: Diyabetes mellitus

DHEA: Dehidroepiandrosteron

DHEAS: Dehidroepiandrosteron sülfat

ESHRE: European Society for Human Reproduction and Embryology

FSH: Folikül Stimulan Hormon

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

GH: Büyüme Hormonu

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon

HDL: High Density Lipoproteins

HLA: İnsan lökosit antijen

HOMA-IR: Homeostaz modeli değerlendirme insülin rezistansı

H&E: Hematoksilen-Eozin

IGF-1: insülin benzeri büyüme faktörü-1

IGFBP-1: insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1

IR: İnsülin Rezistansı

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

KVH: Kardiyovasküler sistem hastalıkları

LH: Luteinizan Hormon

LDL: Low Density Lipoproteins

MAPK: Mitojen aktive protein kinaz

NIH: Ulusal Sağlık Enstitüsü

NICHD: Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişim Enstitüsü

OGTT: Oral glukoz tolerans testi

OKS: Oral kontraseptifler

PKOS: Polikistik over sendromu

PI-3K: Fosfatidil inozitol 3 kinaz

SHBG: Seks hormonu bağlayıcı globülin

T: total testosteron

VLDL: Very Low Density Lipoproteins

QUICKI: Kantitatif insülin duyarlılığı kontrolü

17-OHP: 17-hidroksiprogesteron

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
TABLO DİZİNİ	III
ŞEKİL DİZİNİ	IV
KISALTMALAR	VI
İÇİNDEKİLER	VIII
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Polikistik Over Sendromu	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Tanı Kriterleri	5
2.1.3. PKOS Patofizyolojisi	7
2.1.4. Klinik Bulgular	11
2.1.5. Tedavi	20
2.1.6. Ayırıcı Tanı	23
2.1.7. Laboratuvar Bulguları	24
2.2. Quercetin	26
2.3. İrisin	28
2.4. Büyüme Hormonu	29
III. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Deney Tasarımı	30
3.1.1. Östrus Siklusunun İncelenmesi	31
3.1.2. Glukoz Tolerans Testi	32
3.1.3. Biyokimyasal Analiz	32
3.1.4. Parafin Takip İşlemi	33

3.1.5. Histokimyasal Analizler	34
3.1.6. İmmunohistokimyasal Analizler	35
3.1.7. İstatisksel Analiz	37
IV. BULGULAR	38
4.1. Östrus Siklusunun İncelenmesi	38
4.2. Vücut ağırlıklarının Ölçülmesi	38
4.3. Glukoz Tolerans Testinin Değerlendirmesi	39
4.4. Biyokimyasal Bulgular	39
4.5. Histolojik Bulgular	40
4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular	45
4.6.1. Ovaryumda GDF 9 Değerlendirmesi	45
4.6.2. Ovaryumda BMP 15 Değerlendirmesi	47
4.6.3. Uterusta $\alpha\beta 3$ integrin Değerlendirmesi	48
4.6.4. Uterusta LIF Değerlendirmesi	51
4.6.5. Uterusta MUC-1 Değerlendirmesi	53
4.6.6. Uterusta EGF Değerlendirmesi	56
V. TARTIŞMA	58
VI.SONUÇ	65
VII.ÖZET	67
VIII.İNGİLİZCE ÖZET	68
IX.KAYNAKLAR	70

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Polikistik over sendromu (PKOS) dünya sağlık örgütünün verilerine göre reproduktif dönemdeki kadınların yaklaşık %5-10'unu etkilemektedir. Ovulasyonun görülmemesi ya da azalması (oligo/anovulasyon) ile karakterize, insülin direncini de içinde barındıran, hiperandrojenizm ve polikistik overlerin görülmesi ile bilinmektedir. Ayrıca hirsutizm, akne, alopesi, obezite, oksidatif stres, infertilite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik anomalilere de neden olmaktadır. Patofizyolojisinde artmış androjen, östrojen, hiperinsülinemi ve genetiğin de rol oynadığı gösterilmiştir. PKOS ve endometrial reseptivite arasında oksidatif strese bağlı gelişen doğrudan bir ilişki olduğu da bildirilmiştir. Endometrial reseptivite, implantasyon penceresi döneminde blastokist ile uterus arasındaki karşılıklı etkileşimdir. PKOS'a bağlı ortaya çıkan reaktif oksijen radikallerinin endometrial reseptiviteyi olumsuz yönde etkileyerek bu dönemde blastokistin uterusu tutunmasını engellediği düşünülmektedir. Bu yönüyle reaktif oksijen radikallerinin azaltılmasının, PKOS'lu hastaların tedavi sürecinde gebelik başarı oranlarını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. Aynı zamanda PKOS, üreme çağındaki kadınlarda ovulatuvar disfonksiyona neden olmasından dolayı kısırlığın en önemli sebeplerinden birini oluşturur. Foliküller belli büyüklüğe eriştikten sonra hormonal bozukluklar nedeniyle daha fazla gelişemez ve ovulasyon gerçekleşemez. Ovulasyonun yarım kalmasıyla milimetrik çaplarda kistik yapıda foliküller gelişir. Folikül gelişimi ovaryan korteksin yakın kısmında olduğundan, gelişemeyen foliküller overlerin yüzeyine yakın olarak dizilirler ve ultrasonda tipik görünümü oluştururlar ve böylece fazla sayıda oosit gelişmesi, oositlerin kalitesinin azalmasına sebep olur. Gebelik isteyen PKOS'lu hastalarda ovulasyon indüksiyonu yapılırken, gebelik istemeyenlerde hormonal tedavi ile adet döngüsünün düzenlenmesi gerekir. Tedavi hastanın

yaşı, ovulasyon olup olmaması, gebelik istenip istenmemesine göre şekillenmektedir.

Son yıllarda fitoöstrojen olan quercetin PKOS ve kısırlık tedavisi üzerine etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Quercetin; elma, çilek, üzüm ve soğan gibi meyve ve sebzelerde bulunan bir bitki flavonoididir. Çeşitli kanser türlerine, akciğer hastalıklarına, kardiyovasküler sistem hastalıklarına ve yaşlanmaya karşı koruyucu ve antioksidan etkileri bildirilmiştir. İrisin ise yeni tanımlanmış bir miyokindir. En belirgin etkisi, beyaz yağ dokularının kahverengi yağ dokusuna dönüşümünü teşvik etmek ve glikoz düzeylerinin düzenlenmesine katkı sağlayarak metabolizmayı düzenlemektir. Metabolik komplikasyonlarla bağlantısı olan PKOS gelişiminde insülin direnci önemli rol oynar. Çalışmalar PKOS'lu hastalarda önemli endokrin değişikliklerden biri olan insülin direnci ve hiperinsülineminin oosit gelişimi ve endometrial reseptiviteyi çeşitli düzeylerde etkileyebileceğini göstermiştir. Büyüme hormonu, ön hipofiz bezi tarafından salgılanan, hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli rol oynayan peptit yapıda bir hormondur. IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1) gibi ilgili büyüme faktörleri ve büyüme hormonu reseptörü ile insanların ve sıçanların endometriyumunda ifade edilmektedir. Büyüme hormonu etkisi ile endometriumun daha kalın ve daha iyi bir patern gösterdiği ve daha iyi klinik gebelik oranları sağladığı saptanmıştır. Büyüme hormonunun infertil kadınlarda endometrial reseptiviteyi artırdığı pek çok çalışmada gösterilmiştir ve bu etkiyi endometrial reseptivite ile ilgili bazı gen ve proteinleri regüle ederek sağlayabilmektedir. Kısırlık tedavisinde büyüme hormonu eklenmesinin oosit sayısını fazla arttırmadığı halde gebelik ve canlı doğum oranlarını iyileştirdiğinin saptanması, oosit kalitesini ve böylece infertilite tedavilerinin başarısını arttırabileceğini düşündürmüştür.

Polikistik over sendromunun klinik tedavisinde kullanılan klasik ilaçlara destek olarak besin takviyeleri ve vitaminler güncel araştırma konusudur. Bunların hücresel etkinlikleri ile ilgili çalışmalar azdır. Bizde bu çalışmada antioksidan etkisi olan quercetin, insülin hassasiyetini arttırdığı gösterilen irisinin ve hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli rolü bulunan büyüme

hormonunun PKOS modeli oluşturulmuş sıçanlarda endometrial reseptivite ve oosit maturasyonu üzerine etkisini araştırmayı hedefledik.



II. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromu

2.1.1. Tarihçe

İlk kez Fransız doktorlardan Achard ve Thiers 1921 yılında sakallı bir kadında diyabet tanımlayarak karbonhidrat metabolizması, insülin direnci ve hiperandrojenizm arasındaki bağlantıya dikkat çekmişlerdir (1). Bunu takiben PKOS için; hirşutizm, menstrüel düzensizlik (oligo/anovulasyon), çok sayıda antral folikül içeren overleri içinde bulunduran tanı kriterleri ilk kez 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından bildirilmiş ve tedavi için de wedge rezeksiyonu önerilmiştir. Araştırmacılar bu hastalara over wedge rezeksiyonu işlemini uygulamışlar ve hastaların menstrüel siklus düzeninin geri döndüğünü saptamışlardır ayrıca patolojik incelemede ise, ovaryan kapsülün kalınlaşmış olduğunu ve over boyutlarının normalin 2-3 katına çıktığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle hastalığın sebebinin kalınlaşmış ovaryan korteks ve gelişmekte olan over foliküllerinin yüzeye ulaşmasının engellendiğini iddia etmişlerdir (2). 1976'da Kahn ve ark. 1980 yılında Burghen ve ark. insülin direncini saptamış, ayrıca yapılan çalışmalarda polikistik over görünümü olan hastalarda gonadotropin ve androjen seviyelerinde anormallikler olduğu söylenmiş, LH (Luteinizan Hormon) ve FSH (Folikül Stimulan Hormon) oranının, LH lehine bozulduğu saptanmış bu oran tanıda kullanılmaya başlanmıştır (3,6). 1981'de ise Swanson ve ark. tarafından polikistik overin ultrasonografik bulgusu gösterilmiştir (4). 1985'te de Adams ve ark. ultrasonografik bulguların polikistik over sendromu tanı kriterleri arasında yer alabileceğini savunmuşlardır (5). Günümüzde PKOS'un kabul gören tanı kriterleri, uluslararası konsensuslarla belirlenmiştir. Bunların ilki 1990 yılında NIH/NICHD (Ulusal Sağlık

Enstitüsü/Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişim Enstitüsü) tarafından menstrüel düzensizlikler ile birlikte biyokimyasal ve/veya klinik olarak androjen yüksekliğinin olması gerektiği söylenmiştir ve bu tanımlamada ultrasonografik olarak polikistik görünüm tanı kriteri olarak alınmamıştır. Tanı için iki kriterin bulunması gerektiği ve hiperandrojeneminin diğer nedenlerinin (konjenital adrenal hiperplazi, androjen salgılayan tümörler, tiroid hormon bozuklukları, hiperprolaktinemi ve Cushing sendromu gibi) ekarte edilmesi gerektiği belirtilmiştir. (7, 8). Daha sonra 2003 yılında Hollanda Rotterdam'da düzenlenen bir konferans sırasında ESHRE/ASRM (European Society for Human Reproduction and Embryology / American Society for Reproductive Medicine) sponsorlu PKOS Konsensüs Çalışma Grubu tarafından "Rotterdam Kriterleri" adı altında PKOS tanı kriterlerine overin ultrasonla belirlenen boyutunu ve morfolojisini dahil etti. Rotterdam Kriterleri'ne göre tanı için üç kriterden ikisinin bulunması ve diğer etyolojik faktörlerin ekarte edilmesi gerekmektedir (8). Son olarak 2006'da AES (Androjen Excess Society) sendromun diğer belirtileriyle birlikte hiperandrojenizmin daha ön planda olduğu yeni tanı kriterlerini belirledi (9).

PKOS'un sadece menstrüasyon bozuklukları, infertilite ve hiperandrojenizme neden olmakla kalmayıp, aynı zamanda metabolizma ile ilgili çeşitli riskleri barındırmasından dolayı; tıpta, hastaların tedavisinde uygun ilerleme adına PKOS'un tanımlanmasına yönelik daha fazla çalışmanın gerekli olduğu düşünülmektedir. PKOS ile ilgili ilk yayının üzerinden uzun yıllar geçmesine rağmen PKOS'un etiyolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. PKOS'un etiyolojisinin multifaktöriyel ve poligenik olduğu kabul edilmektedir ve çalışmalar hala devam etmektedir.

2.1.2. Tanı Kriterleri

PKOS'un tanı kriterlerinde birçok defa değişikliklere gidilmesinin nedeni farklı klinik durumlarla birliktelik göstermesidir. Tanımlanan 3 PKOS tanı

konsensusu NIH 1990, ESHRE/ASRM 2003 ve AE-PKOS (Androgen Excess-PKOS Society) 2006 konsensuslarıdır.

NIH 1990, İki kriteri de içermelidir:

- 1-Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- 2-Oligo/anovulasyon

ESHRE/ASRM Rotterdam 2003, Üç kriterden ikisi tanı için gereklidir:

- 1-Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- 2-Oligo/anovulasyon
- 3-Ultrasonografik incelemede polikistik over görünümü

AE PKOS 2006, İki kriteri de içermelidir:

- 1-Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- 2-Oligo/anovulasyon ve/veya polikistik overler

Günümüzde en sık kullanılan kriter 2003'te ESHRE/ASRM tarafından belirlenen kriterdir (8). Hastalar PKOS tanısı konması için üç kriterden ikisini göstermelidir. Anovulasyon, PKOS hastaları arasında en yaygın bulgudur ve PKOS'lu kadınların yaklaşık %95'inde görülmektedir (10, 11). Genellikle bir yılda sekizden az döngüde oligomenore veya üç aydan fazla döngüde amenore olarak gösterilir. Hiperandrojenizm, PKOS'lu hastaların yaklaşık %60'ında görülür (12). Hiperandrojenizmin klinik bulguları akne, hirsutizm ve alopesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Hiperandrojenizm, dolaşımdaki androjen seviyeleri ölçülerek biyokimyasal olarak da gösterilebilir (13).

Polikistik over görünümü tek başına PKOS tanısı koydurmaz fakat polikistik overlerin varlığı, PKOS için önemli bir tanı kriteridir. Polikistik over görünümü şu şekilde tarif edilmektedir; her overde çapı 2-9 mm olan 12 veya daha fazla

folikül varlığı ve/veya over hacmi artışının 10 ml üzerinde olmasıdır (Şekil 1, 14).



Şekil 1. Polikistik overlerin ultrasonografik ve makroskobik görüntüsü

PKOS tanısı konmadan önce hastada ayırıcı tanıları dışlamak gerekmektedir. Hiperprolaktinemi (kronik anovulasyona neden olmakta), klasik olmayan konjenital adrenal hiperplazi (aşırı androjen üretimine neden olmakta), Cushing sendromu (insülin direncinin yanı sıra üç tanı kriterine de neden olur) ve androjen salgılayan tümörlerin varlığı gibi bozuklukları dışlamak için basit testler yapılmalıdır (15).

PKOS'un görülme prevalansı tanı kriterlerinin seçimine göre değişmektedir. Genel olarak üreme çağındaki kadınların %4- 12'sinde görüldüğü söylenebilir (16). 2016 yılında Bozdağ ve ark.'nın yaptıkları bir metaanalizde NIH kriterlerine göre PKOS'un genel prevalansının %6 olduğunu, Rotterdam veya AE-PKOS Society kriterlerinin alt kümeleri uygulandığında bu prevalansın %10 olduğunu göstermektedir (17). Türkiye'de gerçekleştirilen ve bu meta analizde de kullanılan çalışmaya göre NIH, Rotterdam ve AES kriterlerine göre Türkiye'de görülme prevalansı sırasıyla %6,1, %19,9 ve %15,3'tür (18).

2.1.3. PKOS Patofizyolojisi

Polikistik over sendromunun gelişim patofizyolojisi hala net bir şekilde aydınlatılamamıştır ancak hastaların klinik görünümündeki farklılıklar genetik, metabolik, endokrin, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin önemli olduğunu göstermektedir. Genel kanı, çeşitli genetik ve çevresel koşulların bir araya gelmesi sonucunda PKOS tablosunun oluştuğu yönündedir (19). Çevresel faktörlerden; sedanter yaşam, yeme bozuklukları, sigara kullanımı, düşük sosyokültürel durumun da patogeneizde etkili olabileceği düşünülmektedir (20).

Normalde menstruel siklus periyodunda hipotalamusun arkuat nükleusundan, GnRH (Gonadotropin Salgılatıcı Hormon) pulsatil olarak salgılanır ve bu da anterior hipofizden gonadotropinlerin pulsatil salgılanması ile sonuçlanır. Gonadotropin salgılatıcı hormon pulsatilitesinin azalması durumunda FSH'nin beta subuniti, GnRH pulsatilitesinin artması durumunda LH'nin beta subunitinin salgılanması uyarılmış olur (21). Polikistik over sendromu olgularında GnRH'nin pulsatil salınım düzeni bozulur ve bunun akabinde LH salınım amplitüdü ve frekansı artar, FSH salgısı erken foliküler fazda belirgin olarak düşüşe uğrar. FSH ve LH salgısındaki bu değişimin nedeninin, GnRH salgısının frekansında artış olması ve bunun neticesinde LH salınımına göre FSH'nin göreceli olarak supresyona uğraması olduğu düşünülmektedir (22). LH salınım frekansındaki ve amplitüdündeki artış sebebiyle LH/FSH oranında artış olabilmektedir. Bununla birlikte olguların %20-40'ında LH düzeylerinin, LH/FSH oranını arttıracak şekilde yükselmediği de görülmektedir (23). LH stimülasyonu sonrasında polikistik overlerden alınan teka hücrelerinin kültüründe androjen sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan sitokrom P450C17 alfa enzim sisteminin etkisinin intrensek bir anormallik sonucu azaldığı ve bu nedenle ovaryan teka hücrelerinde androjen salınımının arttığı, yapılan klinik ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (15, 24). Dolayısıyla artmış folikül içi androjen düzeyleri foliküler atreziye neden olur ve bunun sonucunda azalmış foliküler gelişime bağlı olarak PKOS'lu kişilerde kronik anovulasyon görülür. Aynı zamanda dolaşımda artan androjen düzeyleri, hastanın lipid profilinde anormalliklere, alopesi, hirsutizm ve akne gelişimine neden olur. Göreceli olarak azalmış olan FSH ve artmış androjen düzeyi,

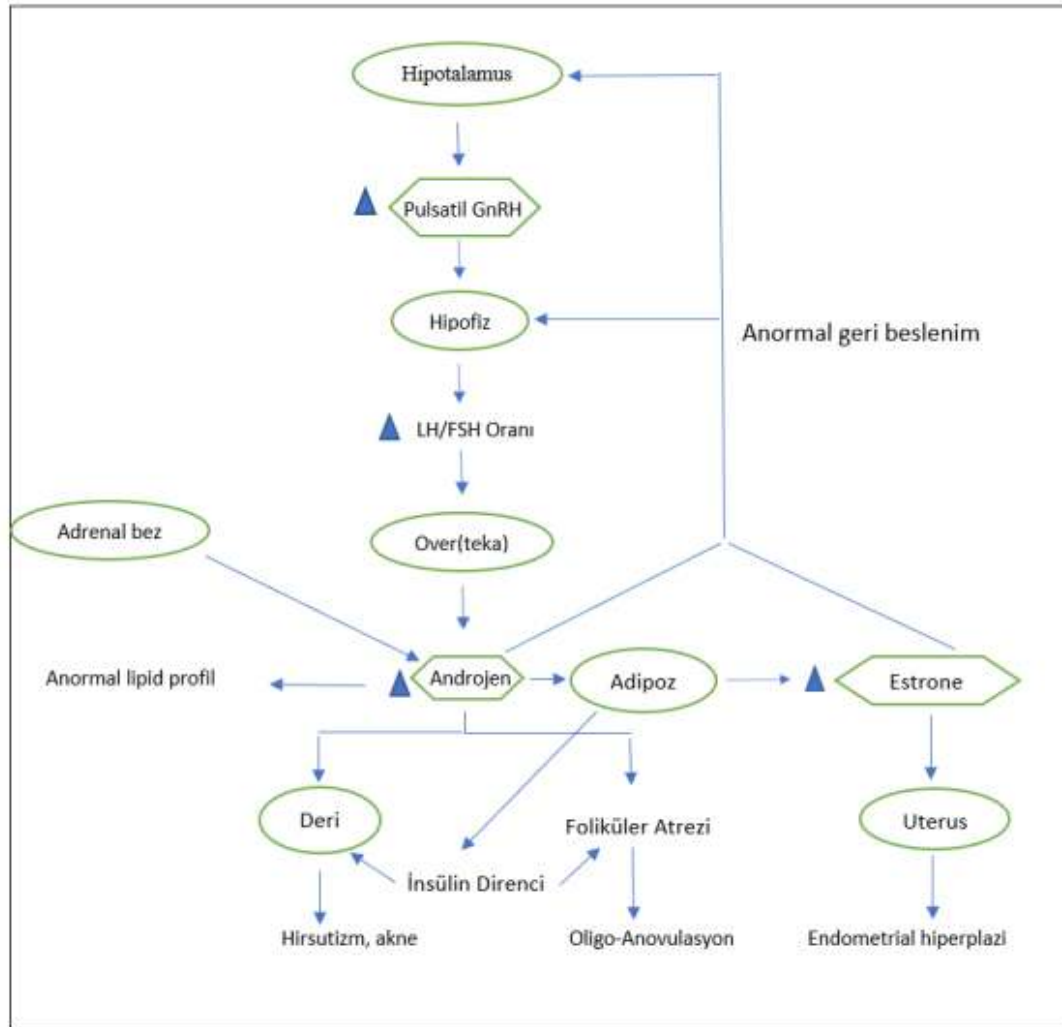
granüloza hücrelerinde aromataz enziminin yeterince uyarılamamasına sebep olur. Yüksek serum androjenleri (özellikle androstenedion), periferde östrojenlere (özellikle östron'a) dönüştürülür. Bu dönüşüm öncelikle yağ dokusunun stromal hücrelerinde görüldüğünden, östrojen üretimi obez PKOS olgularında daha fazla olacaktır. Bu sebeple obez PKOS'lu hastalarda kronik östrojen maruziyeti, endometrial hiperplaziye neden olacaktır (25).

İnsülin, pankreas β -hücrelerinden salgılanan 51 aminoasitten oluşan peptit yapıda bir hormondur. Kas, karaciğer ve yağ dokusunda glikozun hücre içine alımını uyararak ve metabolizmada lipolizi baskılayarak glikoz kullanımını artırır (26). Dolaşımda yeterli miktarda insülin bulunmasına rağmen insülinin biyolojik etkilerinin (glikoz up-take yanıtının) beklenenden az olması durumuna insülin direnci denir (27). PKOS tanı kriterlerinden biri olmamasına rağmen insülin direnci, PKOS patogenezinde önemli bir role sahiptir. PKOS'lu kadınların %64,4'ünde insülin rezistansı bulunmaktadır (28). Hiperinsülinemi ve insülin direnci, kilosu normal sınırlarda olan PKOS'lu kadınların %30'unda, obez PKOS'u olan kadınların ise %75'inde görülmektedir (24). İnsülin, metabolizmada iki farklı intrensek yol ile görevini gerçekleştirmektedir. Bunlardan ilki insülinin metabolik etkilerine aracılık eden PI-3K (fosfatidil inozitol 3 kinaz) yolu ve insülinin proliferatif etkilerine aracılık eden MAPK (mitojen aktive protein kinaz) yolağıdır. PKOS'lu kadınlardan elde edilen luteinize granüloza hücrelerinin seçici olarak hem insülinin proliferatif yolağını MAPK aracılığıyla aktive ettiği, hem de PI-3K aracılığıyla metabolik yolun direncini arttırdığı gösterilmiştir ve böylece insülinin, insülin direnci bulunan kadınlarda hiperandrojenizmi nasıl stimüle ettiğini açıklamaktadır (29). Bu seçici uyarıma insülin reseptörüne bağlı sinyal iletimindeki değişiklikler ile insülin reseptör sayısında azalma, post reseptör sinyal defekti, reseptör fosforilasyonundaki bozuklukların insülin direncinin gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (30). Artmış insülin direnci ve buna bağlı ortaya çıkan bozulmuş glukoz toleransının etkisiyle PKOS'lu kadınlarda hiperinsülinemi gelişmektedir (31). PKOS'daki hiperandrojenizmin patogenezinde artmış insülinin direkt ve indirekt rolü vardır.

1-LH ve artmış insülin miktarı overin teka hücrelerinde androjen üretimini artırır. (Tablo 1)

2-İnsülin yüksekliği, testosteronu ana dolaşımda taşıyan SHBG (seks hormonu binding globülinin) hepatik sentezini inhibe eder ve böylece biyolojik olarak aktif androjen ve östrojenlerin serbest fraksiyonları artar (32).

Tablo 1. PKOS patogenezi



PKOS'lu kadınlarda SHBG ek olarak karaciğerde üretilen IGFBP-1 (insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1) sentezinin azalması sonucu olarak da serbest IGF-1 artar. Artan insülin, overdeki IGF-1 reseptörlerine

bağlanarak LH'nın uyarılmasına neden olur. Bu da indirekt olarak teka hücrelerinden ovaryan androjen üretimi arttırarak hiperandrojenemiye yol açar (33, 34). Ancak bütün PKOS olan hastalarda insülin direnci olmaması ve insülin direnci olan bütün kadınlarda PKOS görülmemesi, insülin direnci ya da hiperinsülineminin PKOS'da tek başına primer neden ya da patojenik bir faktör olmadığını göstermektedir.

Türkiye'de 2003 yılında B. Yıldız ve ark. yaptığı bir çalışmada, PKOS'lu hastaların annelerinde ve kız kardeşlerinde hiperandrojenizm ve menstrüel disfonksiyonun arttığı; baba ve erkek kardeşlerde de serum androjen düzeylerinin artmış olduğu; ayrıca tüm birinci derece yakınlarında insülin direnci ve değişik derecelerde glukoz hemostaz bozukluklarının görülme riskinin yaş ve vücut kitle indeksi ile eşleştirilmiş sağlıklı kontrollere göre artmış olduğu gösterilmiş ve PKOS'lu hastaların birinci derece akrabalarında tarama yapılması gerektiğini önermişlerdir (35). Başka bir çalışmada HLA (insan lökosit antijen) olan DRW 6 frekansının PKOS olgularında arttığı ve altıncı kromozom üzerindeki HLA-DR bölgesinin PKOS gelişimi ile ilgisinin olduğu gösterilmiş ve ailesel geçişi desteklediği düşünülmüştür (36). Tüm bu bulgular sendromun kompleks, multifaktöriyel ve poligenik bir bozukluk olduğunu desteklemektedir.

2.1.4. Klinik Bulgular

Polikistik over sendromunun klinik bulguları peripubertal dönemde başlayan menstrüel düzensizlikler, hiperandrojenizm bulguları, obezite, insülin direnci ve infertilite bulguları olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.4.1. Menstrüel Düzensizlik

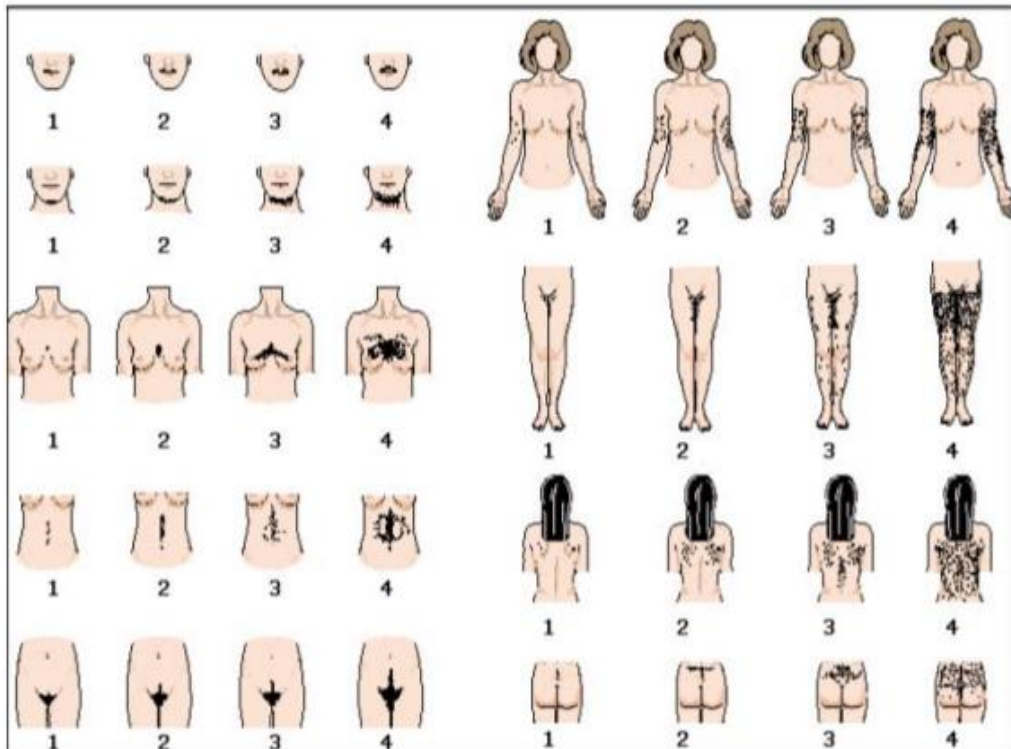
PKOS'u olan kadınlarda en sık görüldüğü belirtilen semptom kronik anovulasyona bağlı peripubertal dönemde başlayan menstrüel düzensizlik,

oligo/amenore şeklinde kliniğe yansır. PKOS'u olan kadınların ortalama %60-70'inde oligo/amenore görüldüğü çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak hastaların yalnızca %10'unda menstrüel sikluslar düzenli görülebilmektedir (12). Bu bilgi, düzenli menstrüasyonun tanıyı tamamen dışlamadığını göstermesi açısından kıymetlidir. Yılda 8'den az veya 35 günden uzun aralıklarla adet görülmesi durumuna oligomenore denir. Amenore ise adet yokluğunun kelime karşılığıdır ve 3 ay veya 3 siklustan uzun süre boyunca adet olmamayı ifade eder. Obezite, artmış insülin direnci, hiperinsülinemi, androstenedionun periferik aromatisasyonu ve artmış GnRH pulsatilitesi nedeniyle LH hormon düzeyleri yükselmekte ve anovulasyon gelişimine sebep olmaktadır (36). Bu hastalarda endometriumun mitotik uyarımı aktive olur ve endometrial hiperplazi ile endometrium kanseri riski artar (37). Önemli olarak, artmış androjen düzeyleri atrofik endometrium oluşturarak östrojenlere ters etki yapabilirler. Bu nedenle, yüksek androjen düzeyleri olan PKOS hastalarında amenore ve azalmış endometrial kalınlık görünmesi nadir değildir.

2.1.4.2. Hiperandrojenizmin

Polikistik over sendromu, biyokimyasal androjen fazlalığının ve bunun klinik yansıması olan hirsutizmin en sık rastlanan nedenidir. Bu hastalar tüm hirsutizmlilerin %78-86 gibi bir çoğunluğunu oluştururlar (38). PKOS'lu kadınlarda androjen fazlalığının en yaygın belirtisi hirsutizm olmakla birlikte, söz konusu kadınlarda ayrıca sebore, akne, alopesi veya hidradenitis süpürativa da görülebilir. Hirsutizm, kadınlarda kıllanmanın normalde çok hafif olduğu veya hiç olmadığı androjene bağımlı alanlarda, tipik olarak koyu renkli ve kalın telli kılların fazlalığı olarak tanımlanır. Vücudumuzda androjene bağımlı alanlar denilince dudak üstü, çene, yanaklar, kulaklar, karnın alt kısmı, sırt, göğüs, meme ve ekstremitelerin proksimal kısımları, kalçanın alt kısımları ve intergluteal bölge ifade edilmektedir. Dolaşımdaki majör androjen testosteron olmakla birlikte en potent olanı testosterondan 5 α -redüktazın enzimi ile oluşan DHT'dur (dihidrotestosterondur). DHT kıl folikülleri ve

derideki pilosebace birim gibi birçok duyarlı dokuda majör androjendir. Kadınlarda hirsutizmin esas nedeni anovulasyon ve overlerden aşırı androjen üretimidir (39). PKOS'lu kadınlardan alınan ovaryan foliküllerdeki teka ve granüloza hücreleri incelendiğinde, 5 α -redüktazın mRNA ekspresyonunun normal foliküllerde görülenlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır (40). Hem teşhiste hem de tedavide objektif kalabilmek amacıyla bu artışın şiddeti ve dağılımı bir skrolama sistemi kullanılarak kaydedilmektedir. Bu amaçla 1961 yılında Ferriman-Gallwey yöntemi tanımlanmıştır (41). Bu yöntemde kıl büyümesindeki artışın derecesi vücudun 9 farklı bölgesinde objektif olarak değerlendirilir. Bu bölgeler yüz (özellikle bıyık ve sakal bölgesi), göğüs, meme areolası, linea alba, sırtın üst kısımları, sırtın aşağı kısımları, kalçalar, uyluk iç kısımları ve dış genital bölgelerdir. Her bölge için 1 ile 4 arasında puan verilir. Toplam 8 puan ve üzerindeki değerler genellikle hirsutizm olarak değerlendirilir (Şekil 2).



Şekil 2. Modifiye Ferriman-Gallwey Skrolaması

Amerika Birleşik Devletleri'nde PKOS'lu hastaların %70'inde, Japonya'daki PKOS'lu hastaların %10-20'sinde hirsutizm gözlenmektedir (42). Polikistik over sendromlu kadınlarda, farklı coğrafi bölgeler arasında görülen farklı oranlardaki hirsutizm 5 α -redüktaz aktivitesinde olası genetik farklılıklarla açıklanmaktadır (43). PKOS hastalarında hiperandrojenizme bağlı gelişen diğer klinik bulgu aknedir. Akne vulgaris, adolesanlarda sık bir klinik bulgudur. Geç başlangıçlı olan ve tedaviye dirençli olan akne, PKOS'u düşündürmelidir (44). Kıl folikülünün inflamatuvar bir bozukluğu olan akne, PKOS'lu hastaların yaklaşık üçte birinde saptanabilir (12). Alopesi de androjen ile ilişkili bir süreç olmasının yanında demir eksikliği anemisi, yaşlanma gibi pek çok nedenlerle de kadınlarda alopesi görülebilir (45). Akne ve alopesi, PKOS'lu kadınlarda daha sık görülmektedir fakat tek başlarına olduklarında hiperandrojenizm için güvenilir bulgular değildir.

2.1.4.3. İnsülin Direnci ve Obezite

İnsülin direnci, PKOS'lu kadınların yaklaşık %60-80'inde görülürken, obez kadınların ise %95'inde görülmektedir (28). Polikistik over sendromlu kadınlarda, benzer yaş ve kilo ile eşleştirilmiş gruplar ile kıyaslandıklarında belirgin olarak artmış oranda glukoz intoleransı, insülin direnci ve Tip 2 DM (Diyabetes Mellitus) gelişimi olduğu gözlenmektedir (31,46). İnsülin direncinin değerlendirilmesinde altın standart, hiperinsülinemik öglisemik klemp testidir. Bu test ayrıca intravenöz glikoz tolerans testi olarak da adlandırılmaktadır. İntravenöz kateter ve aralıklı örnekleme gerektirir, yoğun emek ve zaman gerektirir ve klinik pratikte uygun değildir. Gösterilmiştir ki epidemiyolojik veya büyük klinik çalışmalar yapılırken hasta uyumu gerekliliği, maliyetli olması, deneyimli personel gerekliliği ve fazla zaman alması gibi nedenlerden ötürü son yıllarda uygulanmamaktadır. Bunun yerine diğer daha az duyarlı bazı belirteçler insülin direncini değerlendirmek için kullanılır ve şunları içerir:

- ✓ 2 saatlik glikoz tolerans testi
- ✓ Serum insülin seviyesi

- ✓ Serum glikozunun insüline oranları
- ✓ (HOMA-IR) Homeostaz modeli değerlendirmesi insülin rezistansı
- ✓ (QUICKI) Kantitatif insülin duyarlılığı kontrolü

İnsülin direnci ölçümünde açlık glukozun açlık insüline oranı kabaca bir fikir verse de HOMA-IR skorlaması (açlık glukoz × açlık insülin ÷ 405) daha güvenilirdir (47 s396, 48). Bu testlerden klinik pratikte en sık kullanılanı 2 saatlik glukoz tolerans testidir. Bu test hem bozulmuş glukoz toleransını göstermede etkilidir hem de Tip 2 DM ekartasyonunda önemlidir. Bu test obez PKOS tanılı hastalarda bahsedilen her iki komorbidite için risk faktörüdür. PKOS tanılı kadınlarda bozulmuş glukoz toleransı saptandığında bu kadınların her yıl Tip 2 DM yakalanma oranları 2 kat fazladır. Bu kadınların 2 saatlik glukoz tolerans testiyle belli aralıklarla takibi önem arz etmektedir (49). Androjen Excess-PKOS Society (AE-PKOS) bozulmuş glukoz tolerans testi olan PKOS tanılı kadınların her 2 yılda en az bir kez olmak kaydıyla glukoz tolerans testi ile taranmasını önermektedir (50).

Bozulmuş glukoz toleransı ve Tip 2 DM tanısı için değerleri ise aşağıdaki belirtildiği gibidir: (WHO kriterlerine göre 75 gram oral glukoz yüklemesinden sonra) (Tablo 2, 22)

Tablo 2. OGTT Değerler

Açlık kan glukozu (mg/dl)	75 gr glukoz yüklemesinden sonra 2. saat kan glukozu (mg/dl)		
	140(mg/dl) altı	140-200(mg/dl)	200(mg/dl) ve üzeri
110(mg/dl) altı	NORMAL	BGT	DİYABET
110-125(mg/dl)	BAG	BGT	DİYABET
126 ve üzeri	DİYABET	DİYABET	DİYABET

Serum glikozunun insüline oranında, oranının düşük olması, insülin direnci varlığını gösterir. Pek çok çalışmada sayısal değerin 4.5'in altında olması insülin direncini gösterdiği bildirilmiştir (51). İnsülin direnci için klinik pratikte uygulanan başka hesaplama formülü "Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance" terimi, kısaca HOMA-IR olarak adlandırılmaktadır. Aşağıda farklı birimlerle HOMA-IR hesaplaması gösterilmiştir.

$$\text{HOMA-IR} = \text{Açlık Glikoz}(\text{mmol/l}) \times \text{Açlık İnsülin}(\text{mU/l}) / 22,5$$

$$\text{HOMA-IR} = \text{Açlık Glikoz}(\text{mg/dL}) \times \text{Açlık İnsülin}(\text{uIU/mL}) / 405$$

HOMA skorunun bazı yayınlarda 2,5 ve bazı yayınlarda ise 2,8'in üzerinde olması IR ile ilişkilendirilmiştir. Normal kişilerde bu oran 2'nin altındadır. HOMA ile insülin direnci tespit edilen kişilerde OGTT (Oral Glukoz Tolerans Testi) ile normal glukoz toleransı saptansa bile hayatlarının ilerleyen zamanlarında Tip 2 DM gelişimi açısından risk taşıdıkları söylenebilir (52). Antropometrik göstergelerde HOMA-IR hesaplamasının önemli ölçüde pozitif korelasyon halinde olduğu görünmektedir. Yukarıda anlatılan bu formülasyonlar; insülin direncini belirlemede klinik kullanımda zaman almayan, maliyeti düşük, pratik araçlardır (53).

Obezite, vücutta biriken fazla yağın sağlık üzerinde olumsuz etkisi olabilecek seviyede çok olması nedeniyle oluşan tıbbi bir durumdur. Artan obezite prevalansı dünya çapında bir sağlık sorunudur. Aşırı kilo alımı, başta kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet olmak üzere çeşitli hastalıklar için artan bir riske neden olur (54). Öte yandan, artan obezite oranları gelişmekte olan ve gelişmiş tüm ülkelerde büyük bir sağlık sorununa ve ekonomik yüke yol açmaktadır (55). Obezite genellikle BMİ (vücut kitle indeksi) ile sınıflandırılır. BMİ, kilogram cinsinden vücut ağırlığının metre kare (kg/m²) cinsinden yüksekliğe bölünmesiyle hesaplanır.

✓ $\text{BMİ} = \text{Vücut ağırlığı (kg)} / \text{Boy uzunluğu(m}^2\text{)}$

Yaş olarak eşleştirilmiş kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında PKOS olan kadınlar obez olmaya daha yatkındırlar ve hastaların %35-50'sinde gözlenir. NIH tanımına göre PKOS'lu olgularda abdominal yağlanma ve buna bağlı kilo alma eğilimi görece fazladır ve abdominal yağlanma (android obezite) insülin direncini artırmaktadır (56). Daha önce belirtildiği gibi insülin direncinin PKOS patogenezinde büyük bir rolü vardır. Obezite arttıkça insülin direnci artmaktadır. Etkilenen kadınlarda artmış bel/kalça oranı (0,85'ten fazla oluşu android tip obezite varlığı), büyüyen adipositler, azalmış serum adiponektin düzeyleri ve düşük lipoprotein lipaz aktivitesi görülür.

Hiperandrojenemik kadınların %5-50'sinde gözlemlenen akantozis nigrikansın hiperinsülinemi varlığı ve şiddeti ile ilişkilidir. Bu dermatolojik oluşum simetrik, koyulaşmış, kadifemsi plaklara sahiptir. Deri katlantıları ve basınca maruz kalan eklem yüzeyleri gibi intertriginöz alanlarda görülürler. Melanosit artışı veya melanin birikimi ile ilgili kanıt yoktur ancak belirgin artmış pigmentasyon mevcuttur. Hiperinsülinemide azalma, koyulaşmış deri alanlarında düzelme ile ilişkilidir (57, 58).

2.1.4.4. Metabolik sendrom, Dislipidemi ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Metabolik Sendrom, insülin direnci, artmış vücut kitle indeksi, ateroskleroza sebep olan dislipidemi ve hipertansiyon ile karakterizedir. Artmış iskemik KVH (Kardiyovasküler sistem hastalıkları), hipertansiyon ve Tip 2 DM riski ile ilişkilidir (59). Metabolik Sendrom prevalansı PKOS'lu kadınlarda yaklaşık %45, yaş olarak düzeltilmiş kontrol grubunda ise %4 olarak bildirilmiştir (60). Aşağıdaki kriterlerden en az 3 tanesini karşılamasıyla metabolik sendrom tanısı konur:

- Hipertansiyon: Sistolik kan basıncı ≥ 130 mm-Hg diyastolik kan basıncı ≥ 85 mm-Hg
- Trigliserit ≥ 150 mg/dl
- HDL kadınlarda <50 mg/dl

- Açlık glikoz ≥ 100 mg/dl
- Bel çevresi kadınlarda 88 cm'den büyük olması

Özellikle bel çevresindeki kalınlık artışı anormal endokrinolojik ve metabolik fonksiyonu hususunda uyarıcıdır ve kardiyovasküler ve metabolik sendrom riskinde büyük bir artışla ilişkilidir (61).

Birçok çalışma, ateroskleroz gelişimi için erken bir durum olarak tanımlanan endotelyal disfonksiyonun PKOS'lu kadınlarda daha fazla olduğunu göstermiştir fakat mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır (62). PKOS aynı zamanda artmış düzeyde CRP, homosistein, plazminojen aktivatör inhibitörü-1, lipoprotein A ve ileri glikozilasyon son ürünleri; endotel disfonksiyonu ve azalmış fibrinoliz gibi geleneksel olmayan KVH risk faktörleriyle de ilişkilidir (63). PKOS'lu kadınlarda, sıklıkla sol ventrikül diyastolik disfonksiyonuna ve artmış internal ve eksternal karotid aterosklerozuna rastlanmıştır. Amerikan Kalp Derneği'nin tavsiyelerine dayanan AE-PKOS kılavuzları, PKOS'lu kadınların KVH riski altında sınıflandırıldığını belirtmektedir (64). PKOS'lu kadınlar, geleneksel KVH risk faktörleri açısından resmi olarak değerlendirilmelidir. Kan basıncını düşürmek KVH riskinde en büyük azalmayı sağladığından hipertansiyon metabolik sürveyansta önemli bir önceliktir. AE-PKOS ve Endokrin Derneği kılavuzları her vizitte kan basıncı ölçümü önermektedir ve hedef değer 120/80 mm-Hg'lık bir kan basıncıdır (65,66,67).

PKOS patofizyolojisinde yer alan insülin direnci ve hiperandrojenemi lipit profilinde bozukluklara yol açmaktadır. PKOS'lu kadınlarda hipertrigliseridemi, VLDL (Very Low Density Lipoproteins) ve LDL (Low Density Lipoproteins) seviyesinde artma, HDL (High Density Lipoproteins) seviyesinde azalma şeklinde dislipidemiye neden olmakta ve bu durum da PKOS'da vasküler hastalıklar için predispozan faktörler arasında yer almaktadır (66).

2.1.4.5. Kanser

Gelişmiş ülkelerde endometrium kanseri kadınlarda en sık görülen 4. kanserken, jinekolojik kanserler içinde 1. en sık görülen kanserdir. Gelişmekte olan ülkelerde serviks kanserinden sonra ikinci sıradadır. Türkiye’de en sık görülen jinekolojik kanser endometrium kanseridir (67). Ovulasyonda azalma, yetersiz progesteron sekresyonuna, kronik olarak karşılanmamış östrojene maruz kalan endometriumda mitotik aktivite artar, endometrial hiperplazi görülme ihtimali artmaktadır. Bu sebeple aralıklı kırıma kanaması ve anormal uterin kanama olabilir. PKOS’lu kadınlar, kronik hiperinsülinemi, artmış serum IGF-1 konsantrasyonları, hiperandrojenemi ve obezite dahil olmak üzere endometrial kanser için başka risk faktörlerine de sahiptirler. Bazı kadınlarda (özellikle obez olanlarda) adenokarsinom gelişebilir. Bir olgu kontrol çalışmasında, serumda androstenedion yüksekliği varsa endometrium karsinomu riskinin premenopozal kadınlarda 3,6 kat, postmenopozal kadınlarda 2,8 kat arttığı saptanmıştır (68). Postmenopozal hastalarda olanın tersine, PKOS hastalarında görülen endometrial kanserler sıklıkla iyi diferansiye tümörlerdir. PKOS’lu yüksek riskli hasta grubunda endometriyal biyopsi yapılması önerilmektedir. Bu hastalarda yaştan ziyade kronik anovulasyonun süresi oldukça önemlidir. Endometriyal biyopsi için literatürde eşik süre tanımlanmamıştır. Ancak ultrason ile özellikle 12 mm ve üzerindeki endometrial kalınlıklarda biyopsi alınması önerilmektedir (69).

2.1.4.6. İnfertilite

Polikistik over sendromunda görülen anovulasyon, menstrüel siklus düzensizliklerinin yaygın bir sebebidir ve sekonder İnfertilitenin en sık sebebidir. İnfertil hastaların %30’unda anovulasyon görülür ve anovulasyon vakalarının da %90’ı PKOS’dan kaynaklanır (69). PKOS’lu kadınların oogenezi süreci, normal fertiliteye sahip kadınların menstrüel döngüsünden farklıdır.

FSH yetersizliği, LH hipersekresyonu, hiperandrojenemi, insülin direnci, folikül sıvısındaki birçok mediatör dengesinin bozulması sonucu oosit maturasyonunda ve implantasyonda sorun oluştuğu belirtilmiştir (70). Genellikle ilk basamak tedavisinde klomifen sitrat kullanılır. En düşük etkili dozu belirlemek için ampirik olarak başlanır ve doz arttırma şeklinde devam edilir. (50-150 mg beş gün, siklusun üçüncü ila beşinci günü başlanır). Başlangıç dozu 50 mg'dır ancak ovulasyon sağlanamazsa 150 mg'a kadar çıkılabilir. Ovulasyon olan dozdan sonra altı siklusa kadar uygulanabilir. Klomifen sitrat kullanımı ile yapılan ovulasyon indüksiyonunda çoğul gebelik riski %5-8 arasındadır. Ovulasyonu gerçekteşmeyen, insülin direnci olan hastalarda metformin eklemek, ovaryan drilling yapmak ya da direkt eksojen gonadotropin tedavisine geçmek olası diğer alternatiflerdir. Bu yöntemlerle gebe kalamayan kadınlarda yardımcı üreme tekniklerinden faydalanılabilir (29).

2.1.5. Tedavi

PKOS'lu obez kadınlar için ilk ve en iyi tedavi yöntemi kilo vermek ve düzenli egzersizdir. PKOS olan obez kadınlar için diyet ve egzersize yönelik yaşam tarzı değişikliklerinin, yaşamın her döneminde ve tedavide belirgin önemi vardır. Az miktarda kilo kaybı bile (vücut ağırlığının %5'i) bazı kadınlarda normal ovulatuar siklusların düzene girmesi ile sonuçlanabilir. Bu düzelme, insülin direncinin azalması ve SHBG düzeylerindeki artışı aracılık ettiği androjen düzeylerindeki azalmadan kaynaklanır (71). BMI'nin yaşam tarzı değişikliği ile azaltılması, obezitenin; diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, kardiyovasküler sistem hastalık ve endometrium kanseri gibi olumsuz sonuçlarını da azaltır (Tablo 3, 72).

Tablo 3. PKOS Ve Obezite



Çocuk istemi olmayan PKOS'lu kadınlarda genellikle menstrüel ritmi geri kazandıran, hiperandrojenizmi azaltan ve ayrıca endometrial hiperplazi riskinin azaltılmasına katkıda bulunan OKS (oral kontraseptif) kullanmaları önerilir (73). Oral kontraseptifler aynı zamanda adrenal ve ovaryan androjen üretimini azaltarak hirsutizmi kadınlarda yaklaşık 2/3'ünde kıl büyümesini azaltırlar (74).

1. Oral kontraseptifler içindeki progestin komponenti ile LH'ı baskılar ve bu ovaryan androjen üretim azalması ile sonuçlanır.

2. Östrojen komponenti SHBG'nin hepatik üretimini artırır ve dolaşımda gezen serbest testosteronda azalmaya yol açar (75).

3. Bir dereceye kadar hem LH hem de SHBG'nin etkisinden bağımsız olan DHEAS (Dehidroepiandrosteron sülfat) da içeren dolaşımdaki androjen düzeylerini azaltır (76).

4. Östrojen 5 α -redüktazın inhibisyonu ile deride testosteronun DHT'a dönüşümünü azaltır.

PKOS'lu menstrüel kanamaları düzensiz kadınlardan oral kontraseptifleri tolere edemeyenlere sadece progestin içeren tedavilerin verilmesi kanamayı azaltabilir ya da tamamen kesebilir. Progestin içeren rahim içi araçların kullanılması da mümkündür. Progestin kullanımı endometrial hiperplazi ve kanser riskini de azaltır (77, 78). Birçok çalışmada insülini azaltan ve duyarlılığını arttıran ilaçların, PKOS ve insülin direnci olan kadınlarda serum testosteron düzeylerinin belirgin düşürdüğü gösterildiyse de obez hastaları barındıran bazı çalışmalarda aynı etki gösterilememiştir (79, 80). Bir biguanid olan metformin, karaciğerdeki insülin duyarlılığını artırarak glukoneogenezi ve hiperinsülinemiği azaltır. Klinik çalışmalarda görüldüğü şekliyle, PKOS'lu kadınların metformin kullanması sonucunda androjen düzeylerinde düşme, SHBG düzeyinde ve spontan ovulasyonda artma ayrıca klomifen sitrata ovulatuar yanıtta artma olur. Ancak, metforminin kılınmayı azalttığına dair bulgu elde edilememiştir. Yan etkileri arasında doz bağımlı ve zamanla azalan laktik asidoz gibi gastrointestinal etkiler bulunur. Bu nedenle renal, hepatik ya da kardiyovasküler bozukluğu olan hastalara reçete edilmemelidir. Hirşutizm tedavisinde oral kontraseptifler puberte döneminde kullanılmaya başlanabilir. Trigliserit düzeyi takip edilmelidir, nadirde olsa yükselme olabilir. Spironolakton hirşutizm ve akne tedavisinde kullanılabilir. Spironolakton bir aldosteron antagonistidir, kanrenon isimli metabolitinin testosteron ile yarışması nedeniyle pilosebace ünitelerinde doğrudan antiandrojenik etki oluşturur. En sık yan etkisi genellikle metroraji şeklinde olan menstrüel düzensizliklerdir ve aldosteron antagonisti olması sebebiyle serum potasyumunu yükseltebilir ve kontrolü gerekir (81). Flutamid ve finasterid diğer antiandrojenler arasındadır. Flutamid androjen reseptörü için yarışırken, finasterid 5- α redüktaz enzimini inhibe eder. İki ajanın da hirşutizm için etkili olduğu gösterilmiştir (82). Anovulasyona bağlı infertilitenin medikal tedavisinde PKOS'lu kadınlarda ilk

sırada klomifen sitrat kullanılmaktadır. Klomifen sitrat selektif östrojen reseptör modölatörüdür ve östrojenin negatif geri bildirimini önleyerek uzamış, artmış FSH salgısını sağlar (83). Bir aromataz inhibitörü olan letrozol de bir başka birinci basamak tedavi olarak, PKOS'da ovulasyon indüksiyonunda kullanılmaktadır. Letrozol, hipotalamik östrojen negatif geri bildirimini inhibe ederek östrojen reseptörlerini tüketmeden FSH salgısını artırır (84). İkinci basamak tedavi olarak düşük doz gonadotropin tedavisi öne sürülebilir. Cerrahi olarak ise Laparoskopik Ovaryan Drilling uygulanmasının en uygun olabileceği anovulatuvar kadınlar, PKOS'lu olup klomifen sitrata dirençli olanlar olarak söylenebilir. Teknik olarak over kapsülü unipolar bir koagüle edici akım ile 3 ile 6 yerden 4 ile 10 mm derinlikte olacak şekilde delinir. Eğilim her iki overe de müdahale edilmesi yönünde olmakla birlikte, unilateral ya da bilateral uygulandığında ovulasyon oranlarının benzer olduğu bildirilmiştir. IVF (In Vitro Fertilizasyon) PKOS'lu infertil kadınlarda uygulanabilir (85).

2.1.6. Ayırıcı Tanı

PKOS tanısı konulmadan önce, hirsutizme yol açabilecek hipofiz ve adrenal bez hastalıkları, menstrüel döngü düzensizlikleri, anovulasyon ile hiperandrojenizme neden olabilen hastalıklar ayırıcı tanı olarak ekarte edilmelidir. PKOS'u taklit eden ve androjen fazlalığı yapan diğer etiyolojilerin dışlanması önemlidir. Androjen salgılayan bir neoplastik süreç varlığı şüphesi araştırılmalıdır, gerekli görülürse ovaryan ya da adrenal görüntülenme yapılmalıdır. Metabolik taramanın kapsamına açlık lipid profili ve 2 saatlik bir OGTT dahil edilmelidir (Tablo 4).

Tablo 4.Ayırıcı Tanı Özellikleri

Hastalık	Hiperandrojenemi ve/veya Hiperandrojenizm	Oligoamenore	Klinik Özellikleri	Hormonal ve Biyokimyasal Özellikleri
Konjenital Adrenal Hiperplazi	Evet	Nadiren	Ailede infertilite ve/veya hirsutizm hikayesi	Bazal veya stimulyasyonla artmış 17 – hidroksiprogesteron düzeyleri
Cushing Sendromu	Evet	Evet	Hipertansiyon, stria, kolay morarma	24 saatlik idrarda yükselmiş serbest kortizol düzeyi
Prolaktinoma	Hayır veya hafif	Evet	Galaktore	Yükselmiş serum prolaktin düzeyi
Primer Hipotiroidi	Hayır veya hafif	Mevcut olabilir	Guatr olabilir	Artmış TSH düzeyleri, subnormal T4/ artmış prolaktin düzeyleri
Akromegali	Hayır veya hafif	Sık	Akrall genişleme, prognatizm	Plazma IGF-1 düzeylerinde artış
Premature Ovaryen Yetmezlik	Hayır	Evet	Diğer otoimmun endokrinopatiler olabilir	Artmış plazma FSH düzeyi ile normal ve subnormal estradiol düzeyi
Obezite	Sık	Nadiren	Dışlama tanısı	-
Virilizan Ovaryen/ Adrenal Neoplazi	Evet	Evet	Klitteromegali, aşırı hirsutizm, erkek tipi alopesi	Aşırı derecede artmış plazma androjen düzeyleri
İlaç ilişkili	Sık	Değişken	İlaç hikayesi	-

TSH: Tiroid uyarıcı hormon, T4:Tiroidin, IGF-1:İnsulin benzeri büyüme faktörü-1, FSH:Folikül stimulan hormon

2.1.7. Laboratuvar Bulguları

Hepsi olmasa da pek çok PKOS'lu kadın anormal gonadotropin salgı düzenine sahiptir. Normal bir sikluskteki hormonal dalgalanmaların aksine sürekli anovulasyon olan PKOS'lu kadınlarda, gonadotropinler ve seks steroidlerinde "sabit hal" olduğu tespit edilmiştir (86). En sık olarak, ortalama LH seviyesinde artış izlenir. FSH serum konsantrasyonu, yüksek LH/FSH oranına yol açacak şekilde normal veya düşük görülür (11). Zayıf olan hastalarda LH yüksekliği daha fazla gözlenir. Oranı 2'den büyük olan LH/FSH değeri PKOS'u doğrulasa da sensitivite ve spesifitesi yüksek değildir. Şiddetli PKOS olgularında bu değerlere rastlanmaktadır (87). Ancak yine de serum LH ve FSH ölçümü pratikte yaygın olarak kullanılmasına rağmen, yüksek LH/FSH oranı PKOS için tanı kriteri değildir PKOS'lu kadınların %40'ında bu oran tanıyı desteklememektedir. En önemlisi PKOS tanısı için diğer tanıların

dışlanmasıdır. Oligomenore/amenore olan herhangi bir kadında, düzensiz adetlerin diğer nedenleri araştırılmalıdır. Fizyolojik amenore sebebi olarak gebelik için hCG değerlendirilmesi yapılmalıdır. Tiroid disfonksiyonu ve hiperprolaktinemi gibi farklı sebepli ovulatuvar disfonksiyonlar da dışlanmalıdır. Bu sebeple serumda tiroid fonksiyon testi ve prolaktin düzeyi bakılmalıdır. PKOS'da serum prolaktin düzeyi yüksekliği görülmesinin olası olduğu bildirilmiştir. Kronik östrojen maruziyetine laktotrop stimülasyon yanıtından kaynaklandığı düşünülmektedir (88). Hafif prolaktinemi PKOS hastalarının %5-30'unda gözlenebilir. Buna rağmen hastaların sadece %3-7'sinde devamlılık gösteren değerler bulunur. Sürekli yüksek gözlenen değerlerde hipofiz tümörü gibi durumlar akla gelmelidir. Kranial manyetik rezonans görüntüleme yapılmalıdır. Tiroid salgısı bozukluğunda düzensiz menstrüel kanamalar görülür, ancak genellikle tanıyı düşündüren başka klinik özellikler de mevcuttur.

Hiperandrojenizme neden olan diğer hastalıkların ayırıcı tanısının yapılması amacıyla DHEAS, AS (androstenedion), 17-OHP (17-hidroksiprogesteron) ve T (total testosteron) düzeylerini değerlendirmek gerekmektedir (8). PKOS'da dolaşımda T, AS, DHEA (Dehidroepiandrosteron) ve DHEAS, 17-OHP ve östrojen düzeyleri yüksektir. T ve AS doğrudan overler tarafından salgılanırken, DHEAS'ın tamamına yakını sürrenallerden salgılanır (86). PKOS'lu olguların %50'sinde DHEAS düzeyi yüksektir (11). Testosteron ve DHEAS ölçümlerinin asıl sebebi sırasıyla over ve adrenal androjen üreten tümör ihtimalini dışlamaktır. Testosteron için 200 ng/dl ve DHEAS için 700-800 ng/dl'den yüksek değerler adrenal ya da over kaynaklı tümörü düşündürmektedir. Konsantrasyonlar tümör için olan bu eşik değerleri aşınca lezyonun lokalizasyonu ortaya çıkarmak için ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme gibi yöntemler kullanılır. Bazen yüksek androjen seviyeleri belirgin bir lezyonla beraber olmayabilir fakat daha çok bilateral, kistik olmayan ovaryan büyümeye eşlik eder. Semptomların başlaması ile birlikteyse bu görünüm hipertekozis tanısını düşündürür. 17-Hidroksiprogesteron değerine bakılarak ayırıcı tanıda Konjenital Adrenal Hiperplazi dışlanır. Sıklıkla kullanılan bir testtir. Hastada sabah açlık durumunda 200 ng/dl seviyesinde ise

Adrenokortikotropik Hormon stimölasyon testi yapılır. Stimölasyon sonrası 60. Dakikada 1000ng/dl üzerindeki değer tanıyı doğrular. Sınırdan çıkan 17-hidroksiprogesteron dölzeylerinde ikinci bir test yapılması önerilir (87).

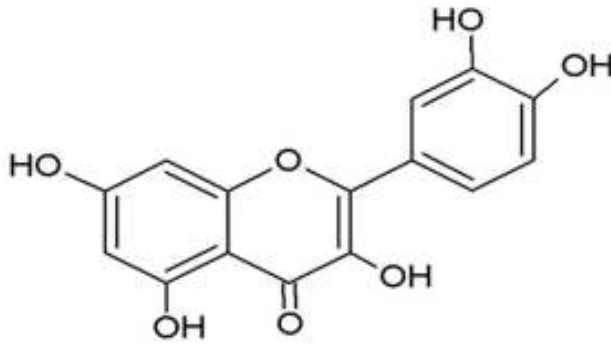
Bir diğer belirteç ise serum AMH (anti mölleriyan hormon) dölzeyi bakılmasıdır. AMH, 8mm'nin altındaki kölük antral foliköl ve preantral foliköllerden salınmaktadır. Serumdaki konsantrasyonu primordiyal foliköl havuzunun yoğunluğunu göstermektedir. Kadınlarda yaşı arttıkça serum AMH dölzeyi azalır ve menopozda saptanamaz hale gelir (89). PKOS'lu kadınlarla yapılan 10 adet çalışmanın dahil edildiği bir meta analizde, serum AMH konsantrasyonu>4.7ng/ml ise PKOS tanısı için %79 özlöllüğe ve %83 duyarlılığa sahiptir. Bunun akabinde yapılan başka bir çalışmada AMH konsantrasyona semptomlar dahil edildiğinde PKOS tanısı için özlöllük ve duyarlılık arttığı saptanmıştır (90, 91).

PKOS hastalarında artmış insölün direnci, glukoz intoleransı ve Tip 2 DM riskine yölelik olarak tanı aşamasında OGTT uygulanmalı ve glukoz homeostazı değerlendirilmelidir. Bozulmuş glukoz toleransı ve Tip 2 DM ilerleme hızı da artmış olduğundan normal glukoz toleransı durumunda OGTT her yıl tekrarlanmalıdır. Böllelikle yüksek riskli olarak değerlendirilen, bozulmuş açlık glukozu ve/veya bozulmuş glukoz toleransı olan bireylerde yaşam tarzı değişikliği ve metformin gibi erken tedavi seçenekleriyle Tip 2 DM' a progresyon önlenebilir.

2.2. Quercetin

Quercetin flavonoid grubu bir antioksidandır (92). Latince Quercetum (Meşe Ormanı) kelimesinden gelen ve ilk defa bu bitkinin reğinesinden elde edilen bir flavonoiddir. Quercetin, soğan başta olmak üzere kiraz, elma, ilek, ölüm, kızcık, greyfurt, yeşil çay, brokoli, lahana, domates gibi meyve ve sebzelerde; tohumlarda, fındık, çay ve kırmızı şarapta sarı renkli bir pigment maddesi olarak bulunur (93). Güölü bir antioksidan olan quercetin, antialerjik,

antiviral, antibakteriyel, antiprotozoal, antidiyabetik, serbest radikal süpürücü, antinflamatuar, antitrombotik, antiaterojenik, antiadipojenik, antikarsinojenik, sitoprotektif, vazoprotektif, kardiyoprotektif, nöroprotektif etkileri de olan bir maddedir (94). Ağızdan alınan quercetin yaklaşık %20'si, ince bağırsaklardan emilmektedir. Quercetin büyük oranda albumine bağlanır. Alındıktan sonra 30. dakikada ve 8 saat sonra bifazik olarak plazmada en yüksek seviyeye ulaştığı bilinmektedir (95). Tıbbi faydaları ortaya konulmuş olan quercetin, 1970'li yıllara kadar vitamin P adı ile bilinmekteydi. Quercetin, 2000'li yıllarda FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından güvenli madde olarak kabul edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Quercetin Molekülü

Quercetin'in antioksidan etkisi üzerine birçok in vivo, in vitro çalışma yapılmıştır ve quercetin ksantin oksidaz aktivitesini azaltarak organizmayı reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı koruyan, iskemi ve reperfüzyon sürecinde görev alan en güçlü flavonoidlerden birisi olarak görülmektedir. 2018 yılında Sameni ve ark. yaptığı deneysel bir çalışma aktinomisin D'ye maruz kalan ratların embriyolarında kuluçka oranı üzerine etkisini araştırmış ve quercetin'in blastomer sayısı, zona pellusida kalınlığı ve embriyo büyümesi üzerinde etkili olduğu, aktinomisin D'nin embriyoların büyümesi üzerindeki yıkıcı etkilerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Khorchani ve ark. 2020 yılında yaptığı başka bir çalışmada DHEA ile indüklenmiş sıçanlarda quercetin ile tedavinin, aromataz ekspresyonunu ve östradiol seviyesini azalttığı ayrıca insülin seviyelerini azaltarak IR'ni

iyileştirdiği böylece anovulasyon ve infertilite semptomlarını iyileştirebileceği düşünülmüştür (96, 97).

2.3. İrisin

İlk olarak Boström ve ark. tarafından 2012 yılında ortaya atılan irisin molekülü, egzersizle indüklenen, miyositlerden salınan, 112 aminoasitten oluşan glikoprotein yapıda bir miyokindir (98). Ratlarda beyaz adipöz dokunun kahverengi dokuya dönmesini sağladığı ve bunun yanında termogenezde ve enerji regülasyonunda görevli olduğu gösterilmiştir (99). İrisinin tedavi edici yanı merak uyandırıcı olup rekombinant teknoloji ile elde edilen irisinin ekzojen kullanımının termogenezi indüklediği, insülin direncini kırdığı gösterilmiştir. Bu da akıllara irisinin, enjektabl polipeptid formunun obez hasta grubunda alternatif olarak kullanılabileceğini getirmiştir. Koruyucu miyokinlerin kasların kasılması sonucu salgılandığı ve irisinin de bir miyokin olduğu düşünüldüğünde, düzenli yapılan egzersiz doğrultusunda irisin salınımı ile kronik hastalıklara karşı koruyucu olacağı düşünülmektedir (100). Artık biliyoruz ki düzenli egzersiz uzun dönemde, Tip 2 DM, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, demans ve depresyona karşı koruyucu etki göstermektedir. PKOS'un patofizyolojisinde insülin direnci ve hiperinsülinemi önemli role sahiptir. İrisin molekülünün enerji metabolizmasıyla ve insülin rezistansı ile yakından ilişkisi olduğu için PKOS patofizyolojisinde de yeri olabileceği öne sürülmüştür (101). Chenggang Li ve ark. 2019 yılında yaptığı bir çalışmada deneysel PKOS oluşturulmuş ve tedavide irisin verilen grupta yapılan histopatolojik değerlendirmede endometriyal reseptivitenin arttığı saptanmıştır (102). Ancak yapılan çalışmalarda sonuçlar çelişkilidir (103). Literatüre bakıldığında yapılan vaka kontrol çalışmalarının beşinde PKOS'lu hastalarda kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksek irisin seviyesi olduğu bulunmuşken bir tanesinde irisin seviyesinin PKOS grubunda daha düşük çıktığı saptanmıştır. Bu durum diyabetik olmayan PKOS'lu hasta grubunda,

DM Tip 2 gelişmeden önce irisin seviyesinin yüksek bulunmasının koruyucu bir mekanizma sonucu geliştiğini düşündürmektedir (104).

2.4. Büyüme Hormonu

Gün içerisinde değişkenlik gösteren frekanslarda ve amplitüdlere ön hipofizdeki somatotrop hücreler tarafından salgılan GH (Büyüme Hormonu) peptit yapıda bir hormondur. GH uyku başladıktan sonra maksimum seviyeye çıkar. Pulsatil salınımı stres, uyku düzeni, diyet ve egzersiz ile değişkenlik gösterir (105). GH karaciğer dışında ovaryan foliküllerde de IGF-1 üretimini uyarır. Büyüme hormonu IGF-1 aracılığıyla gonadotropinlerin teka ve granuloza hücrelerine olan etkisini artırır, DNA sentezi, steroidogenez, aromataz aktivitesi, LH reseptör sentezi ve inhibin sekresyonunu uyarmaktadır. (106).

Düşük ovaryan rezervi olan hastalarda ovulasyon indüksiyonunda GH kullanımı canlı doğum oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir iyileşme sağlamaktadır (107). Tesarik ve ark. yaptığı bir araştırmada >40 yaş hastaların IVF tedavisinde GH'nun kullanılmasının doğum oranlarını arttırdığını bildirmişlerdir (108). Kötü cevaplı olgularda tedaviye GH eklenmesinin canlı doğum oranlarını arttırdığını gösteren çalışmalar olmasına rağmen, literatürde GH ile ilgili çalışmalarda olgu sayısı sınırlı olup, doz ve süre çeşitlilikleri vardır.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 27/04/2021 tarih, 180 numaralı onayı ile yapıldı. Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2021-063 no'lu proje ile desteklendi.

3.1. Deney Tasarımı

Çalışmada deney hayvanı olarak 4 haftalık dişi Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, sıcaklık ve nem kontrolü olan sessiz bir ortamda 12 saat aydınlık (08:00-20:00), 12 saat karanlık siklusuna uyularak bakıldı. Çalışma boyunca su ve yiyecek alımında kısıtlama yapılmadı ve ortam sıcaklığı $24\pm1^{\circ}\text{C}$ idi. Bu çalışmada sıçanlar rastgele 6 gruba ayrıldı. PKOS modeli oluşturmak için kontrol grubu hariç tüm sıçanlara 21 gün boyunca 1mg/kg letrozol, 2 ml/kg CMC (karboksimetil sellüloz) içinde çözülerek oral olarak verildi. Yapılacak tüm uygulamalar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

Grup I (n=6): Kontrol grubu

Grup II (n=10): PKOS grubu

Grup III (n=6): PKOS + Etanol grubu (0,5ml %10 etanol)

Grup IV (n=7): PKOS + Quercetin grubu (0,5ml %10 etanol içinde çözünmüş 15mg/kg quercetin)

Grup V (n=7): PKOS + İrisin (100 ng/g.d rekombinant irisin)

Grup VI (n=7): PKOS + Growth hormon grubu (0,3mg/kg/gün Growth hormon)

Gruplardaki deneklerin tümünün yedi haftalık süre boyunca her hafta ağırlıkları tartıldı. Sakrifiye edilmeden önce 6 saat aç bırakıldıktan sonra kan şekerleri ölçüldü ve daha sonra denekler sakrifiye edilip kalp kanı ELİSA

(biyokimyasal analiz) için alındı. Daha sonra uterus ve overleri histolojik inceleme için alındı.

Grup I: Bu gruptaki deneklere herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup II: Bu gruptaki deneklerin üçü PKOS modelinin oluşup oluşmadığının kontrol edilmesi için 21. günde sakrifiye edildi ve yumurtalıklar çıkarılarak rutin parafin takibe alındı.

Grup III: Bu gruptaki deneklere PKOS modeli oluşturulduktan sonra 30 gün boyunca orogastrik kanül ile 0,5ml %10 etanol uygulaması yapıldı.

Grup IV: Bu gruptaki deneklere 30 gün boyunca orogastrik kanül ile 0,5ml %10 etanol içerisinde çözünmüş 15mg/kg quercetin uygulaması yapıldı.

Grup V: Bu gruptaki deneklere 100 ng/g.d rekombinant İrisin 30 gün boyunca intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Grup VI: Bu gruptaki deneklere 0,3 mg/kg/gün GH 30 gün boyunca subkutan olarak uygulandı.

3.1.1. Östrus Siklusunun İncelenmesi

Östrus siklusunun değerlendirilmesi için 5 hafta sonra 14 gün boyunca vajinal smear alınarak baskın olan hücre tipi incelendi. Kontrol grubu sıçanlardan elde edilecek vajinal smearlardan proöstrus, östrus, metöstrus ya da diöstrus evreleri belirlendi. Vajinal epitel hücreleri elde etmek için kulak çubuğu ıslatılarak vajinal kanal açıklığına yerleştirilerek örnek alınıp lam üzerine yayıldı. Yayma preparatı hazırlandıktan sonra %70'lik etanolde 1-2 dakika fikse edilip, H&E (hematoksilen-eozin) boyaması yapıldı ve boyanan vajinal smear örneği ışık mikroskobu ile incelendi.

3.1.2. Glukoz Tolerans Testi

Sıçanlar sadece su içebilecekleri şekilde 6 saat aç bırakıldı ve siklik evrelerden bağımsız olarak glukoz tolerans testi uygulandı. Tek doz intraperitoneal olarak glukoz (serum fizyolojik içinde 2 g/kg doz olacak şekilde) enjeksiyonu yapılmadan önce (0. dakikada) glukometre ile bazal kan şekerleri ölçüldü. Tek doz intraperitoneal olarak glukoz (serum fizyolojik içinde 2g/kg doz olacak şekilde) enjeksiyonu yapıldıktan sonra 15., 30. ve 60. dakikalarda kan şekerleri ölçüldü.

3.1.3. Biyokimyasal Analiz

ELISA için kan, tüm gruplara ait sıçanlardan kardiyak ponksiyon ile (cardiac puncture) elde edildi. Alınan kan örnekleri, 3000 x rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılıp, ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra, numaralandırılıp -80°C'de analizler için saklandı. Her serum için FSH, LH, testosteron testleri üreticinin protokolüne göre uygulandı. FSH, LH ve Testosteron analizi için sıçan FSH, LH ve Testosteron kiti (E-EL-R0391, Elabscience, USA) kullanıldı. Buna göre; 96 kuyucuklu mikrolakanın 1 kuyucuğu kör olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı. Daha sonra 7 kuyucuğa 100µl, kitin kullanma kılavuzunda belirtilen konsantrasyonlarına uygun standart solüsyonlar eklendi. Kalan kuyucuklar serum örnekleri için kullanıldı. Her kuyucuğa (kör ve standartlar hariç) tüm deney gruplarındaki her bir deneğe ait 100µl serum eklenerek üzeri sealer ile kapatıldı ve 37°C'de, FSH ve LH için 90 dakika, Testosteron için 45 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar 350µl yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Sonrasında her kuyucuğa 100µl Avidin-HRP konjugatı eklenerek 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar 300µl yıkama tamponu ile beş kez yıkandı. Substrat solüsyondan 90µl eklenerek karanlıkta 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklenerek mikrolaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

3.1.4. Parafin Takip İşlemi

Rutin parafin takip işlemi için alınan uterus ve yumurtalıklar fiksasyon için %10'luk formalin solüsyonunda 24-48 saat tutuldu. 48 saatlik süre sonunda bir gece akarsu altında bırakıldı. Ertesi gün sırası ile %60, %70, %80, %100'lük alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilene alındı ve parafine gömme işlemi gerçekleştirildi. Parafine gömülen dokulardan H&E boyaması ve indirekt immunohistokimya işlemleri için 5µm'lik kesitler alındı.

Tablo 5. Parafin Doku Takip Protokolü

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

3.1.5. Histokimyasal Analizler

Histokimyasal analizler için alınan kesitler bir gece oda ısısında kurutulduktan sonra ilk kesitler morfolojik değerlendirme için çekirdek boyası olan Hematoksilen ve sitoplazma boyası olan Eozin ile boyandı. Oda ısısında kurutulan kesitler gece boyunca 60°C'lik etüvde, ertesi gün ksilen içerisinde 1 saat bekletilerek deparafinizasyon işleminin ardından sırası ile %100, %80, %70, %60'lık alkol serilerinden geçirildi. 5 dakika akar su altında dokulara tekrar su kazandırıldıktan sonra su bazlı çekirdek boyası olan Harris Hematoksileninde 5 dakika tutuldu. Daha sonra tekrar 5 dakika akar su altında hematoksilen fazlasının uzaklaşması için yıkandı. Hematoksilen boyasının çekirdekte sabit kalması için kesitler asit-alkol karışımına batırılıp çıkarıldı ve tekrar 5 dakika yıkama işlemine tabi tutuldu. Dokular sitoplazmalarının pembe renkte boyanması için eozin boyasında 2 dakika tutuldu. Eozin fazlasının dokulardan uzaklaştırılması için kesitler akar su altında 5 dakika yıkandı. Kesitler daha sonra %80 ve %100 alkol serilerinde 1'er dakika tutuldu ve daha sonra dokuların ışık mikroskop altında görüntülenmelerinin sağlanması amacı ile 2 kez 30'ar dakika ksilende tutuldu.

Tablo 6. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

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

	%95 ETİL ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA	
	KSİLEN	1 SAAT
KAPATMA	ENTELLAN	

3.1.6. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal analiz için kesitler gece boyunca 60°C'lik etüvde ertesi gün ksilen içerisinde 1 saat bekletilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı. Deparafinizasyon işleminden sonra sırası ile %100, %80, %70, %60'lık alkol serilerinden geçirildi. 2 kez 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla 10 dakika %3'lük hidrojen peroksidaz solüsyonunda bekletildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitlere antijen retrieval solüsyonu uygulandıktan sonra endometrial reseptivite için $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin, LIF (Leukaemia inhibitory factor), Muc-1, EGF (Epidermal Growth Faktör), oosit maturasyonu için GDF 9 (Büyüme farklılaşma faktörü-9) ve BMP 15 (kemik morfogenetik proteini 15) primer antikorlarının dağılımına bakıldı. İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda incelenerek immunreaktivite negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak belirlendi ve değerlendirme HSCORE analizi ile yapıldı.

Tablo 7.İmmunhistokimyasal Analiz Protokolü

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

3.1.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için GraphPad Prism 9 kullanıldı. Çalışmadan elde edilen verilerin analizinde Two-way ANOVA testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



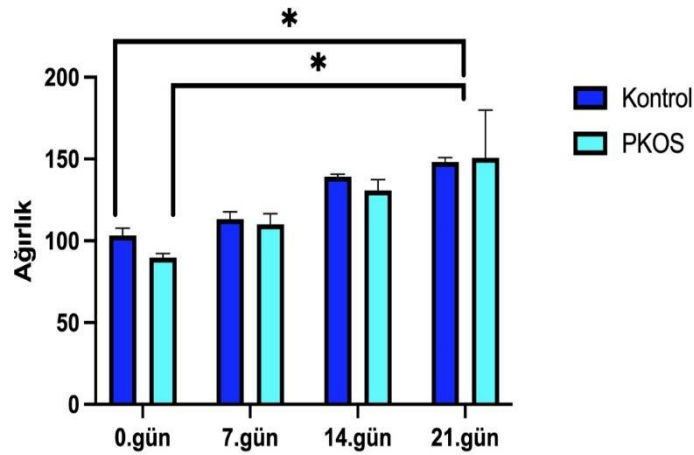
IV. BULGULAR

4.1. Östrus Siklusunun İncelenmesi

Deneklerden deneyin son 14 günü hazırlanan vajinal smearlar incelendi. Vajinal smear örneklerinin mikroskopik değerlendirme sonucuna göre incelendiğinde östrus siklusunun düzensiz olduğu gözlemlendi. Kontrol grubundaki deneklerde östrus siklusunun normal olduğu gözlemlendi. PKOS, PKOS+Etanol, PKOS+Quercetin, PKOS+İrisin ve PKOS+GH gruplarındaki deneklerin vajinal smear örnekleri mikroskopik değerlendirme sonucuna göre östrus sikluslarını tamamlamamadıkları gözlemlendi.

4.2. Vücut ağırlıklarının Ölçülmesi

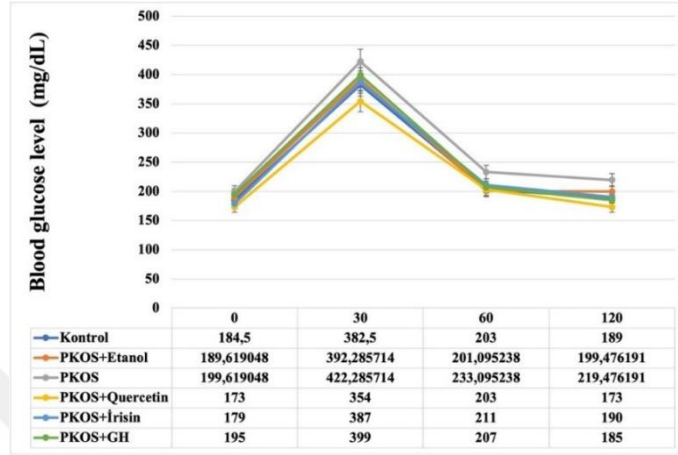
Tüm gruplardaki deneklerin ağırlıkları haftada bir kez deney sonlanana kadar tartılmıştır. Kontrol ve PKOS grubunun ağırlıkları deneyin ilk günü ve letrozol uygulamasının son günü karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı ($p < 0,0481$) (Şekil 4).



Şekil 4. Letrozol uygulaması sonunda Kontrol, PKOS ve Sham gruplarına ait vücut ağırlığının karşılaştırılması

4.3. Glukoz Tolerans Testinin Değerlendirmesi

Tüm gruplara uygulanan glukoz tolerans testi sonucunda glukoz toleransının bozulmadığı gözlemlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Tüm gruplara ait glukoz tolerans testi grafiği

4.4. Biyokimyasal Bulgular

İntrakardiyak olarak alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar, FSH, LH ve Testosteron seviyelerinin tespiti için ELISA yöntemi ile incelendi. FSH için sonuçlar analiz edildiğinde, tüm gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). LH ve Testosteron için sonuçlar analiz edildiğinde; kontrol grubu ve PKOS grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunurken ($p<0,01$) PKOS grubu ve tedavi grupları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p<0,01$). LH ve Testosteron açısından, Kontrol grubu ve tedavi grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Tüm deney gruplarına ait FSH, LH ve Testosteron için ELISA analizi sonuçları (ortalama $\pm$ std sapma)

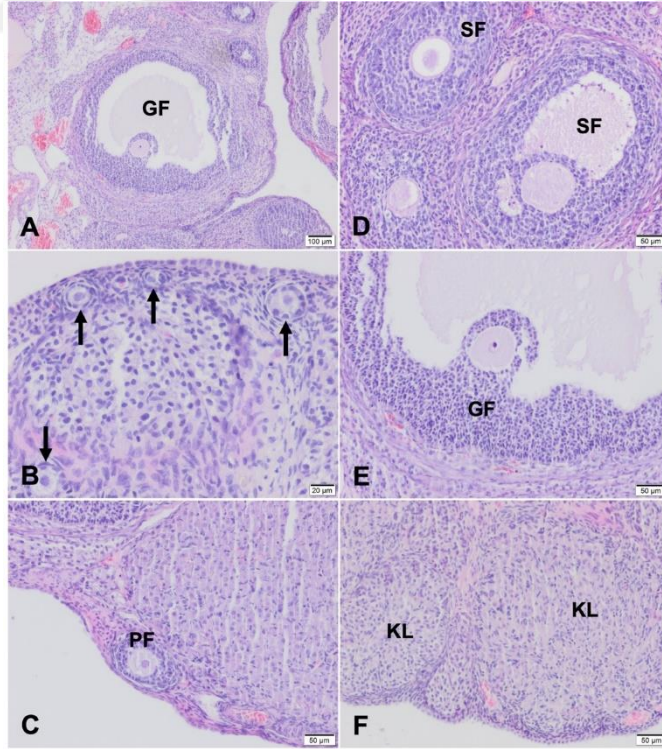
ORT $\pm$ SS	Kontrol	PKOS	PKOS+ Etanol	PKOS+ Quercetin	PKOS+ Irisin	PKOS+ GH
--------------	---------	------	--------------	-----------------	--------------	----------

FSH (ng/mL)	99,61±3,58	96,18±7,13	97,15±6,84	96,95±6,36	95,57±7,84	92,32±6,23
LH (mIU/mL)	39,16±1,52	52,26±2,53***	44,09±2,85**	43,14±2,57**	41,95±2,44**	44,49±1,34*
Testosteron (ng/mL)	5,15±0,86	10,28±0,71****	6,58±1,15***	6,80±0,64**	6,31±0,61***	6,78±0,32**

*p<0,05, **p<0,008, ***p<0,0007, ****p<0,0001,

4.5. Histolojik Bulgular

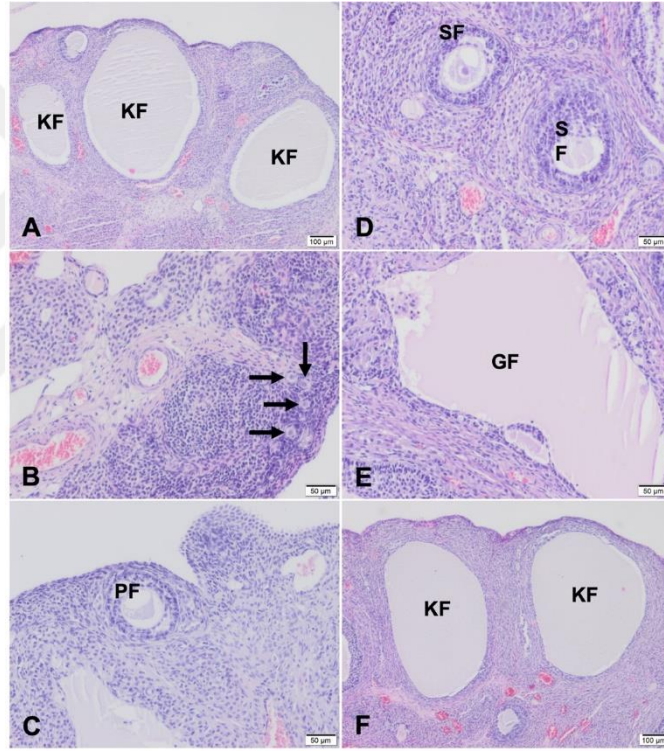
Tüm gruplara ait sıçanlardan alınan ovaryumların histolojik değerlendirilmesi H&E boyaması ile yapıldı. Kontrol grubundaki ovaryumlar histolojik olarak incelendiğinde, korteks ve medulla histolojik açıdan sağlıklı bir ovaryum yapısındaydı. Kortekste gelişmekte olan foliküller ve korpus luteum gözlenirken, medulla da kan damarları ve gevşek bağ dokusu gözlemlendi (Şekil 6).



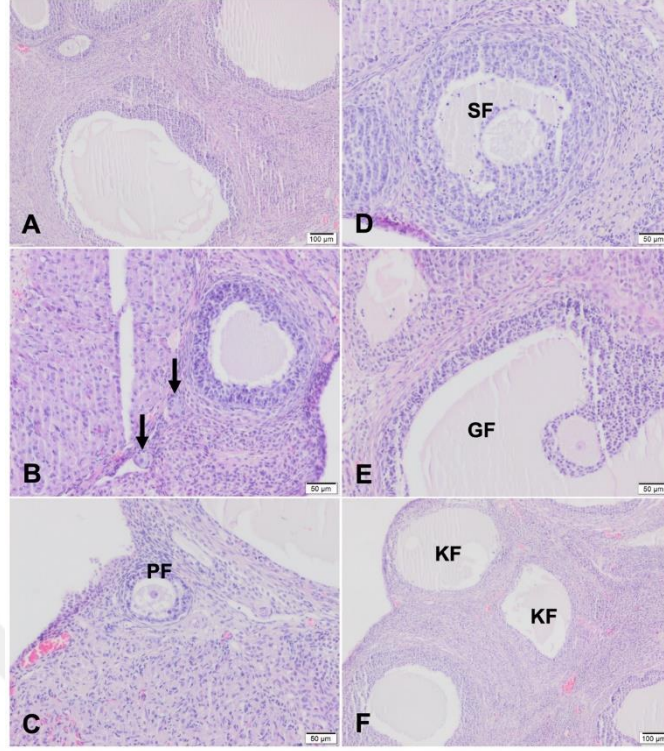
Şekil 6. Kontrol grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri: (A) Genel görünüm, (B) primordiyal folikül, (C) primer

folikül, (D) sekonder folikül, (E) graff folikülü, (F) korpus albicans. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü, KL: Korpus Luteum. Ölçek: A:100µm; B, D-F: 50 µm C:20µm.

PKOS ve PKOS+Etanol grubundaki ovaryum örneklerinin korteksinde gelişmekte olan ovaryan foliküller ve kistik foliküllerin olduğu bunun yanı sıra granüloza hücre tabakasının kistik foliküllerde ince olduğu izlendi. Ovaryumlarda az sayıda korpus luteum görülmesi ya da hiç görülmemesi bu gruptaki sıçanlarda anovulasyon ya da oligoovulasyon olduğunun göstergesi olarak kabul edildi (Şekil 7, 8).

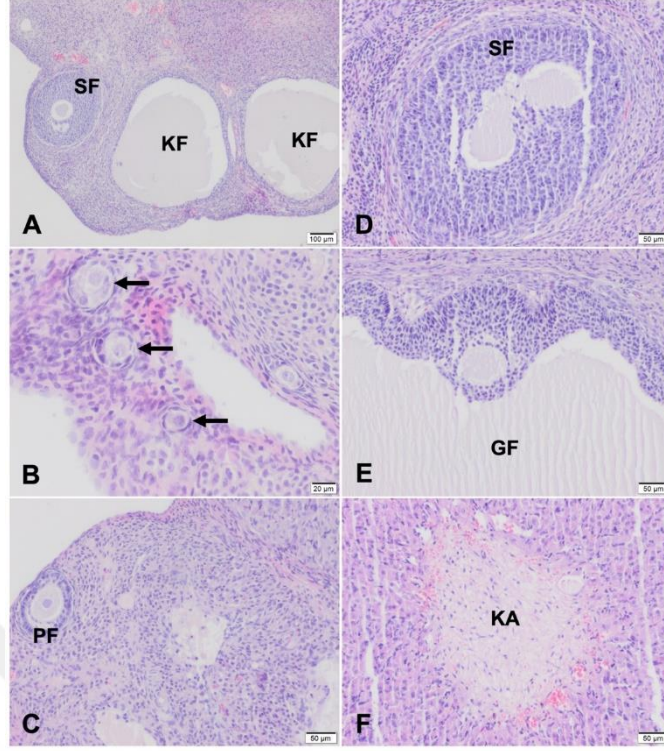


Şekil 7. PKOS grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri: (A) Genel görünüm, (B) primordiyal folikül, (C) primer folikül, (D) sekonder folikül, (E) graff folikülü, (F) korpus albicans. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü, KF: Kistik Folikül. Ölçek: (A, F):100µm; (B-E):50µm.

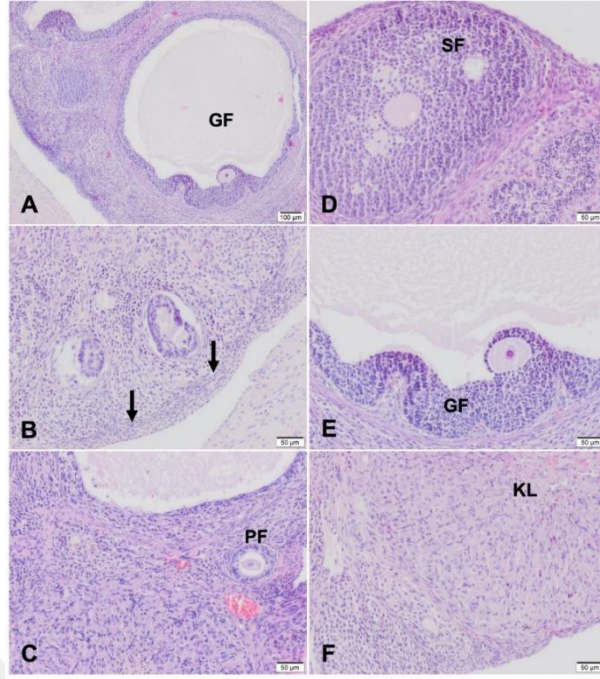


Şekil 8. PKOS+Etanol grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri. (A) Genel görünüm, (B) primordiyal folikül, (C) primer folikül, (D) sekonder folikül, (E) graff folikülü, (F) korpus albikans. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü, KF: Kistik Folikül. Ölçek: A, F:100µm; B-E:50µm.

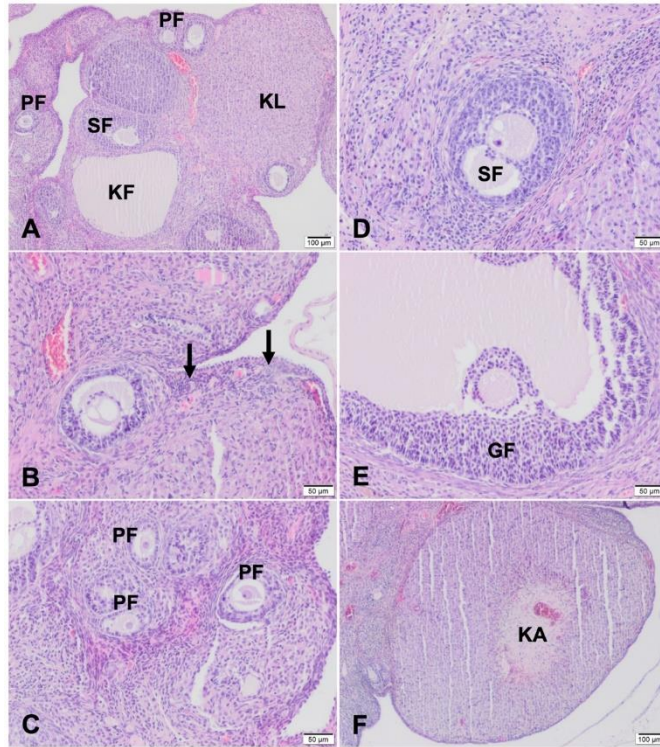
PKOS+Quercetin, PKOS+İrisin ve PKOS+GH grubundaki ovaryum örneklerinin korteksinde gelişmekte olan foliküller ve graff folikül varlığı gözlemlendi. Korteksteki foliküllerin kistik olmasına rağmen, sağlıklı olduğu belirlendi. Korpus luteum ve korpus albicans varlığı görüldü. Medula'da kan damarlarının ve az miktarda bağ dokusunun sağlıklı olduğu tespit edildi (Şekil 9,10,11).



Şekil 9. PKOS+Quercetin grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri: (A) Genel görünüm, (B) primordiyal folikül, (C) primer folikül, (D) sekonder folikül, (E) graff folikülü, (F) korpus albikans. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü, KF: Kistik Folikül, KA: Korpus Albikans. Ölçek: (A):100µm; (B, D-F):50µm; (C): 20µm.



Şekil 10. PKOS+İrisin grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri (A) Genel görünüm, (B) primordiyal folikül, (C) primer folikül, (D) sekonder folikül, (E) graff folikülü, (F) korpus albicans. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü, KF: Kistik Folikül, KL: Korpus Luteum. Ölçek: (A):100µm; (B-F):50µm.

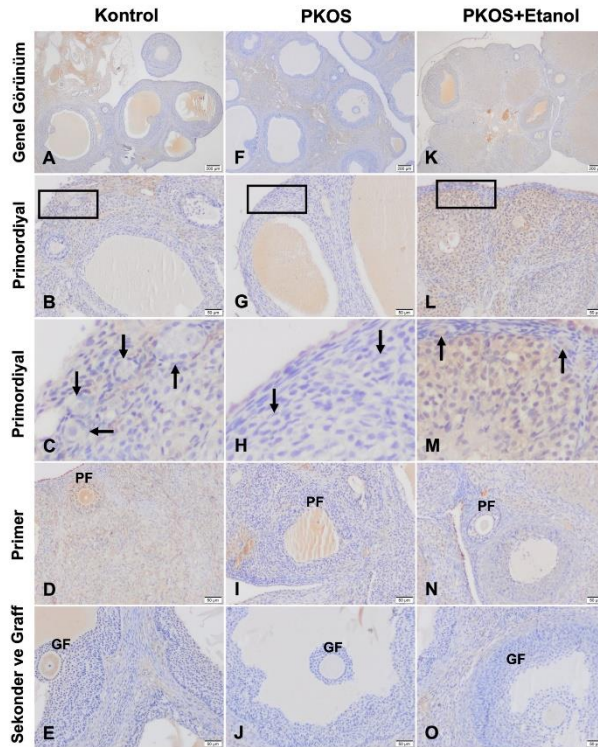


Şekil 11. PKOS+GH grubuna ait ovaryumdan kesitlere ait Hematoksilen-Eozin boyanma görüntüleri: (A) Genel görünüm, (B) primordiyal folikül, (C) primer folikül, (D) sekonder folikül, (E) graff folikülü, (F) korpus albicans. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü, KF: Kistik Folikül, KL: Korpus Luteum, KA: Korpus Albicans. Ölçek: (A, F):100µm; (B-E):50µm.

4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular

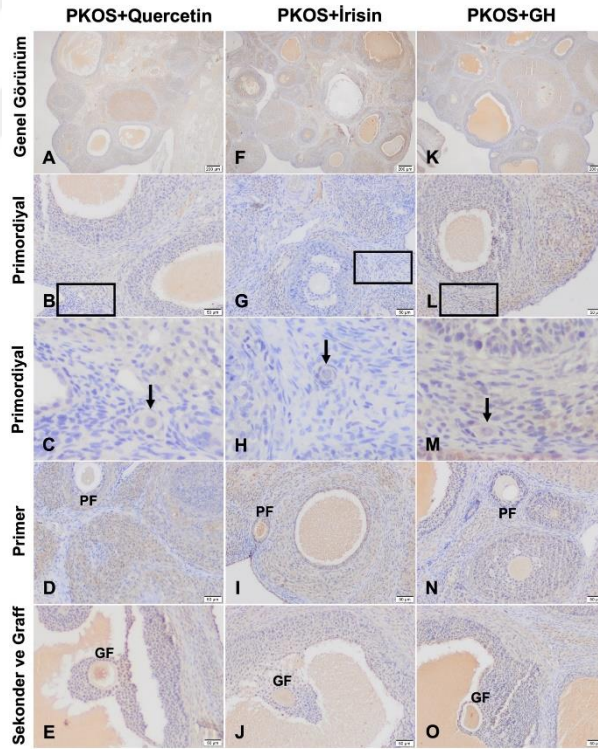
4.6.1. Ovaryumda GDF 9 Değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait GDF 9 immunreaktivitesi incelendiğinde tüm foliküllerde pozitif olduğu gözlemlendi. PKOS ve PKOS+Etanol grubuna ait GDF 9 immunreaktivitesi incelendiğinde tüm foliküllerde pozitiflik gözlenmedi. Primordiyal ve sekonder foliküllerdeki oositlerin sitoplazma ve nükleuslarında immunreaktivite tespit edilemedi. Primer foliküllerdeki oositlerin sitoplazmasında zayıf (+) immunreaktivite gözlemlendi. Kistik foliküllerde immunreaktivite gözlenmedi (Şekil 12, A-O).



Şekil 12. Foliküllerde GDF9'un ekspresyonu: (A) Kontrol grubu, (F) PKOS grubu (K) PKOS+Etanol grubu. (B, G, L), Primordiyal foliküller. (C, H, M), Düşük büyütme resimleri de belirtilen alanların daha büyük büyütmedeki görüntüleri. (D, I, N), Primer foliküller. (E, J, O) Sekonder ve Tersiyer foliküller. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü. Ölçek: 50µm.

PKOS+Quercetin, PKOS+İrisin ve PKOS+GH grubuna ait GDF 9 immunreaktivitesi incelendiğinde tüm foliküllerde pozitif olduğu gözlemlendi. PKOS+Quercetin grubuna ait foliküllerin immunreaktiviteleri değerlendirildiğinde primordiyal ve primer foliküllerdeki oositlerin sitoplazmasında zayıf (+) immunreaktivite gözlemlendi. Sekonder ve graff foliküllerdeki oositlerin sitoplazmalarında orta şiddette (++) immunreaktivite gözlemlendi (Şekil 13, A-O).

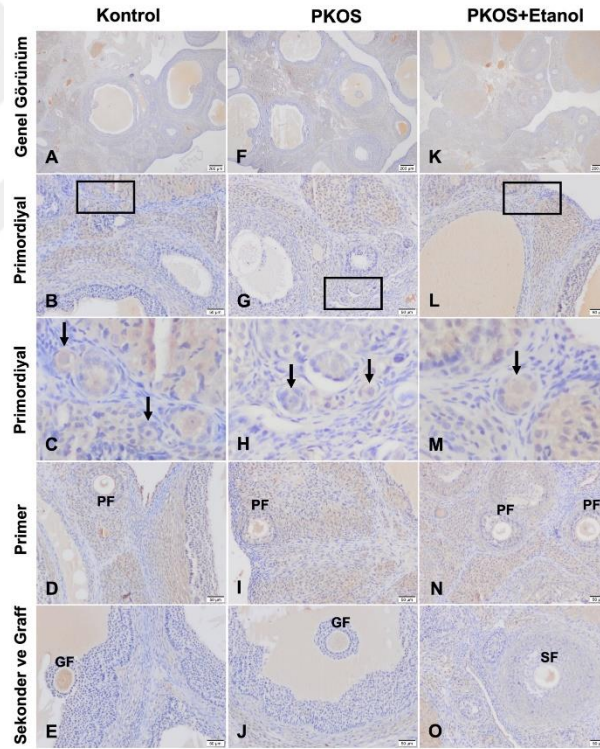


Şekil 13. Foliküllerde GDF9'un ekspresyonu: (A) PKOS+Quercetin grubu, (F) PKOS+İrisin grubu, (K) PKOS+GH grubu. (B, G, L), Primordiyal foliküller. (C, H, M), Düşük büyütme resimleri de belirtilen alanların daha büyük büyütmedeki görüntüleri. (D, I, N), Primer foliküller. (E, J, O) Sekonder ve

Tersiyer foliküller. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü. Ölçek: 50 µm.

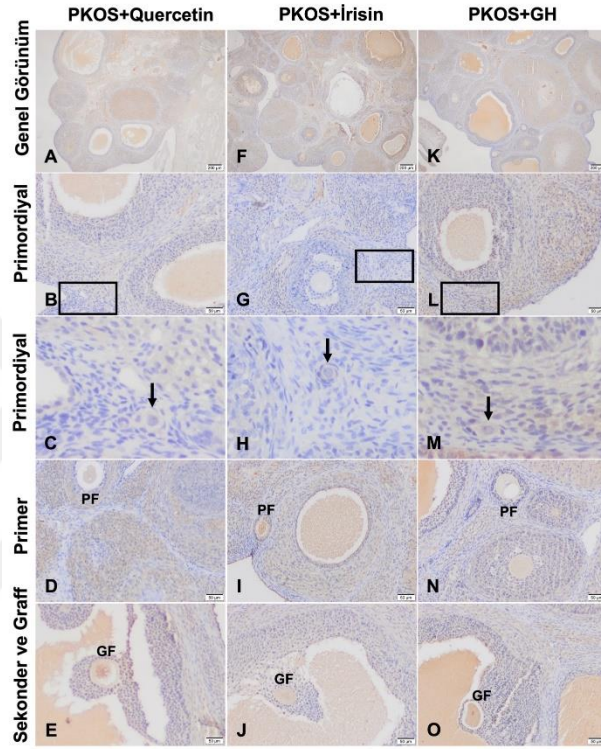
4.6.2. Ovaryumda BMP 15 Değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait BMP 15 immunreaktivitesi incelendiğinde tüm foliküllerde pozitif olduğu gözlemlendi. PKOS, PKOS+Etanol grubuna ait BMP 15 immunreaktivitesi incelendiğinde primordiyal, sekonder ve graff foliküllerde zayıf (+), primer foliküllerde orta şiddette (++) immunreaktivite tespit edildi. Kistik foliküllerde immunreaktivite gözlenmedi (Şekil 14, A-O).



Şekil 14. Foliküllerde BMP15'in ekspresyonu: (A) Kontrol grubu, (F) PKOS grubu (K) PKOS+Etanol grubu. (B, G, L), Primordiyal foliküller. (C, H, M), Düşük büyütme resimlerinde belirtilen alanların daha büyük büyütmedeki görüntüleri. (D, I, N), Primer foliküller. (E, J, O) Sekonder ve Tersiyer foliküller. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü. Ölçek: 50µm.

PKOS+Quercetin, PKOS+İrisin ve PKOS+GH grubuna ait BMP15 immunreaktivitesi incelendiğinde tüm foliküllerde pozitif olduğu gözlemlendi. (Şekil 15 A-O).

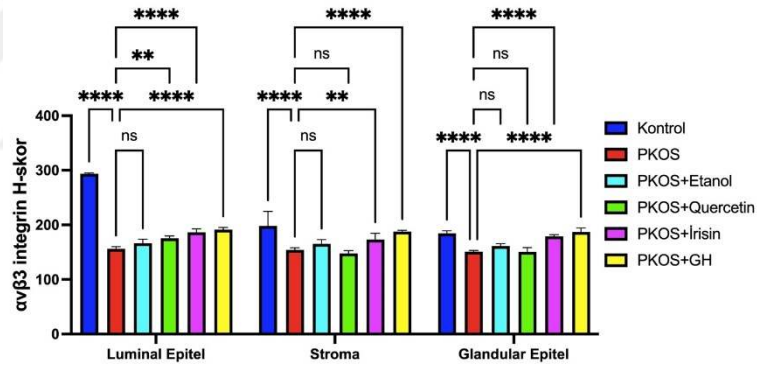


Şekil 15. Foliküllerde BMP15'in ekspresyonu: (A) PKOS+Quercetin grubu, (F) PKOS+İrisin grubu, (K) PKOS+GH grubu. (B, G, L), Primordiyal foliküller. (C, H, M), Düşük büyütme resimlerinde belirtilen alanların daha büyük büyütmedeki görüntüleri. (D, I, N), Primer foliküller. (E, J, O) Sekonder ve Tersiyer foliküller. Ok başı: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graff folikülü. Ölçek: 50µm.

4.6.3. Uterusta $\alpha\beta 3$ integrin Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitelde $\alpha\beta 3$ integrin immün pozitif hücreler, semi kantitatif H-Skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Luminal epitel, stroma ve glandular epitelde, kontrol grubu ile PKOS ve PKOS+Etanol grupları arasındaki $\alpha\beta 3$ integrin immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS ve PKOS+Etanol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0,0001$). PKOS ve PKOS+Etanol grubu arasındaki $\alpha\beta 3$ integrin immunreaktivitesi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Luminal epitelde PKOS grubu ile tedavi grupları arasındaki $\alpha\beta 3$ integrin immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, tedavi gruplarında PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (anlamlılık farkları sırasıyla PKOS+Quercetin ($p < 0,006$), PKOS+İrisin ($p < 0,0001$), PKOS+GH ($p < 0,0001$) olarak belirlendi. Stromada ve glandular epitelde, PKOS grubu ile tedavi grupları arasındaki $\alpha\beta 3$ integrin immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS+Quercetin grubu hariç ($p > 0,05$), diğer tedavi gruplarında PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (Şekil 16, 17 ve 18, Tablo 9).

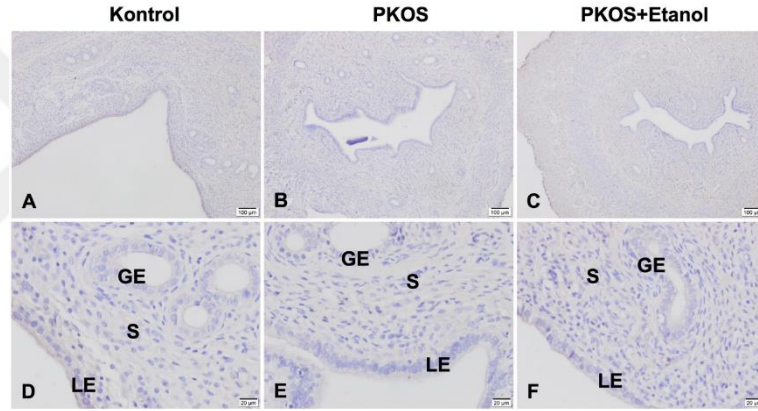


Şekil 16. Tüm gruplara ait uterus dokularında $\alpha\beta 3$ integrin immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik

(** $p < 0,006$; **** $p < 0,0001$; ns, $p > 0,05$).

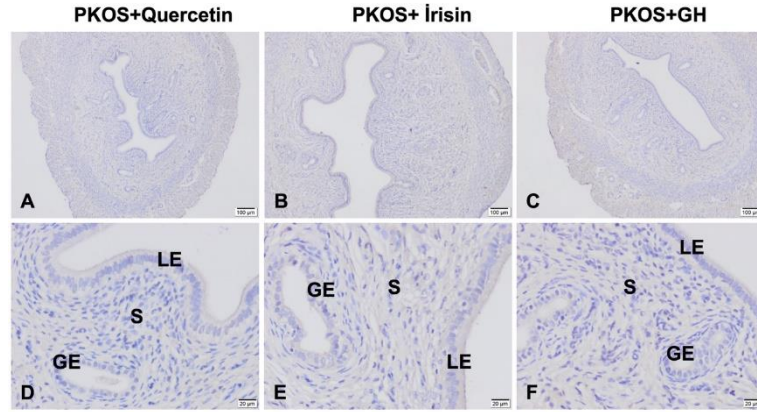
Tablo 9. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait $\alpha\beta 3$ integrin H-Skor değerleri

$\alpha\beta 3$ integrin	Kontrol	PKOS	PKOS+Etanol	PKOS+Quercetin	PKOS+İrisin	PKOS+GH
Luminal Epitel	293,8 $\pm$ 1,30	156 $\pm$ 4,18	166 $\pm$ 7,41	175,4 $\pm$ 4,33	186,2 $\pm$ 6,41	191,2 $\pm$ 4,08
Stroma	198 $\pm$ 26,59	154 $\pm$ 4,18	165 $\pm$ 7,90	147,8 $\pm$ 5,11	173 $\pm$ 11,51	187,8 $\pm$ 2,28
Glandular Epitel	184,6 $\pm$ 4,56	151 $\pm$ 2,23	161 $\pm$ 4,18	150,6 $\pm$ 7,63	179 $\pm$ 2,91	187,2 $\pm$ 7,04



Şekil 17.Uterusta $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonu

(A, D) Kontrol grubu, (B, E) PKOS grubu (C, F) PKOS+Etanol grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100 μ m; D, E, F: 20 μ m.



Şekil 18.Uterusta $\alpha v\beta 3$ integrin ekspresyonu

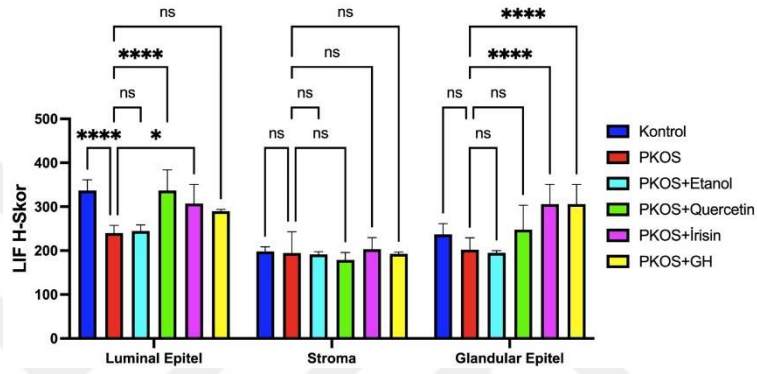
(A, D) PKOS+Quercetin grubu, (B, E) PKOS+İrisin grubu, (C, F) PKOS+GH grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100 μ m; D, E, F: 20 μ m.

4.6.4. Uterusta LIF Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitelde LIF immün pozitif hücreler, semikantitatif H-Skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Luminal epitelde, kontrol grubu ile PKOS ve PKOS+Etanol grupları arasındaki LIF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS ve PKOS+Etanol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken ($p<0,001$), glandular epitel ve stromada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Bu üç paternde de PKOS ve PKOS+Etanol grubu arasındaki LIF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Luminal epitelde PKOS grubu ile tedavi grupları arasındaki LIF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS+GH grubu hariç, tedavi gruplarında PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (anlamlılık farkları sırasıyla PKOS+Quercetin ($p<0,001$), PKOS+İrisin ($p<0,01$), PKOS+GH ($p>0,05$) olarak belirlendi). Stromada, PKOS grubu ile tedavi grupları arasındaki LIF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu (anlamlılık farkları sırasıyla PKOS+Quercetin ($p>0,05$), PKOS+İrisin

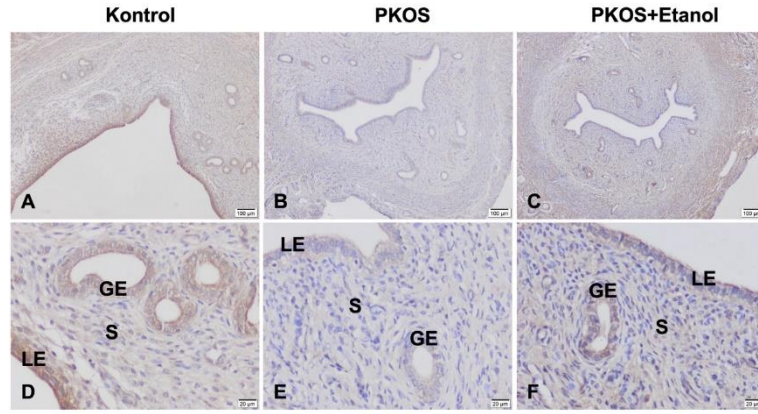
($p>0,05$), PKOS+GH ($p>0,05$) olarak belirlendi). Glandular epitelde, PKOS grubu ile tedavi grupları arasındaki LIF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS+Quercetin grubu hariç ($p>0,05$), diğer tedavi gruplarında PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (anlamlılık farkları sırasıyla PKOS+Quercetin ($p>0,05$), PKOS+İrisin ($p<0,0001$), PKOS+GH ($p<0,0001$) olarak belirlendi.) (Şekil 19, 20 ve 21, Tablo 10).



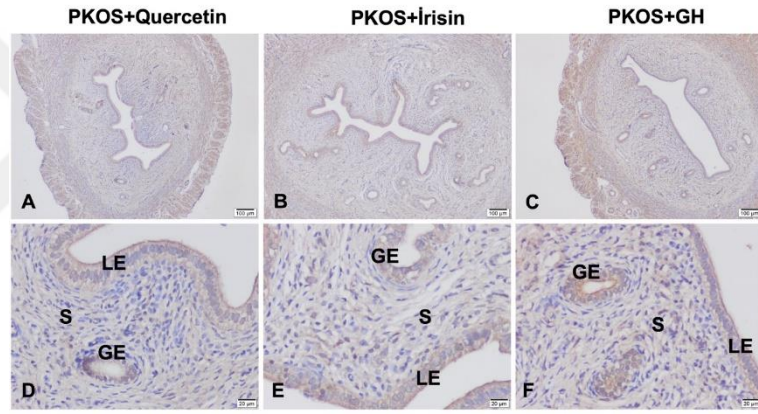
Şekil 19. Tüm gruplara ait uterus dokularında LIF immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik

Tablo 10. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait LIF H-Skor değerleri

LIF	Kontrol	PKOS	PKOS+Etanol	PKOS+ Quercetin	PKOS+İrisin	PKOS+GH
Luminal Epitel	337±24,39	239,6±17,55	245±13,69	337±46,71	307,4±43,43	289,8±3,96
Stroma	198,2±10,23	194,6±48,30	191,8±5,80	179±16,73	203,4±26,15	192,6±4,39
Glandular Epitel	237±24,39	202±27,06	195,2±5,06	248±55,29	306±44,771	284,4±4,33



Şekil 20. Uterusta LIF ekspresyonu: (A, D) Kontrol grubu, (B, E) PKOS grubu (C, F) PKOS+Etanol grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100µm; D, E, F: 20µm.



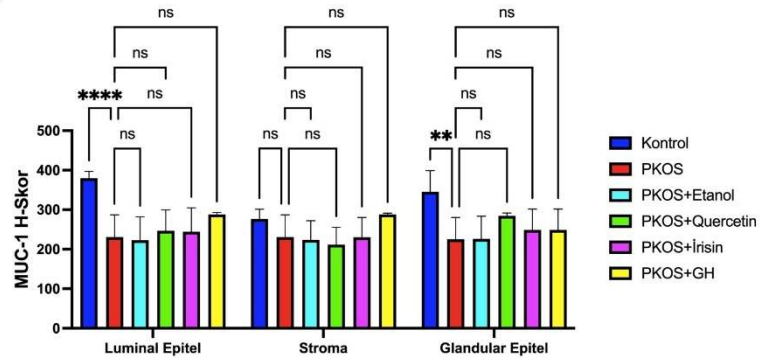
Şekil 21. Uterusta LIF ekspresyonu: (A, D) PKOS+Quercetin grubu, (B, E) PKOS+İrisin grubu, (C, F) PKOS+GH grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100 µm; D, E, F: 20 µm.

4.6.5. Uterusta MUC-1 Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitelde MUC-1 immün pozitif hücreler, semikantitatif H-Skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Luminal ve Glandular epitelde, kontrol grubu ile PKOS ve PKOS+Etanol grupları arasındaki MUC-1 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS ve PKOS+Etanol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi.

($p < 0,001$ ve $p \leq 0,01$). PKOS ve PKOS+Etanol grubu arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Luminal epitel ve stromada PKOS grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında tedavi gruplarında PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (anlamlılık farkları sırasıyla PKOS+Quercetin ($p > 0,05$), PKOS+İrisin ($p > 0,05$), PKOS+GH ($p > 0,05$) olarak belirlendi.) Stromada, kontrol grubu ile PKOS ve PKOS+Etanol grupları arasındaki MUC-1 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS ve PKOS+Etanol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$). PKOS ve PKOS+Etanol grubu arasındaki MUC-1 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Glandüler epitelde PKOS grubu ile tedavi grupları arasındaki MUC-1 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (anlamlılık farkları $p > 0,05$) (Şekil 22, 23 ve 24, Tablo 11).

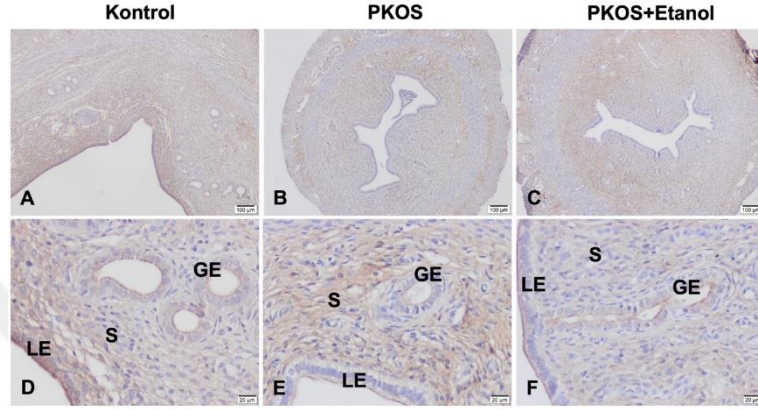


Şekil 22. Tüm gruplara ait uterus dokularında MUC-1 immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik ($p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns, $p > 0,05$).**

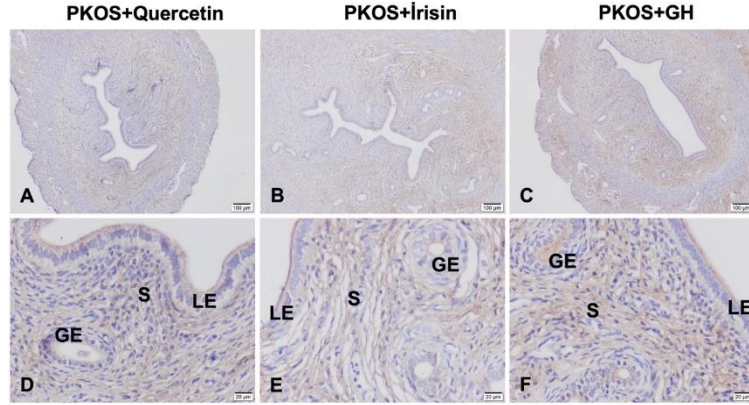
Tablo 11. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait MUC-1 H-Skor değerleri

MUC-1	Kontrol	PKOS	PKOS+Etanol	PKOS+Quercetin	PKOS+İrisin	PKOS+GH
Luminal Epitel	379,8±17,12	231±56,28	383,2±4,43	246,8±52,77	244,4±60,16	287,8±5,16

Stroma	276,6±24,65	231±56,20	291,4±3,57	211,8±43,99	230,6±49,74	288±3,39
Glandular Epitel	345,6±53,18	225,2±55,16	386,4±4,77	284,2±7,59	249,2±52,28	288,8±5,01



Şekil 23. Uterusta MUC-1 ekspresyonu: (A, D) Kontrol grubu, (B, E) PKOS grubu (C, F) PKOS+Etanol grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100µm; D, E, F: 20µm.



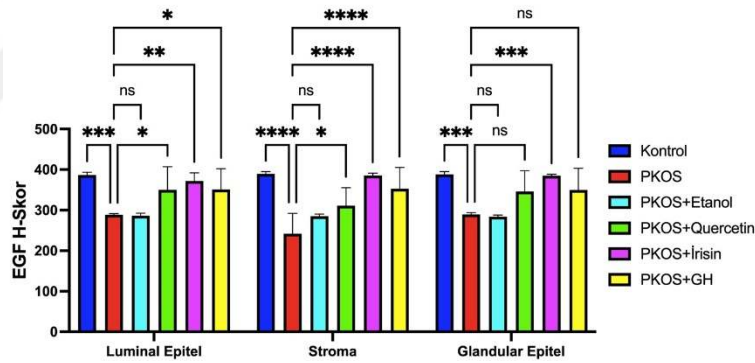
Şekil 24. Uterusta MUC-1 ekspresyonu

(A, D) PKOS+Quercetin grubu, (B, E) PKOS+İrisin grubu, (C, F) PKOS+GH grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100 µm; D, E, F: 20 µm.

4.6.6. Uterusta EGF Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitelde EGF immün pozitif hücreler, semikantitatif H-Skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

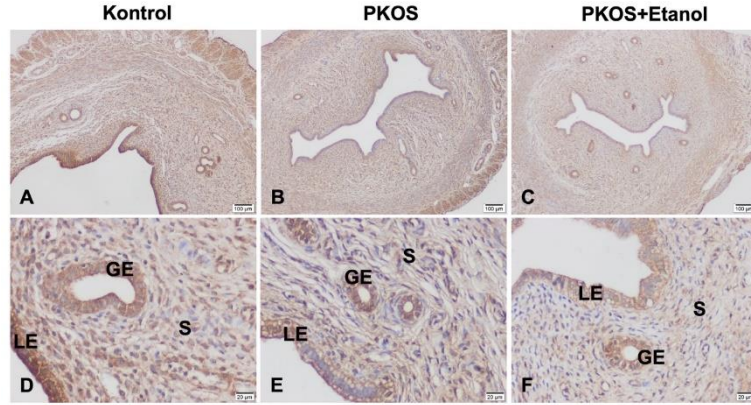
Luminal ve Glandüler epitel ile stromada, kontrol grubu ile PKOS ve PKOS+Etanol grupları arasındaki EGF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, PKOS ve PKOS+Etanol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0,0001$). PKOS ve PKOS+Etanol grubu arasındaki EGF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). PKOS grubu ile tedavi grupları arasındaki EGF immunreaktivitesi karşılaştırıldığında, tedavi gruplarında PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0,05$) (Şekil 25, 26 ve 27, Tablo 12).



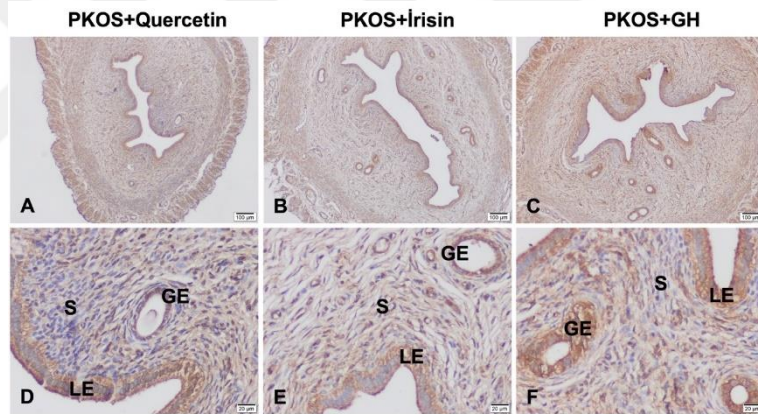
Şekil 25. Tüm gruplara ait uterus dokularında EGF immunreaktivite seviyelerini gösteren grafik (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p < 0,0001$; ns, $p > 0,05$).

Tablo 12. Tüm grupların uterus dokularında luminal epitel, stroma ve glandular epitele ait EGF H-Skor değerleri

EGF	Kontrol	PKOS	PKOS+Etanol	PKOS+Quercetin	PKOS+İrisin	PKOS+GH
Luminal Epitel	351±51,28	288,4±3,04	286,4±6,22	350±57,11	372±20,18	386,8±6,57
Stroma	352,6±52,64	242±50,21	285±5,29	311±44,23	389,6±3,71	389,2±5,93
Glandular Epitel	349,6±53,59	289,6±4,21	284±4,18	346±51,16	387±5,70	388,4±6,54



Şekil 26. Uterusta EGF ekspresyonu: (A, D) Kontrol grubu, (B, E) PKOS grubu (C, F) PKOS+Etanol grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100 µm; D, E, F: 20 µm.



Şekil 27. Uterusta EGF ekspresyonu: (A, D) PKOS+Quercetin grubu, (B, E) PKOS+Irisin grubu, (C, F) PKOS+GH grubu. LE: Luminal epitel, S: Stroma, GE: Glandular epitel. Ölçek: A, B, C: 100 µm; D, E, F: 20 µm.

V. TARTIŞMA

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre Polikistik over sendromu reproduktif dönemdeki kadınların yaklaşık %5-10'unu etkilemektedir. PKOS ilk kez Stein ve Leventhal tarafından 1935 yılında tanımlanmıştır. Aradan geçen yıllara rağmen üzerinde en çok tartışılan ve gizemini koruyan hastalık konumundadır. Günümüzde en sık kullanılan tanı kriterleri 2003'te ESHRE/ASRM tarafından belirlenmiştir. Buna göre hastalar kronik anovulasyon, hiperandrojenizm, ultrasonografik polikistik over görüntüsü gibi üç kriterden ikisini göstermelidir (8). Etiyolojisinde genetik ve çevresel birçok faktörün rol oynadığı multisistemik bir hastalık olan PKOS ayrıca hirsutizm, akne, alopesi, obezite, oksidatif stres, infertilite, Tip 2 DM, kardiyovasküler hastalıklar ve endometrium kanseri gibi metabolik anomalilere de neden olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Sander ve ark. yaptığı çalışmada, PKOS'lu hastalarda bazı ovaryan faktörler nedeni ile folikülogenez sürecinin kolaylıkla duraksadığını ve olgunlaşmadığını göstermişlerdir (109).

Deneyimizde letrozol uygulanan sıçanların vajinal sitolojisi, düzensiz östrus döngüsü sergilemiştir, bu nedenle PKOS modellemesi başarıyla kurulmuştur.

Çalışmamızda PKOS modeli oluşturulan sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla ovaryumun histomorfolojik incelemesinde kistik foliküllerin olduğu bunun yanı sıra granüloza hücre tabakasının kistik foliküllerde ince olduğu ve korpus luteumun az sayıda olduğu izlendi. Korpus luteumun azalması ya da izlenmemesi bu gruptaki sıçanlarda anovulasyon ya da oligoovulasyonu düşündürdü. Quercetin, İrisin ve Growth Hormon verilen gruplarda ise kistik folikül yapısının düzelmediği fakat daha sağlıklı bir yapıda oldukları ve graff folikül varlığı izlendi. Bu gruplardaki foliküllerde korpus luteum ve korpus albicans olması tedavilerin PKOS patogenezindeki kısır döngüyü kırabildiğini,

folikülogenezisin sürdürülmesi üzerindeki etkisini ve ovulasyonu arttırabildiğini düşündürdü.

PKOS'da ortaya çıkan insülin direnci ve artmış LH salınımı, ovaryan foliküllerde androjen sentezinin artmasına sebep olur. Dolaşımda yeterli miktarda insülin bulunmasına rağmen insülinin glikoz up-take yanıtının beklenenden az olması durumuna insülin direnci denir (27). İnsülin direnci ve beraberinde kompensatuvar hiperinsülinemi hem zayıf hem de obez PKOS hastalarında sık görülen bir bulgudur, bununla beraber dolaşımda artmış olarak bulunan androjenler, hiperinsülinemi ve seks hormon bağlayıcı globulin düzeylerinde azalmaya yol açarak serbest testosteron düzeylerinde artışa neden olmaktadır (111). Bu durum hiperinsülinemiyi daha da kötüleştirip hiperandrojenik ovaryan ortamı kısır bir döngüye sokmaktadır. Sonuçta artan androjen/östradiol oranı ve LH hipersekresyonu ovaryan mikroçevreye etki ederek foliküllerin atreziye uğramasına neden olmaktadır (70, 110). Bu sebeple klinik pratikte PKOS hastalarının tedavisinde insülin direncini düzeltmek, dolayısıyla hiperandrojenemiyi azaltmak ve bu kısır döngüyü kırmak için pek çok ajan kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan ve ilk olarak Boström ve ark. tarafından 2012 yılında ortaya atılan irisin molekülü, egzersizle indüklenen, miyositlerden salınan glikoprotein yapıda bir miyokindir (98). İrisin molekülünün enerji metabolizmasıyla ve insülin rezistansı ile yakından ilişkisi olduğu için PKOS patofizyolojisinde de yeri olabileceği öne sürülmüştür (101).

Yapılan çalışmalar sonucunda rekombinant teknoloji ile üretilen irisinin ekzojen kullanımının PKOS için terapötik bir potansiyeli olabileceği öne sürülmüştür. Baştu ve ark. (119) fare modellerinde yaptığı çalışmalarında ekzojen irisin kullanımının, kilo verdirici ve kaliteli folikül sayısını artırıcı etkisinin egzersizle benzer olduğunu ortaya koymuştur. Bu bilgiler doğrultusunda irisinin ekzojen kullanımının termogenezi indüklediği ve enjektabl polipeptid formunun obez hasta grubunda terapötik bir alternatif olarak kullanılabileceği teorik olarak ortaya konulmuştur.

Chenggang Li ve ark. (102) 2019 yılında yaptıkları deneysel çalışmalarında, PKOS modeli oluşturarak irisin tedavisinin endometrial reseptiviteye etkisini araştırmışlar ve çalışmanın sonucuna göre sıçanların uterin dokularına ait kesitlerde, PKOS grubunda kontrol ve irisin grubuna göre LIF seviyelerinin istatistiksel olarak azaldığını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da PKOS grubuna kıyasla irisin tedavisi verilen grupta özellikle luminal epitelde integrin $\alpha\beta 3$, LIF, EGF düzeyi anlamlı olarak arttı. Bu sonuçlar irisinin endometriyal reseptiviteye olumlu etkileri olduğunu düşündürdü.

PKOS ve endometrial reseptivite arasında oksidatif strese bağlı gelişen doğrudan bir ilişki olduğu da bildirilmiştir. Endometrial reseptivite, implantasyon penceresi döneminde blastokist ile uterus arasındaki karşılıklı etkileşimdir. PKOS'a bağlı ortaya çıkan reaktif oksijen radikallerinin endometrial reseptiviteyi olumsuz yönde etkileyerek implantasyon penceresi döneminde blastokistin uterusu tutunmasını engellediği düşünülmektedir. Bu yönüyle reaktif oksijen radikallerinin azaltılması ile PKOS'lu hastaların tedavi sürecinde gebelik başarı oranlarının olumlu yönde etkilendiği bilinmektedir. 2013 yılında Murri M ve ark.'nın 68 çalışmayı derleyerek yaptıkları bir meta analizde, PKOS'lu hasta grubuna ait 4933 ve kontrol grubuna ait 3671 kişi incelenmiştir. Oksidatif stres belirteci olabilecek pek çok molekülün, PKOS hastalarında kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak artmış olduğu; buna ek olarak bazı antioksidan belirteçlerinin ise azaldığı gösterilmiştir (112). Khorchani ve ark. 2020 yılında yaptıkları başka bir çalışmalarında DHEA ile indüklenmiş sıçanlarda bir antioksidan olan Quercetin ile tedavinin, aromataz ekspresyonunu ve östradiol seviyesini azalttığını, ayrıca insülin seviyelerini azaltarak insülin direncini iyileştirdiğini saptamışlar, böylece Quercetin'in anovulasyon ve infertilite semptomlarını iyileştirebileceğini ifade etmişlerdir (96, 97). Bu durum, PKOS tedavisinde antioksidanların rolü olabileceğini düşündürmektedir. Fard Tebrizi ve ark. (120) tarafından Mart 2019'a kadar olan çalışmaların incelendiği sistematik derlemede, PKOS'lu grupta quercetin takviyesinin etkinliğini değerlendirmek amaçlanmıştır. Belirlenen 253 makaleden 8 uygun makale (5 hayvan çalışması ve 3 klinik çalışma) gözden geçirilmiş ve çalışmaların çoğu Quercetin'in yumurtalık histomorfolojisi,

folikülogenez ve luteinizasyon süreçleri üzerindeki yararlı etkilerini desteklemiştir. Bu derlemede Quercetin'in testosteron, LH ve insülin direnci düzeylerini düşürücü etkileri de bildirilmiştir. Quercetin'in faydasının kilo azaltıcı etkilerinden ziyade antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile daha yakından ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. Bu nedenle, meta analiz, Quercetin'in PKOS komplikasyonlarını azaltmak için potansiyel bir ajan olarak kabul edilebileceğine dair kanıtlar sunmaktadır. Bununla birlikte, yüksek kaliteli klinik çalışmaların azlığı nedeniyle, daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Deneyimizde PKOS grubuna kıyasla PKOS+Quercetin grubunda endometrial luminal epitelde reseptivite göstergelerinden integrin $\alpha\beta3$, LIF, EGF anlamlı düzeyde arttı. Literatürde deneysel PKOS oluşturulmuş sıçanlarda Quercetin tedavisinin endometrial reseptivite belirteçlerine etkisini inceleyen çok çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple Quercetin'in endometrial reseptivite üzerine olan etkilerinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda yer alan büyüme hormonu ve reseptörü, insanların ve sıçanların endometriyumunda ifade edilmektedir. Büyüme hormonu etkisi ile endometriumun daha kalın ve daha iyi bir patern gösterdiği ve daha iyi klinik gebelik oranları sağladığı saptanmıştır. Büyüme hormonunun infertil kadınlarda endometrial reseptiviteyi artırdığı pek çok çalışmada gösterilmiştir ve bu etkiyi endometrial reseptivite ile ilgili bazı gen ve proteinleri regüle ederek sağlayabilmektedir. Büyüme hormonu karaciğer dışında ovaryan foliküllerde de IGF-1 üretimini uyarır. Büyüme hormonu IGF-1 aracılığıyla gonadotropinlerin teka ve granülosa hücrelerine olan etkisini artırır, DNA sentezi, steroidogenez, aromataz aktivitesi, LH reseptör sentezi ve inhibin sekresyonunu uyarmaktadır. (106). Kısırlık tedavisinde büyüme hormonu eklenmesinin oosit sayısını fazla arttırmadığı halde gebelik ve canlı doğum oranlarını iyileştirdiğinin saptanması, oosit kalitesini ve böylece infertilite tedavilerinin başarısını arttırabileceğini düşündürmüştür. Düşük ovaryan rezervi olan hastalarda ovulasyon indüksiyonunda adjuvan olarak büyüme hormonu eklenmesi canlı doğum oranlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir iyileşme sağlamaktadır (107). Tesarik ve ark. yaptığı bir araştırmada 40 yaş

üstü hastaların IVF tedavisinde büyüme hormonunun kullanılmasının doğum oranlarını arttırdığını bildirmişlerdir (108). Kötü cevaplı olgularda tedaviye büyüme hormonu eklenmesinin canlı doğum oranlarını arttırdığını gösteren çalışmalar olmasına rağmen, literatürde büyüme hormonu ile ilgili çalışmalarda olgu sayısı sınırlı olup, doz ve süre çeşitlilikleri vardır. Bununla birlikte PKOS'lu hasta grubunda oosit maturasyonunun bozuk olmasının infertilite tedavi başarısını olumsuz etkilediği çok iyi bilinmekle birlikte endometrial reseptivitenin etkisi net belirlenmemiştir. Slot KA ve ark. (121) 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada büyüme hormonu reseptör bozukluğu olan farelerde primordiyal folikül seviyesinin önemli oranda yüksek olduğunu saptarken, primer, preantral ve antral folikül sayısının ise düşük izlendiğini belirtmişlerdir. Bu farelere uygulanan IGF-1 tedavisi sonrası sağlıklı antral folikül sayısının arttığı saptanmıştır. Böylece büyüme hormonunun IGF-1 aracılığıyla primordiyal foliküllerin gelişmesini stimüle ettiğini ve antral folikülleri atreziye gitmekten koruduğunu belirtmişlerdir. Biz de deneyimizde PKOS grubuna kıyasla büyüme hormonu verilen grupta endometriyal luminal epitelde integrin $\alpha\beta 3$ ve EGF'nin anlamlı oranda arttığını buna karşılık endometriyal reseptivitede önemli bir yeri olan LIF antikorunda anlamlı bir değişiklik olmadığını saptadık. Bu bulgular ışığında growth hormonun endometriyal reseptiviteye kıyasla oosit maturasyonunda daha önemli bir yere sahip olduğunu düşündük.

Bu proje ile infertilite tedavilerinde kullanılan adjuvanların endometrium üzerine etkilerinin araştırılması literatür için oldukça önemlidir. Özellikle literatürde büyüme hormonu ile endometrial reseptivitenin spesifik olarak PKOS'lu hastalarda değerlendirildiği ilk çalışma bizim çalışmamızdır. Literatürde ümit vaat ederek kullanılması planlanan adjuvan tedavilerin karşılaştırılarak endometrial reseptivite ve oosit kalitesinin birlikte değerlendirildiği başka bir çalışma bulunmamaktadır.

PKOS patofizyolojisinde, pulsatil GnRH salınım değişiklikleri, artmış LH ve LH/FSH oranına sebep olmaktadır. Çalışmamızda PKOS grubunun LH düzeyleri ve T ortalamaları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı azalma bulundu.

FSH için sonuçlar analiz edildiğinde, tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamız, Mahmoud ve ark.'nın (113) DHEA uygulamasıyla oluşturdukları PKOS modelinde olduğu gibi antioksidan ve insülin duyarlaştırıcı ajanların serbest T düzeyini azaltarak hiperandrojenizmi azaltmada ve hipotalamik-hipofiz-yumurtalık eksen fonksiyonunu iyileştirmede etkili olduğunu ortaya koydu. Sonuçlar, bu adjuvan tedavilerin folikülogenezi artırabileceğini ve hiperandrojenizmi zayıflatarak atreziyi azaltabileceğini ve ovulasyonu arttıracaklarını düşündürdü. Dolayısıyla bu bulguların yukarıda sözü edilen literatür çalışmalarıyla uyumlu nitelikte olduğu görüldü.

Çalışmamızda PKOS modeli oluşturulan sıçanların, uterin luminal epitelinde kontrol grubuna göre, endometrial duyarlılığı gösteren integrin $\alpha\beta3$, LIF ve EGF seviyelerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanırken, EGF seviyesinde ise tüm tedavi gruplarında anlamlı artış bulundu. Apparao ve ark. (114) PKOS'lu kadınlarda yapmış olduğu çalışmalarında integrin $\alpha\beta3$ seviyelerinin azaldığını, EGF eklenerek hazırlanmış kültür ortamında integrin $\alpha\beta3$ seviyelerinin arttığını tespit etmişlerdir.

Endometrial reseptivitenin bir diğer göstergesi Muc-1'dir. Muc-1, insanda peri implantasyon döneminde yüksek miktarda eksprese olur ve Muc-1 miktarının artmasının blastokisti epitel yüzeyinde diğer inhibitör faktörlerin etkisinden koruduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda Muc-1 için yapılan analizlerde PKOS ve tedavi grupları karşılaştırıldığında glandüler epitelde ve stromada anlamlı olabilecek istatistiksel fark saptanmadı. Baracat ve ark.'nın (115) yaptıkları bir meta analizde 467 makale incelenmiş ve Muc-1 ekspresyonu, ovulatuar PKOS 'lu kadınlar arasında bir rapordaki kontrol kadınlarından daha yüksek saptanmış ancak başka bir çalışmada değişiklik göstermediği rapor edilmiştir. Tüm bu çelişkili sonuçlar doğrultusunda daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç olduğu aşikardır.

GDF 9 ve BMP 15, TGF- β ailesinin oosite ait bir üyesi olup, folikül gelişiminde önemli rol oynar. Farelerde yapılan çalışmalar, GDF 9'un folikülogenezde gerekli olduğunu ve GDF 9 sinyali azalmış olan farelerin ilk aşamada

folikülogenezlerinin bütünüyle engellenerek infertil hale geldiklerini göstermiştir (118). Li Na Wei ve ark.'nın (116) yaptıkları bir klinik çalışmada kontrol dokularındaki seviyelere kıyasla PKOS'lu hastalarının yumurtalık dokularındaki primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde daha az GDF 9 ve BMP 15 ekspresyonu gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Gonzalez A ve ark.'nın (117) yaptığı bir çalışmada İspanya'da PKOS' lu kadınlarda BMP 15 geninin PCOS ile ilişkili olmadığı ve daha çok anovulasyon ve infertilite ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Fabio Lopes (118) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise PKOS' lu kadınların overlerinden elde edilen kesitlerde kontrol grubuna göre azalmış bir GDF 9 sinyali seviyesi gözlemlenirken, BMP 15 ifadesinde kalitatif veya kantitatif bir değişiklik olmamıştır.

Bizim çalışmamızda PKOS grubunda kontrol grubuna kıyasla, GDF 9 ve BMP 15 immunreaktivitesi, tüm foliküllerde tespit edilmedi. Tedavi alan gruplara ait GDF 9 ve BMP 15 immunreaktivite tüm foliküllerde pozitif görüldü. Bu sonuç ise adjuvan tedavilerin oosit maturasyonunda etkili olduğunu düşündürdü.

Bu yeni bulguların, PKOS'lu kadınlarda implantasyon defektleri ve oosit maturasyonu ile ilgili gelecekteki çalışmalara zemin hazırlayacağına ve kadın üreme sistemi hastalıklarındaki rolüne ilişkin anlayışımızı ilerleteceğine inanıyoruz.

VI.SONUÇ

Üreme çağındaki kadınların %5-10'unda görüldüğü bildirilen PKOS, adet düzensizliği ve kısırlığın da önemli sebeplerinden birini oluşturmaktadır. Biz bu çalışma ile antioksidan etkili bir flavanoid olan quercetin, metabolik sendromda ve insülin direncini azaltmada etkileri gösterilen irisinin, kısırlık tedavisinde adjuvan olarak ümit vaat eden büyüme hormonunun PKOS'da endometrial duyarlılığa ve kısırlığa olan etkisini araştırmayı, böylece ülkemiz ve dünya genelinde PKOS ve kısırlık tedavisinde öncelikli seçeneklerin belirlenmesi için literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

Öncelikle PKOS grubunda sıçanların vajinal sitolojisi, düzensiz östrus döngüsü sergilemiştir. Sıçanların ağırlıkları deneyin ilk günü ve letrozol uygulamasının son günü karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür. Bu nedenle PKOS modellemesi başarıyla kurulmuştur.

Oksidatif stres ve inflamatuvar değişiklikler, insülin rezistansı yanında sendromun patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Oluşan bu olumsuz süreç özellikle infertil olgularda folikülogenezde, ovulasyonda ve implantasyon aşamasında başarısızlığa neden olabilir. Oksidatif stresin endometriyumda ve ovaryuma belirgin etkisinin görüldüğü PKOS'da, tedavi gruplarında gelişmekte olan foliküllerin ve graff foliküllerin varlığı ayrıca korpus luteum ve korpus albicans görülmesi, PKOS'taki over morfolojisinin düzeldiğini ve immünohistokimyasal sonuçları destekler nitelikte olduğunu göstermiştir. Tedavi gruplarında luminal epitelde endometrial reseptivite belirteçleri incelendiğinde PKOS endometriumuna kıyasla $\alpha\beta3$ integrin, LIF ve EGF immunreaktivitesinde istatistiksel anlamlı fark vardı. Bir diğer endometrial reseptivite belirtecimiz olan Muc-1, insanda peri implantasyon döneminde yüksek miktarda eksprese olur ve Muc-1 miktarının artması blastokisti epitel yüzeyinde diğer inhibitör faktörlerin etkisinden koruduğu düşünülmektedir fakat bizim çalışmamızda PKOS ve tedavi grupları karşılaştırıldığında glandüler epitelde ve stromada anlamlı olabilecek istatistiksel fark saptanmadı.

Sonuç olarak; çalışmamızda tespit ettiğimiz bulgulara göre kullandığımız adjuvanlar endometrial reseptiviteyi iyileştirmede ve infertilite tedavisinde destek tedavi olarak kullanılabilir. Adjuvanların oksidatif stresi azalttığı ve insülin rezistansını iyileştirdiği düşünüldüğünde hem ovulasyon hem implantasyon oranını arttırabileceği kanaatindeyiz.



VII.ÖZET

PKOS MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA ADJUVANLARIN ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE VE İNFERTİLİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

AMAÇ: Biz bu çalışma ile antioksidan etkisi olan quercetin, insülin direncini azaltmada etkileri gösterilen irisinin, kısırlık tedavisinde adjuvan olarak ümit vaad eden büyüme hormonunun Polikistik over sendromu oluşturulmuş sıçanlarda endometrial reseptiviteye ve oosit maturasyonuna olan etkisini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM: 4 haftalık dişi Wistar Albino sıçanlar kullanılarak kontrol, PKOS, PKOS + Etanol, PKOS + Quercetin, PKOS + İrisin ve PKOS + Growth Hormon olmak üzere altı grup oluşturuldu. PKOS modeli oluşturmak için 1mg/kg letrozol kullanıldı. Tedavi sonunda alınan serum örnekleri ile biyokimyasal inceleme, uterin ve ovaryum dokularıyla histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı. Bu amaçla endometrial reseptivite için $\alpha\beta 3$ integrin, LIF Muc-1, EGF, oosit maturasyonu için GDF 9 ve BMP 15 antikorlarının dağılımına bakıldı.

BULGULAR: Tedavi gruplarında graff foliküllerin varlığı ayrıca korpus luteum ve korpus albicans görülmesi, GDF 9 ve BMP 15 immunreaktivitesi incelendiğinde ise tüm foliküllerde pozitif olduğunun görülmesi, PKOS'daki over morfolojisinin düzeldiğini ve immünohistokimyasal sonuçları destekler nitelikte olduğunu gösterdi. Tedavi gruplarında PKOS endometriumuna kıyasla $\alpha\beta 3$ integrin, LIF ve EGF immunreaktivitesinde istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Muc-1'de ise PKOS ve tedavi grupları karşılaştırıldığında anlamlı olabilecek istatistiksel fark saptanmadı ($p>0,05$).

SONUÇ: Quercetin, İrisin, Growth Hormon'nun endometriyal reseptiviteye, over morfolojisine, ovulasyona anlamlı faydası olduğu gösterilmiştir. Quercetin, İrisin ve Growth Hormon, PKOS tedavisinde klasik tedavilere destek olarak umut vaat edici ajanlar olabilir.

ANAHTAR KELİMELEER: Quercetin, İrisin, Growth Hormon, PKOS, oksidatif stres, endometriyal reseptivite, oosit maturasyonu

VIII.İNGİLİZCE ÖZET

EFFECTS OF ADJUVANTS ON ENDOMETRIAL RECEPTIVITY AND INFERTILITY IN RATS WITH PCOS MODEL

OBJECTIVE: In this study, we aimed to investigate the effects of quercetin which has an antioxidant effect, irisin which has been shown to reduce insulin resistance and growth hormone which is promising as an adjuvant in the treatment of infertility, on endometrial receptivity and oocyte maturation in rats with polycystic ovary syndrome.

MATERIALS AND METHODS: Six groups of control, PCOS, PCOS + Ethanol, PCOS + Quercetin, PCOS + Irisin and PCOS + Growth Hormone were formed using 4-week old female Wistar Albino rats. 1mg/kg letrozole was given to establish the PCOS model. At the end of the treatment, biochemical analysis was performed with serum samples, and histological and immunohistochemical evaluation was performed with uterine and ovarian tissues. For this purpose, the distribution of $\alpha\beta3$ integrin, LIF Muc-1, EGF for endometrial receptivity, and GDF 9 and BMP 15 antibodies for oocyte maturation were examined.

RESULTS: The presence of graff follicles in the treatment groups also showed the appearance of corpus luteum and corpus albicans, while the immunoreactivity of GDF 9 and BMP 15 was positive in all follicles when examined, indicating that the ovarian morphology in PCOS had improved and supported immunohistochemical results. There was a statistically significant difference in $\alpha\beta3$ integrin, LIF and EGF immunoreactivity in the treatment groups compared to PCOS endometrium ($p<0.05$). There was no significant statistical difference in Muc-1 compared to PCOS and treatment groups ($p>0.05$).

CONCLUSION: Quercetin, Irisin, Growth Hormone have been shown to have significant benefits on endometrial receptivity, ovarian morphology, and ovulation. Quercetin, Irisin and Growth Hormone may be promising agents in the treatment of PCOS as a supplement to conventional therapies.

KEYWORDS: Quercetin, Irisin, Growth Hormone, PCOS, oxidative stress, endometrial receptivity, oocyte maturation



IX.KAYNAKLAR

1. Achard C, J. T. 1921. Le virilisme pileaire et son association à l'insuffisance glycolytique (diabète des femme á barbe). Bull Acad Natl Med. 86:51-83.
2. Stein IF. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol. 1935;29: 181-191.
3. Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gorden P, Martin MM, et al. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans: insulin-receptor disorders in man. New England Journal of Medicine. 1976;294(14):739-45.
4. M Swanson, E E Sauerbrei, P L Cooperberg Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries J Clin Ultrasound May-Jun 1981;9(5):219-22
5. Adams J, Polson D, Franks S. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. Br Med J (Clin Res Ed). 1986;293(6543):355-9.
6. Yen S.S. The polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf). 1980; 12:177-207
7. Szydlarska D, Machaj M, Jakimiuk A. History of discovery of polycystic ovary syndrome. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2017;26(3):555-558.
8. The Rotterdam ESHRE/ASRM – Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril., 2004; 81:19– 25.
9. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. The Androgen Excess and PKOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report, Fertil Steril 2009, 91:456-488.

10. Kumarapeli V, Seneviratne Rde A, Wijeyaratne CN, Yapa RM, Dodampahala SH. A simple screening approach for assessing community prevalence and phenotype of polycystic ovary syndrome in a semi-urban population in Sri Lanka. *Am J Epidemiol*. 2008; 168:321–328. [PubMed: 18550559]
11. Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2012; 27:14–24. [PubMed: 22147920]
12. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C, Jacobs HS. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod*. 1995; 10:2107–2111. [PubMed: 8567849]
13. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:3666–3672. [PubMed: 10523012]
14. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudeilli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:5957–5962. [PubMed: 14671196]
15. Magoffin DA. The ovarian androgen-producing cells: a 2001 perspective. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2002;3(1):47-53.
16. Sheehan MT. Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. *Clin Med Res* 2004;2:13-
17. Bozdag G, Mumusoglu S, Zengin D, et al. (2016). The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 31(12), 2841-2855
18. Yildiz BO, Bozdag G, Yapici Z, et al. (2012). Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Human reproduction*, 27(10), 3067-3073.

19. Rutkowska AZ, Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovary syndrome and environmental toxins. *Fertil Steril*. 2016;106:948–58.
20. Barkley GS. Factors influencing health behaviors in the National Health and Nutritional Examination Survey, III (NHANES III). *Social Work in Health Care*. 2008;46(4):57-79.
21. Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, et al. A pulsatile gonadotropin releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology* 1991;128:509-17
22. Marshall JC, Eagleson CA. Neuroendocrine aspects of polycystic ovary syndrome. *Endoc Meta Clinic North Am*. 1999;28:295–324.
23. Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB, Brigell DF, Sheikh Z. Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *New England Journal of Medicine*. 1992;327(3):157-62.
24. Acien P, Ouereda F, Matallin P. Insulin, androgens, and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. *Fertil Steril* 1999; 72(1): 32-40.
25. Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod*. 2002;17:2573–9.
26. Steiner, D.F. 1967. Cunningham DD, Spiegelman S, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*. 157:697-700.
27. Salehi, M., Vera Bravo, R., Sheikh, A. 2004. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: What is the role of obesity ? *Metabolism*.53:358-71.
28. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertility and sterility*. 2005;83(5):1454-60.

29. Fritz MA, Speroff L. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite 8. Baskı, Çeviri Editörü G. Serdar Günalp, Ankara, Güneş Kitabevi, 2011 Bölüm 12 Kronik Anovulasyon ve Polikistik Over Sendromu
30. Dunaif A, Book CB. Insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. Clinical research in diabetes and obesity: Springer; 1997. p. 249-74
31. Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. The journal of clinical endocrinology & metabolism. 1999;84(1):165-9.
32. Ehrmann, D.A. 2005. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med. 352: 1223–1236.
33. Nahum R, Thong KJ, Hillier SG. Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro. Hum Reprod 1995;10:75-81.
34. Ibáñez L, Potau N, Zampolli M, et al. Hyperinsulinemia and decreased insulin-like growth factor-binding protein-1 are common features in prepubertal and pubertal girls with a history of premature pubarche. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82: 2283–2288
35. Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, et al. Glucose intolerance, insulin resistance and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:2031-6.
36. Norman R, Moran L, Kovacs G, Norman R. Lifestyle factors in the etiology and management of polycystic ovary syndrome. Polycystic ovary syndrome. 2000:121-39.
37. Ferriman D, Gallwey J. Clinical assessment of body hair growth in women. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1961;21(11):1440-7.
38. Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, Go RC, Azziz R. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. Fertil Steril 2001; 75: 53-58.

39. Nagamani M, Lingold JC, Gomez LG, Barza JR, Clinical and hormonal studies in hyperthecosis of the ovaries. *Fertil Steril* 1981; 36: 326-332.
40. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Magoffin DA. 5 α -Reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(7):2414-2418. doi:10.1210/jcem.84.7.5863
41. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assesment of body hair in women *JCEM* 1961; 24: 1440-1447.
- 42.Lobo, R.A., Goebelsmann, U., Horton, R. 1983.Evidence for the importance of peripheral tissue events in the development of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:393– 397.
43. Seratini P, Alban F, Lobo RA. 5 α -reductase activity in the genital skin of hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:349-55.
44. Homburg R, Lambalk CB. Polycystic ovary syndrome in adolescence a therapeutic conundrum. *Human Reproduction*. 2004;19(5):1039-42.
45. Barth JH, Yasmin E, Balen AH. The diagnosis of polycystic ovary syndrome: the criteria are insufficiently robust for clinical research. *Clinical Endocrinology*. 2007;67(6):811-5.
46. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in poly- cystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;38: 1165-74.
47. Hoffman, Schorge, Bradshaw, Halvorson, Schaffer C. *Williams Gynecology Third Edition*.; 2016. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
48. Simonson DC. Surrogate measures of insulin resistance: does one size fit all? *Diabetologia*. 2014;58(2):207–210. doi:10.1007/s00125-014-3454-y
49. Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, vd. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):48–53. doi:10.1210/jc.2005-1329

50. Salley KES, Wickham EP, Cheang KI, Essah PA, Karjane NW, Nestler JE. POSITION STATEMENT: Glucose Intolerance in Polycystic Ovary Syndrome A Position Statement of the Androgen Excess Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(12):4546–4556. doi:10.1210/jc.2007-1549
51. Legro RS, Dodson N'C, Dunaif A. PCOS: a review of reproductive age glucose intolerance poorly detected by fasting blood glucose levels. *Proceeding of the Endocrine Society 80th Annual Meeting, New Orleans, La,* 1998; 24-28.
52. M. S. Ulu ve Ş. Yüksel , "İnsülin Direnci", *Kocatepe Tıp Dergisi*, c. 16, sayı. 3, ss. 238-243, Ağu. 2015, doi:10.18229/ktd.41969
53. Mirzaalian Y, Nourian M, Gholamalizadeh M, vd. The association of quantitative insulin sensitivity indices (HOMA-IR and QUICKI) with anthropometric and cardiometabolic indicators in adolescents. *Arch Med Sci - Atheroscler Dis.* 2019;4(1):32–37. doi:10.5114/amsad.2019.84411
54. Wang, Y.C., K. McPherson, T. Marsh, S.L. Gortmaker, and M. Brown. 2011. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet (London, England)* 378: 815–825. doi:10.1016/S0140-6736(11)60814-3.
55. Rtveladze, K., T. Marsh, S. Barquera, L.M. Sanchez Romero, D. Levy, G. Melendez, L. Webber, F. Kilpi, K. McPherson, and M. Brown. 2014. Obesity prevalence in Mexico: Impact on health and economic burden. *Public Health Nutrition* 17: 233–239. doi:10.1017/S1368980013000086.
56. Manners-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Odén A, Holm G, et al. Lönn M 2011 Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 96:E304-E11.
57. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology,

pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 2015;36(5):487-525. doi:10.1210/er.2015-1018

58. Chang RJ, Dumesic DA. *Polycystic Ovary Syndrome and Hyperandrogenic States*. Eighth Edi. Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-323-47912-7.00021-4

59. Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, Mora S. The metabolic syndrome in women. *Cardiology in review*. 2006;14(6):286-91.

60. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(11):4237-45.

61. Azziz R. The evaluation and management of hirsutism. *Obstet Gynecol*. 2003;101(5):995–1007. doi:10.1016/s0029-7844(02)02725-4

62. Tarkun I, Arslan BnC, Cantürk Z, Türemen E, Şahin T, Duman C. Endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome: relationship with insulin resistance and low-grade chronic inflammation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(11):5592-6.

63. PCOS Australian Alliance. *Evidence-Based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndrome*. Melbourne: Jean Hailes Foundation for Women's Health on behalf of the PCOS Australian Alliance, 2011.

64. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a MANUSCRIPT ACCEPTED ACCEPTED MANUSCRIPT 23 consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95: 2038-2049.

65. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98: 4565- 4592.
66. Talbott E, Guzick D, Clerici A, et al. Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:821-6.
67. Gultekin, M., Kucukyildiz, I., Karaca, M. Z., Dundar, S., Boztas, G., Turan, S. H., Keskinilic, B. 2017. Trends of gynecological cancers in Turkey: toward Europe or Asia? *International Journal of Gynecologic Cancer*, 27(7), 1525-1533.
68. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, et al. Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(16):1127-1135. doi:10.1093/jnci/88.16.1127
69. Günalp S., Yüce K. ve ark. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi 3. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2014 Bölüm 26 Polikistik Over Sendromu
70. Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update* 2011; 17(1): 17-33.
71. Huber-Buchholz MM, Carey DG, Norman RJ. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: Role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1470-1474.
72. Ladson G, Dodson WC, Sweet SD, et al. The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: a randomized doubleblind study. *Fertil Steril* 2011;95:1059–66.
73. Wolczyński S, Zgliczyński W. Abnormalities of the menstrual cycle. In: *Large Interna – Endocrinology*. 2nd edition. Medical Tribune Poland, Warsaw 2012, 561–567.

74. Givens, J.R., Andersen, R.N., Wiser, W.L. 1976. The effectiveness of two oral contraceptives in suppressing plasma androstenedione, testosterone, LH, and FSH, and in stimulating plasma testosterone-binding capacity in hirsute women. *Am J Obstet Gynecol.* 124:333–339.
75. Schiavone, F.E., Rietschel, R.L., Sgoutas, D. 1983. Elevated free testosterone levels in women with acne. *Arch Dermatol.* 119:799– 802.
76. Wild, R.A. 1995. Obesity, lipids, cardiovascular risk, and androgen excess. *Am J Med.* 98:27S–32S.
77. Amin, E.S., El-Sayed, M.M., El-Gamel, B.A. 1980. Comparative study of the effect of oral contraceptives containing 50 microgram of estrogen and those containing 20 microgram of estrogen on adrenal cortical function. *Am J Obstet Gynecol.* 137:831–833.
78. Brown AJ, Westin SN, Broaddus RR, Schmeler K. Progestin intrauterine device in an adolescent with grade 2 endometrial cancer. *Obstet Gynecol.* 2012;119(2 Pt 2):423- 426. doi:10.1097/AOG.0b013e318234d97c
79. Azziz R, Ehrmann D, Legro RS, et al. Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: A multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1626-1632. doi:10.1210/jc.86.4.1626
80. Ehrmann DA, Cavaghan MK, Imperial J, Sturis J, Rosenfield RL, Polonsky KS. Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(2):524- 530. doi:10.1210/jc.82.2.524
81. Falsetti, L. 2001. Efficacy of the combination ethinyl estradiol and cyproterone acetate on endocrine, clinical and ultrasonographic profile in PCOS. *Hum Reprod.* 16:36-42 110.
82. Venturoli S, Marescalchi O, Colombo FM, Macrelli S, Ravaioli B. Acetate-Estrogen Regimens in the Treatment of Hirsutism. 1999;84(4):1304-1310.

83. Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F. Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: A comprehensive review. *Endocr Rev.* 2009;30(1):1-50. doi:10.1210/er.2008-0030
84. Casper RF, Mitwally MFM. Review: Aromatase inhibitors for ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):760-771. doi:10.1210/jc.2005-1923
85. Abdellah MS. Reproductive outcome after letrozole versus laparoscopic ovarian drilling for clomiphene-resistant polycystic ovary syndrome. *Int J Gynecol Obstet.* 2011;113(3):218-221. doi:10.1016/j.ijgo.2010.11.026
86. Baskind NE, Balen AH. Hypothalamic–pituitary, ovarian and adrenal contributions to polycystic ovary syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2016;37:80-97.
87. Sahmay S AN. Polycystic Ovary Syndrome. *Türkiye Klinikleri J Fam MedSpecial Topics* 2013;4(6).
88. Falaschi P, del Pozo E, Rocco A, et al. Prolactin release in polycystic ovary. *Obstet Gynecol.* 1980;55(5):579-582.
89. Seifer DB, Baker VL, Leader B. Age-specific serum anti-Müllerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertility and Sterility.* 2011;95(2):747-50.
90. Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, Nelson SM. Can anti-Müllerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2013;98(8):3332-40.
91. Sahmay S, Aydın Y, Oncul M, Senturk LM. Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome: AMH in combination with clinical symptoms. *Journal Of Assisted Reproduction and Genetics.* 2014;31(2):213-20
92. Kolaç, T., Gürbüz, P. ve Yetiş, G., (2017). "Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği ve Antioksidan Özellikleri", İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MeslekYüksekokulu Dergisi, 5(1)

93. Moskuag, J.O., Carlson, H., Myhrstad, M. ve Blomhoff, R., (2004). "Molecular Imaging of the biological effects of Quercetin and Quercetin-richfoods", *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(4): 315-24.
94. Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids:Structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* , 22 (5), 749-760.
95. Ader P, Wessmann A, Wolfram S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med* 2000;28(7):1056–67.
96. Mahesh T, Menon VP. Quercetin allievates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 2004;18(2):123-7.
97. Majid Jafari KhorchaniA, Fatemeh Zal A,B,C and Asma Neisy/ The phytoestrogen, quercetin, in serum, uterus and ovary as a potential treatment for dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary syndrome in the rat. 313-321. doi: 10.1071 / RD19072.
98. A. Hecksteden, M. Wegmann, A. Steffen et al., "Irisin and exercise training in humans – results from a randomized controlled training trial," *BMC Medicine*, vol. 11, no. 1, p. 235, 2013.
99. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):463-8. doi: 10.1038/nature10777. PMID: 22237023; PMCID: PMC3522098.
100. M. Pardo, A. B. Crujeiras, M. Amil et al., "Association of irisin with fat mass, resting energy expenditure, and daily activity in conditions of extreme body mass index," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2014, Article ID 857270, 9 pages, 2014
101. Li M, Yang M, Zhou X, Fang X, Hu W, Zhu W, et al. Elevated circulating levels of irisin and the effect of metformin treatment in women with polycystic

ovary syndrome. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2015;100(4):1485-93. Epub 2015/02/13.

102. Chenggang Li¹, Li Zhou², Yong Xie¹, Chuang Guan², Haifeng Gao . Effect of irisin on endometrial receptivity of rats with polycystic ovary syndrome. 395-400. doi: 10.1080 / 09513590.2018.1529158.

103. Wang C, Zhang XY, Sun Y, Hou XG, Chen L. Higher circulating irisin levels in patients with polycystic ovary syndrome:a meta-analysis. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2018;34(4):290-3. Epub 2017/10/27.

104. M.S. BOSTANCI, N. AKDEMIR, B. CINEMRE, A.S. CEVRIOGLU, S. ÖZDEN, O. ÜNAL. Serum irisin levels in patients with polycystic ovary syndrome. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2015; 19: 4462-4468.

105. Buyalos RP. Insulin-like growth factors: clinical experience in ovarian function. Am J Med. 1995 Jan;98(1A):55S-66S.

106. Yoshimura Y, Iwashita M, Karube M, Oda T, Akiba M, Shiokawa S, et al. Growth hormone stimulates follicular development by stimulating ovarian production of insulin-like growth factor-I. Endocrinology. 1994 Sep;135(3):887–94.

107. Harper K, Proctor M, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization. Cochrane database Syst Rev. 2003;(3):CD000099.

108. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged >40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. Hum Reprod. 2005 Sep;20(9):2536–41.

109. Sandera VA, Haponb MB, Sícroc L, Lombardic VE Jahnb GA, Motta AB. Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. Argentina Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2011; 124: 58–64.

110. Schwartz MW, Seeley RJ. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *New Engl J Med* 1997; 336: 1802-1811
111. Geithovell F. A comment on the European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine consensus of the polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 602-605.
112. Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, et al. "Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis." *Human reproduction update* 19.3 (2013): 268-288.
113. Mahmoud AA, Elfiky AM, Abo-Zeid FS. The anti-androgenic effect of quercetin on hyperandrogenism and ovarian dysfunction induced in a dehydroepiandrosterone rat model of polycystic ovary syndrome. *Steroids*. 2022 Jan;177:108936. doi: 10.1016/j.steroids.2021.108936. Epub 2021 Nov 6. PMID: 34752810.
114. Apparao KB, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, Lessey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod*. 2002 Feb;66(2):297-304. doi: 10.1095/biolreprod66.2.297. PMID: 11804942.
115. Baracat MC, Serafini PC, Simões Rdos S, Maciel GA, Soares JM Jr, Baracat EC. Systematic review of cell adhesion molecules and estrogen receptor expression in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015 Apr;129(1):1-4. doi: 10.1016/j.ijgo.2014.10.022. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25554522.
116. Wei LN, Huang R, Li LL, Fang C, Li Y, Liang XY. Reduced and delayed expression of GDF9 and BMP15 in ovarian tissues from women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Nov;31(11):1483-90. doi: 10.1007/s10815-014-0319-8. Epub 2014 Aug 30. PMID: 25172094; PMCID: PMC4389935.
117. González A, Ramírez-Lorca R, Calatayud C, Mendoza N, Ruiz A, Sáez ME, Morón FJ. Association of genetic markers within the BMP15 gene with

anovulation and infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008 Aug;90(2):447-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.083. Epub 2007 Oct 1. PMID: 17905236.

118. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Mar;87(3):1337-44. doi: 10.1210/jcem.87.3.8316. PMID: 11889206.

119. Bastu E, Zeybek U, Gurel Gurevin E, Yüksel Ozgor B, Celik F, Okumus N, et al. Effects of Irisin and Exercise on Metabolic Parameters and Reproductive Hormone Levels in High-Fat Diet-Induced Obese Female Mice. *Reprod Sci*. 2018;25(2):281-91. Epub 2017/06/09.

120. Pourteymour Fard Tabrizi F, Hajizadeh-Sharafabad F, Vaezi M, Jafari-Vayghan H, Alizadeh M, Maleki V. Quercetin and polycystic ovary syndrome, current evidence and future directions: a systematic review. *J Ovarian Res*. 2020 Jan 31;13(1):11. doi: 10.1186/s13048-020-0616-z. PMID: 32005271; PMCID: PMC6993490.

121. Slot KA, Kastelijn J, Bachelot A, Kelly PA, Binart N, Teerds KJ. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reproduction*. 2006 Mar;131(3):525–32