



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA NEKROPTOZİSİN
ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Cemre ÇELİK CANKORUR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yıldız UYAR

Manisa, 2024



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA NEKROPTOZİSİN
ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Cemre ÇELİK CANKORUR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yıldız UYAR

Manisa, 2024

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen, bilgisi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, hasta yaklaşımını ve her zaman özen gösterdiği deontoloji anlayışını örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Yıldız UYAR' a;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bize aktaran sayın anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Naci Kemal Kuşcu, Prof. Dr. Semra Oruç, Prof. Dr. Tevfik Güvenal, Prof. Dr. Tayfun Özçakır, Prof. Dr. Aslı Göker, Prof. Dr. Burcu Artunç Ülkümen, Prof. Dr. Pınar Solmaz Hasdemir, Dr. Öğr. Gör. Kemal Sarsmaz'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanış aşamasında yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. M. Kemal Özbilgin hocamıza teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, bu zorlu süreci kılınabilir hale getiren Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda görevli asistan arkadaşlarım ve uzmanlığını alıp aramızdan ayrılmış doktor arkadaşlarıma;

Cerrahi tecrübelerini ve bilgilerini bizimle paylaşan zor anlarda yardımımıza koşan yan dal uzmanı abi ve ablalarımıza;

Hayatımın her anında olduğu gibi tez sürecimde de bana en büyük desteği sağlayan birçok fedakarlık ile beni yetiştirip bugünlere getiren biricik annem Nazik Çelik'e ve sevgili babam Satı Çelik'e, en zorlandığım anlarda yapabileceğime inandıran cesaret veren hem meslektaşım hem yol arkadaşım olan kıymetli eşim Osman Orkun Cankorur' a, varlığıyla bana güç veren mesleğimde anne olarak yeni bir pencere açmamı sağlayan canım oğlum Ege'ye hep yanımda oldukları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	7
I. GİRİŞ	9
II. GENEL BİLGİLER	11
2.1. POLİKİSTİK OVER SENDROMU (PKOS)	11
2.1.1. <i>PKOS Tanımı ve Tarihçesi</i>	11
2.1.2. <i>Etiyopatogenez</i>	11
2.1.2.1. Hipotalamo-Hipofizer Disfonksiyon	12
2.1.2.2. Hiperinsülinemi ve İnsülin Direnci	12
2.1.2.3. Aşırı Androjen Üretimi	13
2.1.2.4. Genetik Faktörler	13
2.1.3. <i>Polikistik Over Sendromunda Tanı Kriterleri</i>	14
2.1.3.1. NIH (National Institute of Health) Kriterleri	14
2.1.3.2. Rotterdam Kriterleri	14
2.1.3.3. Androgen Excess Society (AES) Kriterleri	15
2.1.4. <i>Klinik ve Laboratuvar Bulguları</i>	17
2.1.4.1. Menstrüel Düzensizlik ya da Kronik Anovulasyon	17
2.1.4.2. Hiperandrojenizm	18
2.1.4.3. Obezite	19
2.1.4.4. İnfertilite	19
2.1.5. <i>Uzun Dönemde Sağlık Problemleri</i>	20
2.1.5.1. Endometrium kanseri	20
2.1.5.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	21
2.1.5.3. Kardiovasküler Hastalıklar	21
2.1.5.4. Hipertansiyon	21
2.1.6. <i>Tedavi</i>	22
2.1.6.1. PKOS ve İnfertilite Tedavisi	22

2.1.6.1.1.	Diyet ve Egzersiz	23
2.1.6.1.2.	Klomifen sitrat (CC) ile Ovulasyon İndüksiyonu	24
2.1.6.1.3.	Aromataz inhibitörleri ile Ovulasyon İndüksiyonu	25
2.1.6.1.4.	Gonadotropinler ile Ovulasyon İndüksiyonu	25
2.1.6.1.5.	İnositol	26
2.1.6.1.6.	Metformin	27
2.1.6.2.	Cerrahi Tedavi Seçenekleri	27
2.2.	PKOS'TA ENDOMETRİAL DEĞİŞİKLİKLER VE ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE	28
2.2.1.	<i>Polikistik Over Sendromunda Endometrial Değişiklikler</i>	28
2.2.2.	<i>Endometrial Reseptivite</i>	30
2.2.3.	<i>Polikistik Over Sendromunda Endometrial Reseptivite</i>	31
2.3.	HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI	32
2.3.1.	<i>Nekroz</i>	32
2.3.2.	<i>Apoptoz</i>	33
2.3.3.	<i>Otofajiye bağlı hücre ölümü</i>	33
2.3.4.	<i>Parthanatos</i>	33
2.3.5.	<i>Piroptoz</i>	34
2.3.6.	<i>Ferroptoz</i>	34
2.3.7.	<i>Nekroptoz</i>	34
2.4.	NEKROPTOZIS	34
2.4.1.	<i>Nekroptozis Yolları</i>	35
2.4.1.1.	Tümör nekroz faktör reseptörü 1 ve nekroptozis	35
2.4.1.2.	Toll Like Reseptör ve Nekroptozisin Düzenlenmesi	35
2.4.2.	<i>Nekroptozisin İnhibisyonu</i>	37
III.	GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1.	HİSTOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR	39
3.2.	HİSTOKİMYASAL BOYAMA	39
3.3.	İNDİREKT İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA	40
IV.	BULGULAR	41
4.1.	HİSTOKİMYASAL BULGULAR	41
4.2.	İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	43
V.	TARTIŞMA	52
VI.	SONUÇ VE ÖNERİLER	58

VII.	ÖZET	59
VIII.	ABSTRACT	60
IX.	KAYNAKLAR.....	61



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: PKOS Fenotipleri	16
---------------------------------	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Polikistik Overin Laparoskopik Görüntüsü	16
Şekil 2: Polikistik Overin Ultrasonografik Görüntüsü.....	17
Şekil 3: Ferriman-Gallwey Skorlaması.....	18
Şekil 4: Menstrüel Siklus Şeması.....	30
Şekil 5: Nekroptozis mekanizmasının özeti 1[81]	36
Şekil 6: Nekroptozis mekanizmasının özeti 2 [88]	37
Şekil 7: Mikroskopik Görüntü 1 (Hematoksilen Eozin)	42
Şekil 8: Mikroskopik Görüntü 2 (RIPK1).....	43
Şekil 9: Mikroskopik Görüntü 3 (P-RIP-1).....	44
Şekil 10: Mikroskopik Görüntü 4 (RIPK3).....	45
Şekil 11: Mikroskopik Görüntü 5 (P-RIP-3).....	46
Şekil 12: Mikroskopik Görüntü 6 (P62)	47
Şekil 13: Mikroskopik Görüntü 7 (MLKL)	48
Şekil 14: Mikroskopik Görüntü 8 (P-MLKL).....	49
Şekil 15: Mikroskopik Görüntü 9 (HOXA10A)	50
Şekil 16: Mikroskopik Görüntü 10 (LIF).....	51

KISALTMALAR LİSTESİ

PKOS: Polikistik Over Sendromu

AES: Androgen Excess Society

ASRM: American Society for Reproductive Medicine

ESHRE: European Society of Human Reproduction And Embryology

NIH: National Institute of Health

FSH: Folikül Stimulan Hormon

LH: Lüteinize Edici Hormon

Gnrh: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

SHBG: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin

VKİ: Vücut Kitle İndeksi

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

IGFBP-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein-1

TNF-R: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

PPAR: Peroksizom Proliferatör ile Etkinleştirilen Reseptör

DHEA: Dehidroepiandrosteron

DHEAS: Dehidroepiandrosteron-Sülfat

WOI: İmplantasyon Penceresi

HOXA: Homeobox Gen A

LIF: Leukaemia Inhibitory Factor

EMT: Ultrasonografik Endometrial Kalınlık

ERA: Endometrial Reseptivite Analizi

PARP: Poli ADP-Riboz Polimeraz

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotidin

MLKL: Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase

RIPK-1: Reseptörle Etkileşime Giren Serin/Treonin-Protein Kinaz 1

TRADD: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü Tip 1-İlişkili Ölüm Alanı Proteini

TRAF: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü İlişkili Faktör

NOS: Nitrit Oksit Sentaz

PDC: Pürüvat Dehidrogenaz Kompleksi

TLR: Toll Like Reseptör

LPS: Lipopolisakkarit

TRIF/TICAM-1: Toll/IL-1 Reseptör Alanı İçeren Adaptör İndükleyen

IFN-B/TIR Alanı İçeren Adaptör Molekülü 1

I. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkileyen, kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm bulguları ile kendi gösteren bir hastalıktır [1]. PKOS'lu hastaların çoğu hiperinsülinemiye yol açan insulin direnci gösterirler. PKOS'ta insulin direncinin primer nedeni bilinmemekle beraber, insulinin p450c17alfa enzim sistemini indükleyip teka ve adrenal hücrelerden androjen yapımını artırarak PKOS'un kliniğinde rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [2]. İnsülin direnci gelişmesi, PKOS patogenezinde önemli rol oynamaktadır, bu nedenle tedavide önce insülin direncini düşürmek ve sonrasında hormonal kontrolün sağlanması önemlidir. Yapılan çalışmalar, metformin tedavisinin obeziteden bağımsız olarak kandaki glikoz düzeyini dengelediğini ve yüksek androjeni düşürdüğünü göstermektedir [3].

PKOS'lu hastalarda klinik olarak adet düzensizliği, hirsutizm, akne, alopesi, sıklıkla birinci trimester tekrarlayan gebelik kayıpları, infertilite ve obezite görülebilir. Endokrinolojik olarak da androjenler, LH, östrojen ve prolaktin düzeyleri yüksek bulunabilir [4]. PKOS'un subfertilite-infertilite riskini arttırdığı bilinmekle birlikte, hastalığın etiopatogenezi tam olarak aydınlatılamadığı için mevcut tedavi seçenekleri de genellikle semptomatik olarak yapılmaktadır. Polikistik over sendromlu kadınlarda yaklaşık %40 oranında görülen infertilite, sıklıkla oligo/anovulasyon ile ilişkilendirilmektedir [5].

Endometrial reseptivite, endometriyumun embriyo implantasyonunu kabul etme yeteneği olarak tanımlanabilir. Blastokistlerin endometriyuma girişine implantasyon denir. Endometrial reseptivite bir menstrüel siklusta çok kısa bir süre için mevcuttur. Genellikle menstrüel siklusun orta sekresyon fazında meydana gelir [6]. PKOS'un endometriyal hücrelerde, bazı proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek endometriyal gelişim bozukluğu, endometriyal reseptivite azalması ve implantasyon yetersizliğine yol açabileceği gösterilmiş ve bu durum PKOS'lu hastalardaki infertilite ile ilişkilendirilmiştir [7].

Nekroptozis, birçok hastalıkta önemli rol oynayan, genetik olarak düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir. Nekroptozis, temel özellikleri hücre şişmesi ve plazma zarı yırtılması olan düzenlenmiş bir nekrozdur [8].

Biz bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hafsa Sultan Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Jinekoloji ve İnfertilite Polikliniği'ne başvuran PKOS'lu olan ve olmayan hastalardan alınan endometrial dokuda nekroptozis ve endometrial reseptivite belirteçlerinin karşılaştırılmasını amaçladık. Ayrıca, PKOS tedavisinde kullanılan metforminin, nekroptozis ve endometrial reseptivite üzerine olan etkilerini de değerlendirdik. Çalışma kapsamında PKOS patogenezinde ve endometrial reseptivitede nekroptozisin rolünü araştırmayı hedefledik.

Bu amaçla çalışmamızda, hastalardan elde edilen dokularda nekroptozis belirteçleri olan RIPK1, RIP3, P-RIP1, P-RIP3, P-MLKL, MLKL, p62 ve implantasyon belirteçleri olan LIF, HOXA10 proteinleri immünohistokimyasal yöntem ile incelendi.

PKOS'lu hastalarda infertilitenin sebepleri birçok kez araştırılmıştır. Çalışmamızı diğer çalışmalardan ayıran, PKOS'lu hastaların endometriyum dokusundaki nekroptozis belirteçleri ve endometrial reseptiviteye etkisi üzerine yapılan tek çalışma olmasıdır. Bu çalışma ile PKOS'lu hastaların infertilite tedavisinde yeni yöntemler için yol gösterici sonuçlar elde edilmesi amaçlanmaktadır.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromu (PKOS)

2.1.1. PKOS Tanımı ve Tarihçesi

PKOS ilk olarak 1935 yılında Stein ve Leventhal isimli bilim adamları tarafından tanımlanmıştır. Bu iki bilim adamı bir makale yayınlamış ve orada PKOS'u aşırı kıllanma, adet görememe, gebe kalamama, aşırı kilo alma ve diğer bazı belirtilerden oluşan bir sendrom olarak tanımlamışlardır. Aynı zamanda yumurtalıklarda birçok kistik oluşumdan bahsetmişlerdir [9].

Overlerin polikistik görünmesi, polikistik over sendromundan farklıdır. Polikistik over görüntüsü sadece ultrasonografik görüntüde overin periferinde yerleşen 2-8 mm boyutlarında en az 6-8 adet folikülün olmasıdır. Ultrasonografik olarak bu görüntü sağlıklı kadınların %20-25'inde görülebilir. PKOS'ta ise buna endokrinolojik ve metabolik patolojiler eşlik etmektedir [10].

Günümüzde Polikistik Over Sendromu (PKOS), kadınlarda subfertilite-infertilite riskini arttırdığı bilinen ancak etiyolojisi ile ilgili hala bilinmeyenlerin olduğu bir hastalıktır. PKOS, üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkileyen, kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm bulguları ile kendi gösteren bir hastalık olarak tanımlanabilir. PKOS etiyopatogenezi tam olarak bilinmeyen bir hastalık olduğu için mevcut tedavi seçenekleri de genellikle semptomlara yönelik yapılmaktadır. PKOS'lu kadınlarda ortalama %40 oranında görülen infertilitenin çoğunlukla oligo/anovulasyon ile ilgili olduğu düşünülmektedir [11, 12].

2.1.2. Etiyopatogenezi

PKOS'la ilgili birçok deneysel çalışma yapılmıştır fakat halen etiyopatogenezi tam olarak bilinmemektedir. PKOS, birkaç sistemin bozuk çalışmasının sinerjistik etkisi sonucu ortaya çıkan, kompleks bir hastalık olarak düşünülebilir [13].

2.1.2.1. Hipotalamo-Hipofizer Disfonksiyon

PKOS'un patogeneğinde folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lüteinize edici hormon (LH) arasındaki düzensiz regölasyon nedeniyle androjen yapımının fazla olması temel rol oynamaktadır. Gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) aralıklı salınımı hipofizden LH ve FSH salınımına neden olur. LH'ın overdeki teka hücrelerini uyarmasıyla androjen yapımı (özellikle androstenedion) artar. FSH ise granüloza hücrelerini uyarır ve androstenedion'un östron'a dönüşümünü sağlar. PKOS'lu hastalarda ovulasyonu sağlayan temel hormonlar olan FSH ve LH hormonlarının salgıları bozulmuştur. LH, FSH'a göre daha yüksek miktarlarda salgılanmakta böylece teka hücrelerinde androjen yapımı özellikle de androstenedion yapımı artmaktadır. Sonuçta daha fazla androstenedion çevre dokularda testosterona dönüşmektedir [14].

Androstenedion'un östron'a dönüşümü özellikle vücut kitle indeksi artmış kadınlarda fazladır. PKOS'lu kadınlarda dolaşımda artmış testosteron ve insülin karaciğer üzerine direk etki eder ve seks hormon bağlayıcı globülünde (SHBG) azalma olur. Bu da serbest östradiolün ve serbest testosteronun artmasına neden olur. Serbest östradiol, serbest östron ve inhibin B, PKOS'lu kadınlarda FSH'ı baskılar LH'ın ise artmasına neden olur. Bu şekilde döngü devam eder. Uzun vadede devamlı olarak karşılanmamış östrojene maruz kalan endometriumda tip 1 endometrium kanser riski artar. Artan testosteron folikül gelişimini engeller ve prematür atreziyi uyarır. Aynı zamanda kıllanmaya ve anabolizan etki ile kilo artışına neden olur [15].

2.1.2.2. Hiperinsülinemi ve İnsülin Direnci

Kas, yağ ve karaciğerde bulunan hücrelerin, vücuttaki glukoz miktarını düzenleyen insüline karşı doğru cevap veremediği ve kandaki glukozu kullanamadığı duruma insülin direnci denir [16]. Bu durum, beraberinde hiperinsülinemiye de getirir. Vücut kitle indeksi az olan PKOS'lu kadınlarda bile hiperinsülinemi sık görülür [17]. Ancak, VKİ'si yüksek olan kadınlarda insülin

düzeyleri daha yüksek; LH, SHBG ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-1) daha düşüktür [18].

Hiperinsülinemi ile hiperandrojenizm birbiri ile bağlantılıdır. Bu mekanizma şu şekilde açıklanabilir; insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) reseptörleri ve insülin reseptörleri aynı yapıdadır. IGF-1'in teka hücrelerinden LH'a karşı androjen cevabını artırıcı etkisi mevcuttur. Artmış insülin IGF-1 reseptörlerini aktive ederek androjen sentezini artırır. Artan insülin, karaciğerden SHBG sentezini baskılar ve dolaşan serbest östrojen ve androjen artar [19]. Artan insülin; karaciğeri etkileyerek IGFBP-1 sentezini baskılar ve dolaşımdaki IGF-1'i artırır böylece teka hücrelerinin LH'a karşı androjen cevabı artar. İnsülin direnci uzun süre tolere edilemediğinde, glukoz intoleransı gelişir ve bu durum ilerleyen aşamalarda tip-2 diyabete dönüşür [20].

2.1.2.3. Aşırı Androjen Üretimi

Artan insülin, LH artışı ile teka hücrelerinden androjen artmasına neden olur [21].

2.1.2.4. Genetik Faktörler

Androjen ve insülin sentezini etkileyen gen mutasyonlarının her iki cinsiyetten de aktarıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu az sayıda anahtar genin çok sayıda çevresel faktör ile etkileşerek gizli kalmış PKOS kliniğini oluşturduğu gösterilmiştir [22]. Pankreas β -hücresinin az çalışmasının genetik geçişli olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. PKOS gelişimde rol aldığı düşünülen genler sitokrom P450c-17 α enzimini kodlayan CYP17A (sitokrom P450, aile 17, alt aile A) geni, P450 yan zincir kırılma enzimini kodlayan CYP11A (sitokrom P450, aile 11, alt aile A) geni ve insülin genidir. PKOS bulunan kadınların annelerinde dislipidemi, yüksek androjen ve insülin direncinin serum markerleri saptanmıştır. Tümör nekroz faktör reseptörü (TNF-R) ve peroksizom proliferatör aktivite edilen reseptör gama (PPAR) genlerindeki polimorfizmler PKOS ile ilişkilendirilmektedirler.

Bunlara ek olarak yapılan mikro dizin çalışmalarında PKOS'lu teka hücreleri ile normal teka hücreleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre aldehit dehidrogenaz 6, retinol dehidrogenaz 2 ve transkripsiyon faktörü GATA6 (GATA bağlayıcı protein 6) genlerinin ifadelerinin PKOS'lu teka hücrelerinde anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir [23].

2.1.3. Polikistik Over Sendromunda Tanı Kriterleri

PKOS tanısı koyarken, 2003 yılında Rotterdam'da ESHRE/ASRM konferansında kararlaştırılan kriterler ya da 2006 da AE-PCOS (Androjen Fazlalığı ve Polikistik Over Sendromu Topluluğu) konferansında kararlaştırılan kriterler kullanılmaktadır [24]. PKOS tanısı altta yatan diğer metabolik ve endokrinolojik nedenler dışlandıktan sonra koyulmaktadır [25]. 2012'de NIH, PCOS için 2003 Rotterdam kriterlerini onayladı. 2012'de toplanan NIH uzlaş panelinde ise PKOS'u sınıflandırmak için fenotipik yaklaşım önerilmiştir. A tipi en şiddetli fenotiptir ve D en az şiddetli fenotiptir. A ve C tipleri en yaygın fenotiplerdir (Tablo 1) [26]. PKOS tanısı için oluşturulmuş tüm kriterler alt başlıklarda detaylı açıklanmıştır.

2.1.3.1. NIH (National Institute of Health) Kriterleri

1990 yılında tanımlanmış olan bu kriterler şu şekildedir;

- 1- Majör olarak kronik anovulasyon olması,
- 2- Klinik ve/veya biyokimyasal olarak hiperandrojenizm bulguları olması,
- 3- Diğer etiyolojik nedenlerin (cushing sendromu, konjenital adrenal hiperplazi (KAH) vb.) dışlanması, gereklidir.

2.1.3.2. Rotterdam Kriterleri

2003 yılında Hollanda'nın Rotterdam şehrinde NIH tanı kriterleri incelenmiş, ESHRE ve ASRM tarafından fikir birliği sağlanmıştır. Varılan karar etiyolojik nedenler dışlandıktan sonra PKOS tanısının aşağıdaki üç kriterden en az ikisinin birlikteliği ile koyulmasıdır. Bunlar;

- 1- Oligo ya da anovulasyon olması,
- 2- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları olması,
- 3- Overlerin polikistik görünümde olması ve diğer etiyolojik nedenlerin dışlanmasıdır.

Tipik olarak PKOS'ta ultrasonografide overlerde 2-9 mm çaplarında 10-12 adet periferik-kortikal yerleşimli kistler vardır. Ayrıca overin stromasında ödem, hacim artışı (>10 ml), doku ekojenitesinde artış da saptanır (Şekil 1 ve 2) [27].

2.1.3.3. Androgen Excess Society (AES) Kriterleri

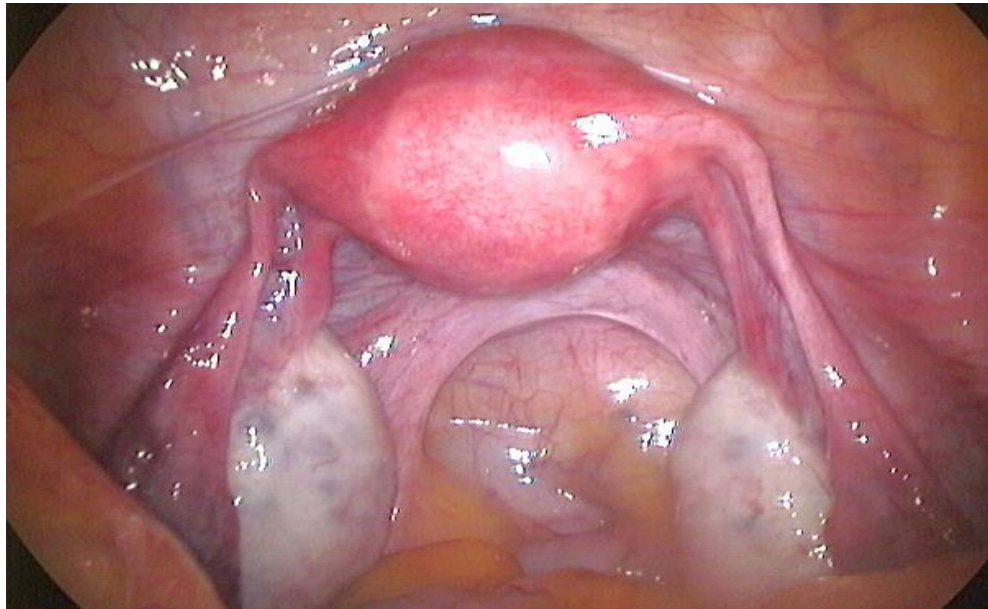
2006 yılında PKOS tanı kriterleri için Androgen Excess Society (AES) tarafından düzenleme önerilmiştir. Bunlar diğer kriterlerde olduğu gibi başka etiyolojik nedenlerin dışlanmasından sonra (KAH, adrenal tümör, cushing sendromu, vb.);

- 1- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları olması
- 2- Ovaryan disfonksiyon (oligo/anovulasyon ve/veya polikistik overlerin) olması yeterlidir.

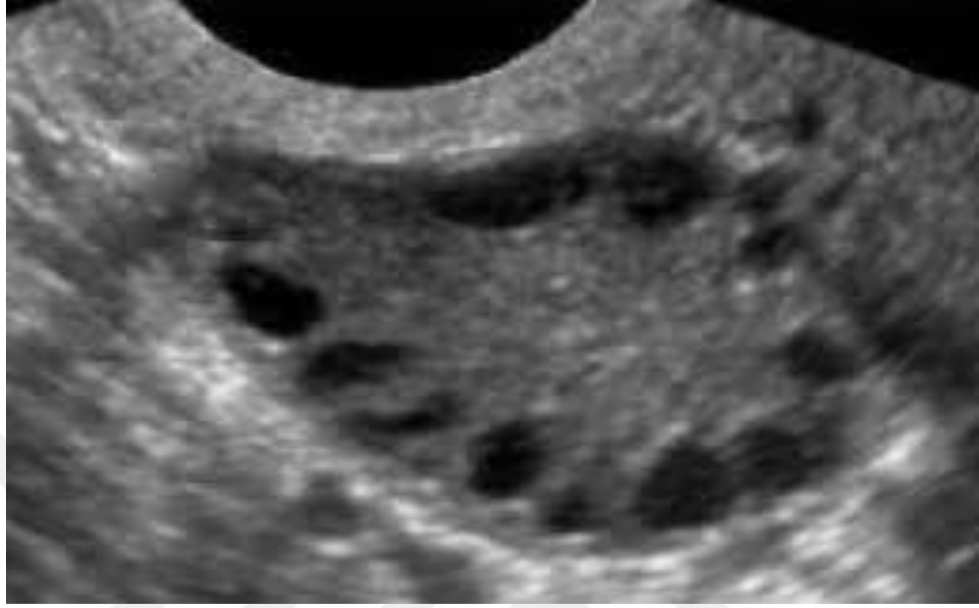
AES kriterleri, PKOS' un diğer klinik veya biyokimyasal özelliklerini göstermeyen, fakat ultrasonografide izole polikistik over bulguları gösteren, hiperandrojenizm ve hiperinsülinemili hastalardan oluşan farklı bir grubu tanımlamışlardır. AES androjen fazlalığının olduğu kriterleri öne çıkarmıştır. Bu tanımlama ile PKOS tanılı kadınlarda infertilite ,diyabet , kalp damar hastalıkları, lipid bozuklukları ve rahim kanseri risklerinin önemsenmesi gerektiği öne sürülmüştür [27].

Tablo 1: PKOS Fenotipleri

PKOS fenotipleri	Klinik Özellikleri
Fenotip A (Klasik Tip)	Hiperandrojenizm + Ovulatuvar Disfonksiyon + Polikistik Over Morfolojisi (PKOM)
Fenotip B (PKOM Olmayan Tip)	Hiperandrojenizm + Ovulatuvar Disfonksiyon + Normal Over Görünümü
Fenotip C (Ovulatuvar PKOS)	Hiperandrojenizm + PKOM
Fenotip D (Normoandrojenik PKOS)	Ovulatuvar Disfonksiyon + PKOM



Şekil 1: Polikistik Overin Laparoskopik Görüntüsü



Şekil 2: Polikistik Overin Ultrasonografik Görüntüsü

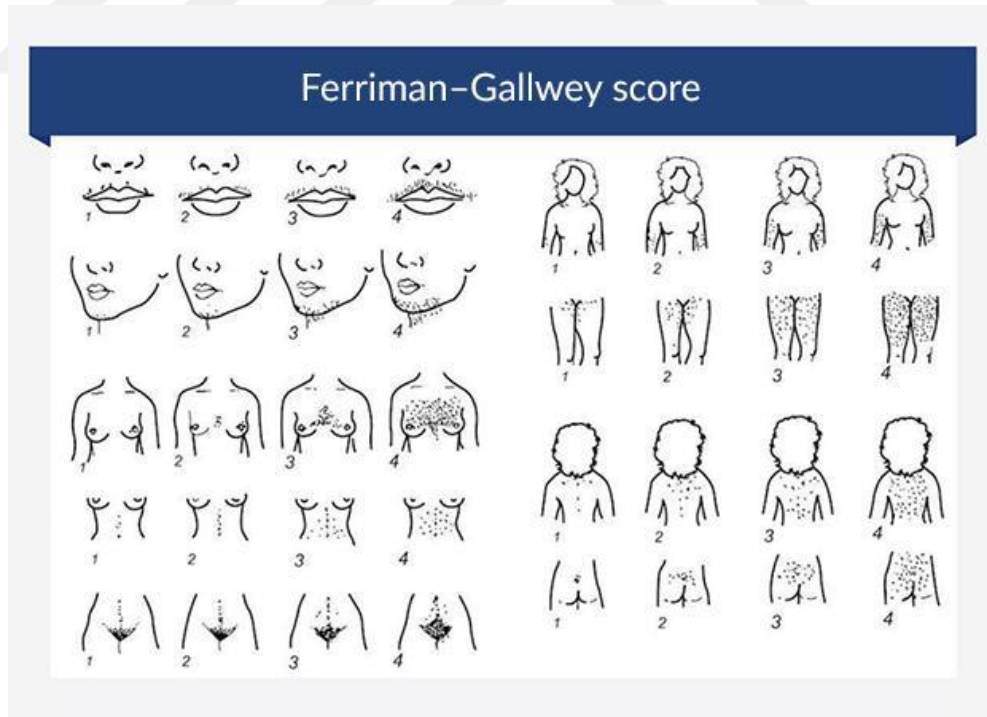
2.1.4. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

2.1.4.1. Menstrüel Düzensizlik ya da Kronik Anovulasyon

Foliküler gelişim esnasında, primordial foliküller büyüyen bir folikül grubuna dahil edilir. İçlerinden bir antral folikül yumurtlamak üzere seçilir. Bu olaylar birbiri ile bağlantılı şekilde ilerler. PKOS'ta overler; hiperandrojenizm, insülinin artması (insülin direnci), over içi parakrin sinyallemenin değişmesi ile foliküllerin gelişmesini bozar. Bunun sonucunda, PKOS'ta foliküller durur ve menstrüel düzensizlik, anovulasyon, overlerin çevresinde minik çok sayıda antral folikül birikmesi meydana gelir. Tipik polikistik over görünümü oluşur [28, 29].

2.1.4.2. Hiperandrojenizm

Testosteron, temel olarak overden salınan bir hormon iken DHEA ve DHEAS ise adrenal bezlerden salınan hormonlardır. PKOS'ta bu hormonların öncülü olan androstenedion düzeyi de artar [30]. Hiperandrojenizm klinik olarak PKOS'lu kadınların %70-80'inde hirsutizm şeklinde görülür [31]. Hirsutizm sınıflaması, genellikle Ferriman-Gallwey (FG) puanı kullanılarak yapılır (Şekil 3). Bu sistem, vücudun belirli bölgelerinde (yüz, göğüs, karın, sırt vb.) kıllanma derecesini değerlendirir. Akne, erkek tipi kellik, kilo alımı, menstrüel düzensizlikler PKOS'ta hiperandrojenizmin diğer klinik yansımalarıdır [4].



Şekil 3: Ferriman-Gallwey Skorlaması

2.1.4.3. Obezite

İnsülin, kandaki glukoz düzeyini karaciğer ve kas dokudan glukozun geçişini indükleyerek düzenleyen pankreas tarafından salınan bir hormondur. PKOS'lu hastalarda kas ve karaciğer dokuları insüline olan duyarlılıklarını kaybetmiş olabilir. Bu durumun etiyolojisi net açıklanamamıştır. Kandaki insülin seviyesi glukozu dengelemek için artar bu durum da overlerden androjen (testosteron) üretimine ve karaciğerden SHBG üretiminin azalmasına neden olur. Bunun sonucunda dolaşımdaki serbest androjenler artar, hirsutizm ve sivilcelenme meydana gelir [32].

Serbest östradiol, serbest östron ve inhibin-B PKOS'lu kadınlarda FSH'ı baskılar LH'nin ise artmasına neden olur. Bu şekilde döngü devam eder. Artan testosteron folikül gelişimini engeller ve prematür atreziyi uyarır. Aynı zamanda kıllanmaya ve anabolizan etki ile kilo artışına neden olur [13]. PKOS'lu hastalarda obezite arttıkça ovulasyon sorunu artmaktadır. Ovulasyon sorunundaki artış kilo vermeyi zorlaştırır. PKOS'lu kadınlarda obezitenin bir sebebi olarak yağ hücrelerinden salınan Leptin hormon seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir. PKOS'lu kadınlarda obeziteye neden olan başka bir neden ise glukoz intoleransı ve insülin direncidir. PKOS'lu obez kadınlarda hirsutizm ve anovulasyon daha sık görülmektedir. Yapılan çalışmalarda; obez olan PKOS'lu kadınlarda normal kilodaki PKOS'lu kadınlara göre infertilite oranı %40 daha fazla bulunmuştur [33].

2.1.4.4. İnfertilite

Polikistik over sendromunun kadınlarda subfertilite-infertilite riskini arttırdığı bilinmektedir. Fakat PKOS etiyopatogenezi tam olarak bilinmediği için tedavide genel yaklaşım, semptomaya yönelik tedavi uygulamak şeklindedir. PKOS'lu kadınlarda ortalama %40 oranında görülen infertilite, çoğunlukla oligo/anovulasyon ile ilgili olarak düşünülmektedir [11, 12].

PKOS'lu hastaların %67 sinde spontan gebelikler oluşabilir. Subfertil ve infertil PKOS'lu hastalarda, yaş ve hormonal düzeylere bağlı olarak ovulasyon indüksiyon tedavileri ve yardımcı üreme teknikleri ile gebelikler oluşturulabilse de spontan abortus, ektopik gebelik ve preterm doğum oranlarının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu gebelik komplikasyonlarının hiperandrojenizm, hiperinsülinemi, insülin rezistansı ve endometriyal değişikliklerle ilişkili olduğu saptanmıştır [34, 35]. PKOS'lu donörün bağışladığı oositlerin, alıcılardaki implantasyon oranını etkilemediğini gösteren çalışmalar vardır. Ancak hiperandrojenemi, insülin direnci veya kronik inflamasyonun olumsuz etkileri, PKOS hastalarında endometrial reseptiviteyi etkileyen moleküler veya biyokimyasal zincirin bozulması gibi anormallikler endometriyal büyümeyi, desidualizasyon sürecini ve plasantasyonu engelleyerek gebelik komplikasyonlarına neden olabilir [36].

2.1.5. Uzun Dönemde Sağlık Problemleri

2.1.5.1. Endometrium kanseri

Endometrium kanseri prevalansı giderek artan ve gelişmiş ülkelerde en sık görülen jinekolojik kanserdir [37]. Endometrial kanser için en önemli risk faktörü, karşılanmamış östrojendir. Obezite, diyabet, erken menarş yaşı, nulliparite, geç yaşta menopoz, ileri yaş (≥ 55 yaş) ve tamoksifen kullanımı gibi durumlarda ve PKOS'ta endometrium kanser riski artmıştır [38].

PKOS ile ilişkilendirilen durumlardan biri olan uzun süreli yumurtlamanın olmaması durumu, progesteron salgılanmaması ve yüksek östrojen düzeyi sebebiyle endometrium kanseri açısından riski artırmaktadır. Aynı zamanda karşılanmamış östrojen nedeniyle oluşan endometrial kalınlaşma da PKOS'lu kadınlarda kanser riskini artırır. Yine PKOS ile birlikte görülebilen obezite, tip 2 diyabet, hipertansiyon gibi durumlar da endometrium kanserinin oluşmasında bilinen faktörlerdir [38].

2.1.5.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 Diabetes Mellitus, genellikle 40 yaş üstünde görülen pankreasın yeterli insülin salgılayamaması veya salgılanan insülinin yeterli derecede kullanılamaması nedeniyle kan şekerinin yükselmesi durumudur [39]. PKOS'lu kadınlarda çeşitli morfolojik veya biyokimyasal etkenlerle over morfolojisi bozularak androjen salgılanmaktadır. Ovaryan hiperandrojenizmi olan hastaların yaklaşık %50'sinde insülin direnci ve glukoz intoleransı saptanmıştır. Overlerde bulunan insülin ve IGF-1 için reseptörler aynı yapıdadır. Artan insülin; karaciğeri etkileyerek IGFBP-1 sentezini baskılar ve dolaşımdaki IGF-1'i artırır böylece teka hücrelerinin LH'a karşı androjen cevabı artar. İnsülin direncini bir süre sonra vücudun tolere edememesi glukoz intoleransına sonrasında da tip-2 diyabete dönüşür [40]. Aynı zamanda artan glukoz tüm hücreleri etkilediği gibi pankreastaki beta hücrelerini de etkiler ve oluşan zararlar beta hücrelerinde daha az insülin üretimi olur. Bu nedenle PKOS'lu kadınlarda tip 2 diyabet oluşma riski çok yüksektir. PKOS'lu kadınların %35-40'ında ilerleyen dönemde tip 2 diyabet oluşur [41].

2.1.5.3. Kardiovasküler Hastalıklar

PKOS'lu hastalarda artan insülin direnci kanda lipitlerin yükselmesine neden olur. Triglicerit ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oranında artış, yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) oranında ise azalma meydana gelmektedir. Aynı zamanda serum plazminojen aktivatörü inhibitör-I (PAI-1) konsantrasyonları da yükselir ve fibrinolizin bozulmasına neden olabilir. Dolayısıyla değişen lipit profili damar dokusunu etkileyerek koroner kalp hastalığına bağlı değişikliklere yol açabilir. Bu da hastalarda ateroskleroz ve beraberinde hipertansiyon kalp krizi, inme gibi riskleri getirmektedir [41].

2.1.5.4. Hipertansiyon

PKOS'ta meydana gelen dislipidemi, obezite, insülin direnci, artmış proinflatuar sitokinler kardiovasküler hastalıklar ve hipertansiyon ile

ilişkilendirilmiştir [42]. PKOS'ta genç hastaların kan basıncı genellikle normal iken yapılan takiplerde gün içinde bazen yüksekliklerin olduğu saptanmıştır. Bu ilerleyen dönemde hipertansiyon olabileceğini düşündürmektedir[43]. Menopoz dönemindeki PKOS hastalarında da sağlıklı bireylere göre hipertansiyon prevalansının 2,5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir [44]. Genele bakıldığında PKOS'lu kadınlarda; aterosklerotik durumlar, hipertansiyon ve miyokard enfarktüsü gibi risklerin diğer kadınlara göre daha erken yaşta mevcut olduğu görülmektedir [45]. PKOS'lu obez kadınların gebelik döneminde de preeklampsi görülme sıklığı genel popülasyona göre 4 kat daha fazladır [46].

2.1.6. Tedavi

PKOS'ta tedavinin temel amacı; androjen fazlalığına bağlı semptomların azaltılması, adet döngüsü düzensizliklerinin tedavisi ve infertilite tedavisi şeklinde olmaktadır [47]. Her kadında ortaya çıkan semptomlar ve semptomların şiddeti farklılık göstermektedir. Bu nedenle tedavi yöntemleri her hastaya göre ayrı ayrı belirlenmelidir. Standart bir tedavi protokolü yoktur.

PKOS hastalarının yaklaşık yarısı obezite sorunu yaşadığı için kilo vermek; uzun dönemdeki sağlık riskleri düşünüldüğünde yaşam tarzı değişikliği yapmak over fonksiyonlarını düzenlemek açısından son derece önemlidir [48]. İnsülin duyarlılığını artırmaya yarayan metformin kullanımı, menstrüel siklusun düzenlenmesini sağlayan, akne ve hirsutizm şikayetlerini azaltan oral kontraseptif kullanımı ve düşük dozlu anti-androjen ilaçlar da PKOS tedavisinde kullanılan yöntemlerdir [15].

2.1.6.1. PKOS ve İnfertilite Tedavisi

PKOS hastalarında artmış androjene bağlı folikülogenezde duraksama olur bu da daha fazla androjen salgılanmasına sebep olur ve kısır döngü oluşur. Bu bulguların yanı sıra hiperinsülinemi, teka hücrelerinde hiperplazi yaratarak ve SHBG'yi azaltarak dolaşan serbest testosteron ve estradiol seviyesini artırır.

İnfertil hastaların tedavisindeki temel amaç androjen seviyelerini düşürerek ovulasyonu sağlamaktır. PKOS'lu infertil hastalarda ovulasyon indüksiyonuna başlamadan önce infertilite araştırması için yapılan tüm testler yapılmış olmalıdır. Öncelikle kilo vermek ve egzersiz önerilmelidir. Yaşam tarzı değişikliği yapılmalıdır. Bu tedbirler sonucunda ovulasyon hala meydana gelmiyor ise ovulasyon indüksiyonu ile doğal fizyoloji sağlanmaya çalışılır. Amaç tek bir dominant folikül oluşturmaktır [48].

Kim ve ark.; 2000 yılında PKOS hastalarında infertilite tedavisi için bir algoritma oluşturmuşlardır. Bu tedavi algoritmasında; obezite ve artmış VKİ varlığında öncelikle kilo verilmesi önerilmektedir. Sonrasında kullanılabilecek tedaviler ise; klomifen sitrat ile ovulasyon indüksiyonu, aromataz inhibitörleri ile ovulasyon indüksiyonu, insülin duyarlaştırıcı ajanların tek ya da klomifen sitrat ile kullanımı, gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu, insülin duyarlaştırıcı ajan ve gonadotropin ile ovulasyon indüksiyonu, ovaryan cerrahi, in vitro fertilizasyon (IVF) olarak sayılabilir [49].

2.1.6.1.1. Diyet ve Egzersiz

PKOS hastalarında obezite sık görülen bir durumdur. Obezite denetimi ile ilgili tüm rehberler, obezite ilişkili risk faktörlerinin azaltılması için uzun dönemde %5-10'luk bir ağırlık kaybını önermektedir [50] . Uzun dönemde ağırlık kaybı hedefinin %10-20 olması, ulaşılan ağırlığı sürdürmek ve kadınlar için bel çevresinin <88 cm olmasını sağlamak hedeflenmelidir [51].

PKOS'ta diyet kısa dönemde semptomları ve fertilitiyi düzeltebilen, uzun dönemde ise tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanserleri önleyebilen önemli ve etkili bir ilk adım tedavisidir. Obez PKOS'lu kadınlarda kilo kaybı ile; abdominal yağ, hiperandrojenizm, insülin direnci azalır; menstrüel siklus düzelir, infertilite, diyabet ve kardiyovasküler hastalık riski azalır [52].

PKOS'lu kadınlarda diyet; düşük kalorili, düşük glisemik indeksli, doymuş ve trans yağ asitlerinden fakir, yüksek lif içeren gıdalardan oluşmalıdır. Vücut

ağırlığında nispeten %5'lik bir azalma bile PKOS semptomlarının iyileşmesi açısından önem taşır [52]. Diyet tek başına etkili olsa da egzersizle birlikte uygulanması ovulasyona yardımcı olabilir ve insülin direncini azaltır. Ancak egzersizin ne kadar süre yapılacağı ve ne tipte olacağı hakkında net bir görüş yoktur [48].

2.1.6.1.2. Klomifen sitrat (CC) ile Ovulasyon İndüksiyonu

Klomifen sitrat, nonsteroid yapıda selektif östrojen bir reseptör modülatörüdür. Hipotalamustaki östrojen reseptörlerine bağlanır. Reseptör modülatörü olduğu için bazı dokularda anti östrojenik etki gösterirken, bazılarında ise östrojenik etki gösterir. Bu durum bazen istenmeyen etkiler oluşturabilir. Klomifen sitrat, etkisini östrojen reseptörlerini bloke ederek gösterir. Yapısal benzerliğinden dolayı vücuttaki tüm östrojen reseptörlerine bağlanır. Böylece nükleustaki östrojen reseptörleri seviyesinde endojen östrojenlerle yarışarak östrojen etkisini engeller. Bu engelleme, hipotalamus–hipofiz sisteminde olduğunda östrojenin negatif feedback etkisi ortadan kalkacağından hipofizden FSH ve LH salınımı artar. Normal bir kadına CC verildiğinde gonadotropin salınım sıklığı artar ama salınım amplitüdları değişmez oysa PKOS olan bir hastaya verildiğinde gonadotropin salınımının hem sıklığı hem de amplitüdünün arttığı gösterilmiştir [53]. Birleşik Krallık'ta ve Birleşik Amerika'da CC; PKOS hastalarında ilk sırada tercih edilen ve en fazla 6 ay kullanılması gereken ilaç olarak kabul edilmiştir [54].

Adetin 2-5.günlerinde 50-150 mg/gün başlanır, 5 gün boyunca kullanılır. İlaç dozu, 1-2 dominant folikül elde edilene kadar yavaşça artırılır. Trans vajinal ultrasonografi ve serum östrojen düzeyleri ile takip edilir. Siklus başına gebe kalma olasılığı yaklaşık olarak %15 tir [48]. CC tedavisine dirençli hastalarda alternatif olarak; yüksek doz CC (200-250mg/gün) uzun süre(7-8 gün) ya da insülin duyarlaştırıcı ajanlar kullanılabilir [55].

2.1.6.1.3. Aromataz inhibitörleri ile Ovulasyon İndüksiyonu

Aromataz inhibitörleri; CC dirençli, CC başarısızlığı olan ya da CC tedavisinde ince endometriumu olan anovulatuvar hastalar için alternatif ovulasyon indüksiyon ajanı olarak kullanılır.

Aromataz, östrojen sentezinin son basamağında yer alan androjenleri östrojene çeviren p 450 bağımlı bir enzimdir. Aromataz inhibitörleri bu enzimi inhibe ederek östrojen salınımını azaltır dolayısıyla östrojenin negatif feedback etkisini ortadan kaldırır, GnRH salınımını artırır böylece hipofizden gonadotropin salınımı artar. Artmış gonadotropinler folikül büyümesini uyarır [62]. Periferde CC gibi anti östrojenik etki yapmadığı için endometrium ve servikal mukus üzerine negatif etkileri bulunmaz. Ayrıca yarı ömrü CC dan daha kısadır bu da etkisinin geç foliküler fazda devam etmemesini sağlar. Bu amaçla en yaygın kullanılan ajan Letrozol'dür. Henüz FDA onayı yoktur. Kullanımı adet 3-7.günleri arasında 2,5-5 mg/gün veya 3. günde 20 mg tek doz şeklindedir [56].

PKOS'lu anovulatuvar hastalarda klomifen sitrat ve letrozolün karşılaştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bir Cochrane analizinde canlı doğum ve gebelik oranlarının letrozol grubunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir [57]. Yapılan son çalışmalarda letrozol'ün klomifen sitrata göre canlı doğum oranlarının daha yüksek ve ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) riskinin daha düşük olması üzerine PKOS'lu anovulatuvar hastalarda ilk seçenek olarak kullanılabileceği görüşü yaygınlaşmıştır [58].

2.1.6.1.4. Gonadotropinler ile Ovulasyon İndüksiyonu

Gonadotropinler, oral tedavilere cevap vermeyen infertil hastalarda kullanılan bir ajandır. Bu ilaçları kullanırken çok sayıda folikül gelişimi ve OHSS gelişme riski açısından dikkatli olunmalıdır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki

çoğul gebelik ve OHSS riski; kullanılan preparattan çok kullanılan doz ve protokolle ilişkilidir [55].

Genellikle en düşük doz olan 75 IU ile başlanır, hatta bazı PKOS olgularında daha düşük dozlarda kullanılabilir. Düşük dozlara rağmen çoğul gebelik riski fazladır. Bunun önüne geçebilmek için mutlaka yakın trans vajinal ultrasonografi yapılmalı ve laboratuvar değerleri sık bakılmalıdır. 2 ve üzerinde folikül gelişiminde tedavi sonlandırılmalı veya IVF tedavisine geçilmelidir [48].

Tedavi için genellikle 7-12 günlük süre yeterlidir. Tedavinin 4-5. günlerinde ultrasonografi ile folikül gelişimine bakılır. Duruma göre, 1-3 günlük aralar ile tedaviye devam edilir. Aynı zamanda bakılan estradiol düzeyi de folikül matürasyonu takibinde yararlıdır. Matür folikül çapı 16-18mm büyüklüğüne ulaştığında eksojen HCG veya agonist ile ovulasyon tetiklemesi yapılır [59]. Sonrasında 24-48 saat aralığında intrauterin inseminasyon (IUI) uygulanabilir. IUI sikluslarında luteal faz desteği olarak progesteron kullanılır fakat yapılan çalışmalarda gebelik oranlarını artıracığına yönelik bir kanıt henüz bulunmamıştır [60].

2.1.6.1.5. İnositol

İnositol, B8 vitamini olarak adlandırılan ve bağırsak bakterileri tarafından sentezlenen bir vitamindir. Hormon profili ve oosit kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir [61]. İnositol denildiğinde genellikle en yaygın formu olan Myoinositol'den bahsedilir. Yapılan çalışmalara göre folikül sıvısında fazla saptanması iyi kalite embriyo ile ilişkilendirilmiştir [55]. Oosit üzerindeki bu olumlu etkisi PKOS hastalarında da gösterilmiştir. Özellikle IVF tedavisi alacak PKOS hastalarında 3 ay önce başlanan folik asit ve myoinositol takviyesi daha kaliteli yumurtalar toplanmasını sağlamıştır. Fakat bu implantasyon ve gebelik oranlarında fark yaratmamıştır [62]. İnositol halen üzerinde çalışmaların yapıldığı oosit olgunlaşmasında olumlu etkileri olduğu gösterilmiş umut vadeci bir takviye ajandır [55].

2.1.6.1.6. Metformin

PKOS hastalarının birçoğunda altta yatan sebep insülin direnci olduğu için, insülin duyarlaştırıcı ajanların kullanılması tedavide büyük önem taşır. Metformin (dimetilbiguanid) bu ajanların içinde en sık kullanılanıdır. Hepatik glukoneogenezi inhibe ederek kas hücrelerinin glukoz ihtiyacına yönelik insülin hassasiyetini artırır. Böylece insülin direnci azaldığı için daha az insülin salınmış olur. Özellikle PKOS hastalarında anovulasyon gelişiminde insülin direnci rol aldığı için kullanılması faydalıdır [62].

Metformin tek başına kullanılabildiği gibi CC ile birlikte de kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda tek başına ya birlikte kullanımının canlı bebek doğum oranlarını değiştirmediği ancak metformin kullanımı ile daha az hiperstimülasyon görüldüğü ve daha fazla klinik gebelik görüldüğü saptanmıştır [63].

Metforminin önerilen dozu yemeklerle beraber 1500-2000mg/gün dür. Bulantı kusma şişkinlik diyare gibi yan etkilere yol açabileceği için dozu yavaşça artırılır. İlk dört gün 500 mg/gün sonraki dört gün 2*500mg ve en son 3*500mg geçilerek hedeflenen doza ulaşılır [62].

PKOS'ta erken gebelik kayıpları sık görülen bir durumdur. Gebeliklerin %50'ye yakınının ilk 3 ayda abortus ile sonlandığı tahmin edilmektedir. Genetik faktörler ve insülin yüksekliğinin buna neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle metformin tedavisi erken gebelik kayıplarını önlemede kabul görmektedir ancak klinisyen kararına bırakılmaktadır [24].

2.1.6.2. Cerrahi Tedavi Seçenekleri

PKOS hastalarında medikal tedavilerin yeterli ya da uygun olmadığı durumlarda cerrahi tedavi kullanılabilir. Ovaryan Drilling ve Wedge rezeksiyonu bu amaçla kullanılan cerrahi tekniklerdir. Wedge rezeksiyon sırasında kanama ve adezyon gibi komplikasyon riski nedeni ile Ovaryan Drilling yapılması gerektiği düşünülmüştür [64]. Bu işlemde hedeflenen androjen üreten dokuların koter veya lazer ile yakılarak 4-10 delik açılması ile androjen ve östrojen

seviyelerinin azaltılmasıdır. İşlem sonrası elde edilen spontan ovulasyon ve gebelik oranlarının daha fazla olması ya da sonrasında uygulanan ovulasyon indüksiyonunun daha komplikasyonsuz olması bu yöntemin olumlu taraflarıdır. Girişimsel bir işlem olması ve komplikasyon riski ise negatif yönleridir. Bu yüzden işlemin yapılacağı hastalar iyi seçilmelidir [55].

2.2. PKOS'ta Endometrial Değişiklikler ve Endometrial Reseptivite

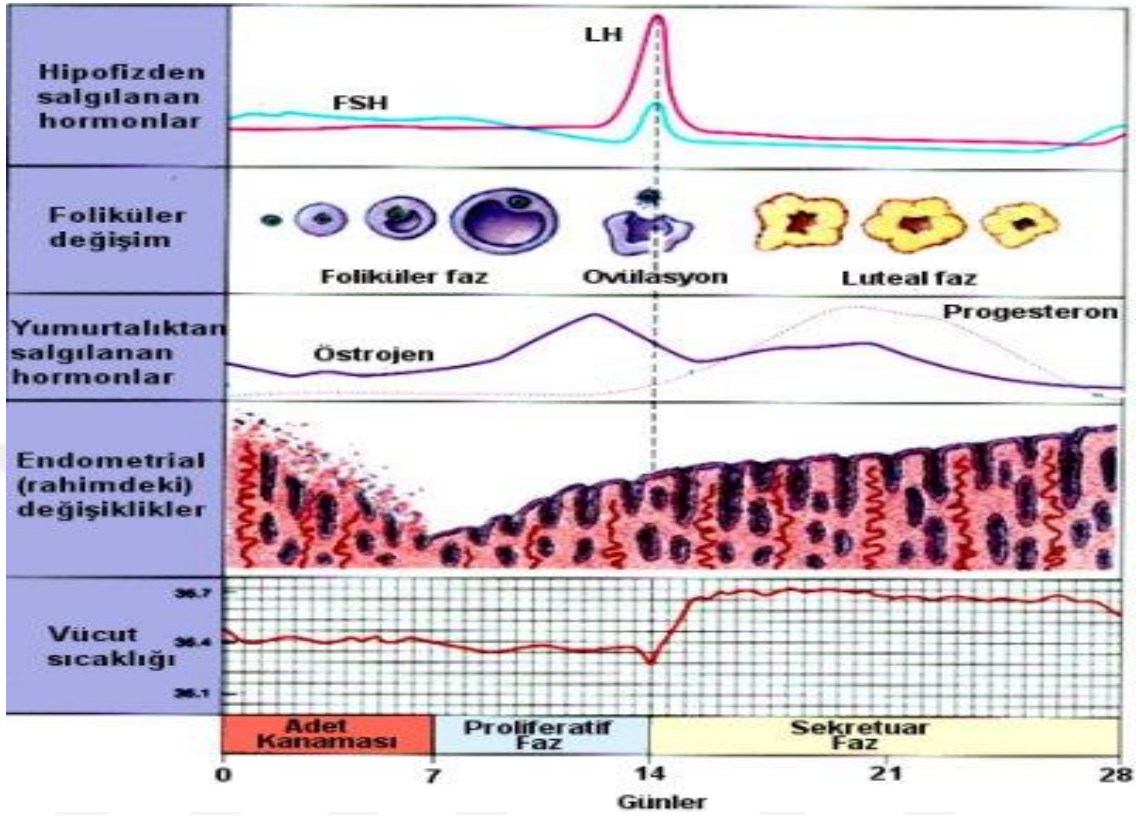
2.2.1. Polikistik Over Sendromunda Endometrial Değişiklikler

Endometrium, steroid hormonların etkisiyle menstrüel siklus boyunca çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişiklikler geçirir. Bu değişiklikler hem endometrial bezlerde hem de bu bezleri çevreleyen stromal dokularda ve spiral arteriollerde gözlemlenebilir. Endometrium temelde östrojen ve progesteron etkisiyle proliferasyon, sekresyon, dejenerasyon (menstruasyon ile sonlanır) ve rejenerasyon süreçlerinden geçmektedir [65]. Endometrium iki alt tabakadan oluşur. Bunlar; miyometrium üzerinde uzanan bazal tabaka ve uterus lümenine bakan fonksiyonel tabakadır. Reprodüktif dönemde ortalama 28 günde bir tekrarlanan menstrüel siklus boyunca bazal tabakada belirgin bir değişiklik olmazken, fonksiyonel tabaka her defasında kalınlaşıp menstrüel kanamayla döküldükten sonra tekrar rejenere olur. Her siklusun sekresyon fazında, fonksiyonel tabakada belirgin iki tabakalanma görülür. Uterus lümenine açılan endometrial bezlerin ağızlarını ve bunların arasını dolduran yoğun stromal dokuyu içeren ince yüzeyel tabaka stratum kompaktumdur. Bunun altında ise çok sayıda kıvrıntılı bezleri ve bezlerin arasını dolduran interstisyel dokuyu içeren stratum spongiosum bulunur [66].

Fonksiyonel tabakadaki glandüler ve stromal hücreler östrojenin etkisi altında, menstrüasyondan sonra hızla çoğalmaya başlar. Bu döneme proliferatif faz denir ve overlerdeki foliküler faza karşılık gelir. Bu faz ilerledikçe, bezler daha kıvrımlı hale gelir. Bezlerin lümenini döşeyen glandüler hücrelerde sitoplazmik glikojen birikimi gözlenir. Stroma daha yoğundur. Endometrium kalınlığı, lüteinleştirici hormon (LH) piki sırasında yaklaşık 12 mm'ye ulaşır

sonrasında belirgin artış olmaz. Endometriyum, menstrüel siklusun ortasında gerçekleşen ovulasyondan sonra bir sekretuar dokuya dönüşür. Bu dönem, endometriumun sekresyon fazı olarak tanımlanır ve overlerdeki luteal faza denk gelir. Glandüler hücrelerde glikojen miktarı, progesteron uyarısına bağlı olarak artar ve tüm sitoplazmayı doldurulur, daha sonra da buradan bez lümenine verilir. Luteal faz boyunca uterus bezleri giderek daha kıvrımlı ve stroma daha ödemli hale gelir. Endometriumu besleyen spiral arterlerin sayısı ve kıvrımları da artar. Fertilizasyon olmazsa ya da blastokist implantasyonu gerçekleşmezse, trofoblastik HCG tarafından korpus luteum desteklenmez, progesteron düzeyi azalır ve endometrial doku dökülmeye başlar [65]. Genel olarak proliferatif fazda östrojen (E2) artışı; hücrelerde DNA replikasyonunu uyararak hücrel proliferasyon, endometrium büyümesi ve yeniden şekillenmeyi sağlar. Sekretuar fazda ise progesteron artarak, hücrelerde DNA sentezi ve mitotik aktivasyonu inhibe eder. Bu şekilde endometriumda implantasyon için gerekli koşullar sağlanmış olur [67, 68]. Sekretuar endometrium, erken sekretuar, orta sekretuar ve geç sekretuar olarak gruplandırılır. Sekretuar endometrium, endometriumun alıcılık potansiyeline ulaşma sürecini başlatır (Şekil 4).

PKOS hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda uterusun, PKOS modellerinde daha ağır olduğu; luminal epitel yüksekliği, bez boyutları ve yoğunluğunun arttığı; stromal hücrelerin yoğunluğunda azalma olduğu gösterilmiştir [69].



Şekil 4: Menstrüel Siklus Şeması

2.2.2. Endometrial Receptivite

Progesteron (P4), alıcı endometriumda, implantasyon penceresi sırasında desidual hücrelere dönüşmek üzere hücre farklılaşmasını indükler ve endometrial stromal hücreleri aktive eder. Bu sayede endometrial reseptivite ortaya çıkar. Endometrial reseptivite, endometriumun embriyo implantasyonunu kabul etme yeteneği olarak tanımlanabilir. Blastokistlerin endometriyuma girişine implantasyon denir. İmplantasyon süreci üç aşamada gerçekleşir. Bunlar; apozisyon, adezyon ve invazyondur. Ovulasyondan 6-7 gün sonra meydana gelen adezyon (yapışma) fazı, endometriyumda “implantasyon penceresi” olarak adlandırılan döneme denk gelir. İmplantasyon penceresi, bir menstrüel siklusa

çok kısa bir süre için mevcuttur. Genellikle LH pikinden 6-7 gün sonra, adet in ortalama 20-24. günleri arasında orta sekresyon fazında meydana gelir [6]. İnvazyon fazında ise; embriyonik trofoblastlar, endometriyum epitelinin bazal membranını aşar ve alttaki stromaya geçerek uterus damarlarına ulaşır. Blastokist, gelişimin 11-12. gününde endometriumu tamamen gömülmüş ve implantasyon bölgesindeki hasar, yüzey epiteli ile örtülmüş durumdadır. Placenta oluşumu ile implantasyon tamamlanmış olur[70]

Endometriyal reseptivitenin oluşumunu tespit edebilecek özel bir test yoktur [71]. Hormon belirleme, ultrasonografik endometriyal kalınlık (EMT), spiral arter kan akışı parametreleri ve uterin arter kan akışı parametreleri gibi yöntemler bazı referans değerlerine sahiptir. Fakat doğruluk oranlarının yüksek olmadığı kanıtlanmıştır [72].

Endometrial reseptivite dizisi (ERA), özellikle yardımcı üreme teknikleri kullanılan hastalar, embriyo transferi yapılacak hastalar için endometriumun en uygun olduğu aşamayı belirleyen yenilikçi bir prosedürdür. Endometrial reseptivitede yer alan sınırlı sayıda geni içerecek, veri analizinin kolay olmasını sağlar ve maliyeti düşürür [73]. Ancak yine de ERA testi embriyo transferi için en uygun zamanı belirleyememekte veya implantasyonu etkileyen rahim hastalıklarını tespit edememektedir. Aynı zamanda invaziv bir testtir [74]. İmplantasyonun endometriyal yönünü değerlendirmek için yeni teknolojiler gerekli olabilir. Bununla birlikte, yeni moleküllerin keşfi endometrial reseptivitenin değerlendirilmesine bir umut ışığı getirmiştir [75]. Günümüzde Lösemi İnhibitör Faktör (LIF), Homeobox genleri A (HOXA), pinopodlar, $\alpha\beta 3$ -integrin ve hücreler arası bağlantılar gibi bazı belirteçlerin endometrial reseptivite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [76, 77].

2.2.3. Polikistik Over Sendromunda Endometrial Reseptivite

Polikistik over sendromunda, artmış androjen ve östrojen, azalmış progesteron düzeyleri primer hormonal bozukluktur [78]. Yapılan çalışmalar, PKOS'lu hastaların endometrial epitelyal ve stromal hücrelerinde östrojen,

progesteron ve androjen reseptörlerinin ekspresyonunda değişiklik olduğunu göstermektedir [67, 68].

Yapılan çalışmalarda PKOS'ta endometrial reseptivite değişikliği ile ilişkili implantasyon yetersizliğine sebep olabilecek moleküler mekanizma değişiklikleri raporlanmıştır [35]. Özellikle hiperandrojenizmin endometriyal hücrelerde, bazı proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek endometrial gelişim bozukluğu, endometrial reseptivite azalması ve implantasyon yetersizliğine yol açabileceği gösterilmiştir [7]. Başka bir çalışmada ise PKOS'lu hastalardan alınan biyopsi örneklerinde Homeobox gen A (HOXA) ailesinden HOXA-10 mRNA ekspresyonunda azalma görülmüştür. Bu implantasyonu etkileyen pinopod membranında eksprese edilen $\alpha\beta3$ -integrin düzeyinde azalma ile ilişkilendirilmiştir [35].

2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümü, doku homeostazını koruyan ve potansiyel olarak zararlı hücreleri ortadan kaldıran kritik ve aktif bir süreçtir. Hücre ölümleri fiziksel hasar sebebiyle ya da normal gelişim sırasında fizyolojik olarak ortaya çıkabilir. Yapılan morfolojik incelemeler ve ölü hücrelerin DNA parçalanma durumuna bakılarak hücre ölümü başlangıçta memeli hücrelerinde programlanmış "apoptoz" ve programlanmamış "nekroz" olarak sınıflandırılmıştır. Ancak bu konuda yapılan yeni çalışmalar ışığında farklı hücre ölüm mekanizmaları da bulunmuştur [79].

2.3.1. Nekroz

Nekroz; kontrol dışı, düzensiz, rasgele, programlanmamış hücre ölüm çeşididir. Dış etmenlerle hücrenin iyon dengesinin bozulmasıyla DNA tamirinden sorumlu nükleer enzim Poli ADP-riboz Polimeraz (PARP), Nikotinamid Adenin Dinükleotidin (NAD⁺) formunu ikiye bölerek NAD kaybına neden olur. Bu durum ATP eksikliğine, bu da iyon pompasında yetersizliğe neden olarak hücrenin ve organellerin sıvı ile şişmesine, plazma membran bütünlüğünün bozulmasına yol

açar. Bu durumda osmotik basınç sebebiyle hücre patlar ve hücre içeriği interselüler alana yayılarak enflamasyona yol açar [80].

2.3.2. Apoptoz

Akut hücresel hasar sonucunda meydana gelen nekrozdan farklı olarak belirli bir moleküler işlemler serisinin sonunda, istenmeyen hücrelerin enerji kullanılarak ölümünü sağlayan programlanmış mekanizmadır ve fizyolojik süreçtir [81].

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} düzeyi artışı, pH azalışı, hücre siklus bozuklukları ve hipoksi sayılabilir. Hücre dışı sinyaller ise; büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit ve dış etkenlerdir (iskemi, toksinler, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon vs.). Her iki sinyal yolunda da kaspazlar görev alır [80].

2.3.3. Otofajiye bağlı hücre ölümü

Hemostaza katkıda bulunan materyallerin, kullanılmayan bileşenlerin lizozomlarda parçalanarak yok edildiği mekanizmadır. Otofajinin hücre ölümü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. P62 (p62/A170/SQSTM1) sitoplazmik bir otofaji reseptörüdür. P62, hücre içindeki anormal yapıları tanıyarak, otofaji ile yıkımlarına yol açar. P62 proteininin kendisi de otofagozoma taşıdığı proteinlerle birlikte lizozomda yıkılmaktadır. Son yıllarda, p62 proteininin bu özelliğinin, immüno blotlar kullanılarak takibinin, moleküler bir otofaji belirteci olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [82].

2.3.4. Parthanatos

Düzenlenmiş bir nekroz şeklidir. Patojenik olarak yüksek seviyelerde PARP1 aktivitesi nedeniyle NAD^{+} tükenmesine yol açar. Bu durum potansiyel olarak ölümcül NAD^{+} tükenmesi yoluyla hücre ölümüne sebep olur.

2.3.5. Piroptoz

Düzenlenmiş bir nekroz şeklidir. Doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini düzenleyen, bakteriyel saldırılara cevap olarak kaspaz-1 aracılığıyla, monosit ölümünü gerçekleştiren hücre ölüm şeklidir.

2.3.6. Ferroptoz

Düzenlenmiş bir nekroz şeklidir. Oksidatif stresle karşılaşıldığında ortaya çıkan, düzenlenmiş hücre ölümünün demire bağımlı bir şekli olarak tanımlanır. Ferroptoz, birçok hastalıkta rol alır. Lipofilik antioksidanlar, lipid peroksidaz inhibitörleri demir şelatörleri tarafından inhibe edilebilir.

2.3.7. Nekroptoz

Nekroptozis temel anlamda apoptoz ve nekrozun bazı özelliklerini taşıyan, programlı bir hücre ölüm çeşididir. Programlı olması yönüyle apoptoza, hücre ölümü morfolojisi yönüyle nekroza benzediği için nekroptoz olarak isimlendirilmiştir [82].

2.4. Nekroptozis

Nekroptozis, hücre şişmesi ve plazma zarı yırtılmasının temel özellikleri ile düzenlenmiş bir nekrozdur [8]. Morfolojik olarak parçalanmış kromatin, şişmiş organeller, hücre membranında parçalanma ve otofaji ile karakterizedir [83]. Nekroptotik sinyal yolunun başlıca anahtar bileşenleri; Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase (MLKL), Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1(RIPK1), RIPK3'tür. Nekroptotik yolağın sinyalizasyonu, Tümör Nekrozis Faktörü alfa reseptörleri (TNFR1), Toll benzeri reseptörler, interferon reseptörleri veya belirli DNA bağlayıcı proteinlerin aktivasyonu ile olur [75]. İlk olarak RIP proteinleri nekrozomu oluşturur ve sonrasında MLKL'nin bir araya toplanmasını ve fosforilasyonunu sağlar. MLKL, membranları geçirgen hale getirerek litik hücre ölümüne neden olur. MLKL'nin RIPK3 ile fosforilasyonu, MLKL oligomerlerinin toplanmasını ve plazma zarı translokasyonunu kolaylaştırır [84].

2.4.1. Nekroptozis Yolları

2.4.1.1. Tümör nekroz faktör reseptörü 1 ve nekroptozis

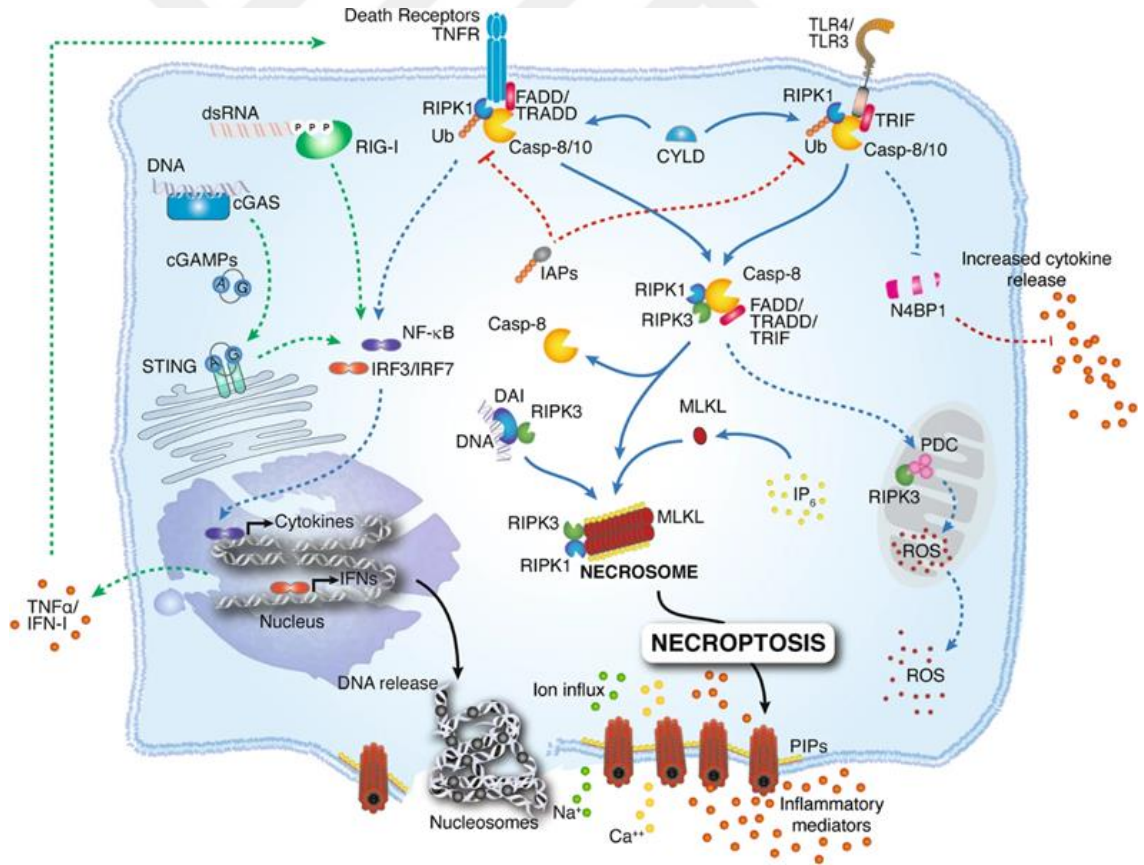
Nekroptoziste Tümör nekroz faktör reseptörü 1 (TNFR1), inflamasyonu düzenleyen birçok genin aktifleşmesini indükler. Aynı zamanda, Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) da hücre ölümünü indükleyebilir. TNF'nin neden olduğu hücre ölümü, TNF-Alfa'nın hücre zarı üzerinde TNFR1'e bağlanmasını ve hücrede farklı kompleksler oluşturmak için bir dizi protein ile etkileşime girmesini gerektirir. Tümör nekroz faktörü reseptörü tip 1-ilişkili ölüm alanı proteini (TRADD), RIPK1, TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2), apoptoz protein 1'in hücresel inhibitörü (cIAP1), CYLD geni birleşerek kompleks-I'i oluşturur [83]. Kaspaz-8 aktivitesi olmadığında yani apoptozisin gerçekleşemediği durumda RIPK1, RIPK3'ü alır ve fosforile ederek ripoptozom adı verilen kompleks-II'yi oluşturur. RIPK1/RIPK3 kompleksi, MLKL'yi alır ve fosforile eder ve MLKL oligomerize olur, böylece nekrozomu oluşturur [85]. MLKL'nin oligomerize olmasıyla inflamasyonda rol alan NLR Family Pyrin Domain Containing 3 (NLRP3) aktive olur. Bu durum hücre içi inflamasyon sürecini başlatır [79]. MLKL oligomerlerinin oluşturduğu plazma zarındaki büyük gözenekler, iyon akışına, hücre şişmesine ve membran lizisine sebep olarak nekroptotik hücre ölümüne ve ardından hücre içi materyalin kontrolsüz salınımına yol açar [86].

Mitokondriyal ROS üretiminin en önemli düzenleyicisi RIPK3 olarak tanımlanmıştır. RIPK3, pirüvat dehidrojenaz kompleksi (PDC) gibi mitokondriyal enzimlerle etkileşimde bulunarak enzim aktivasyonunu sağlar. Aktive olan enzim mitokondriyal solunum zinciri yoluyla nekroptozisin bir parçası olan ROS oluşumunu sağlar. Bu nedenle mitokondri nekroptozis oluşumunda kolaylaştırıcı etki göstermiş olur [87].

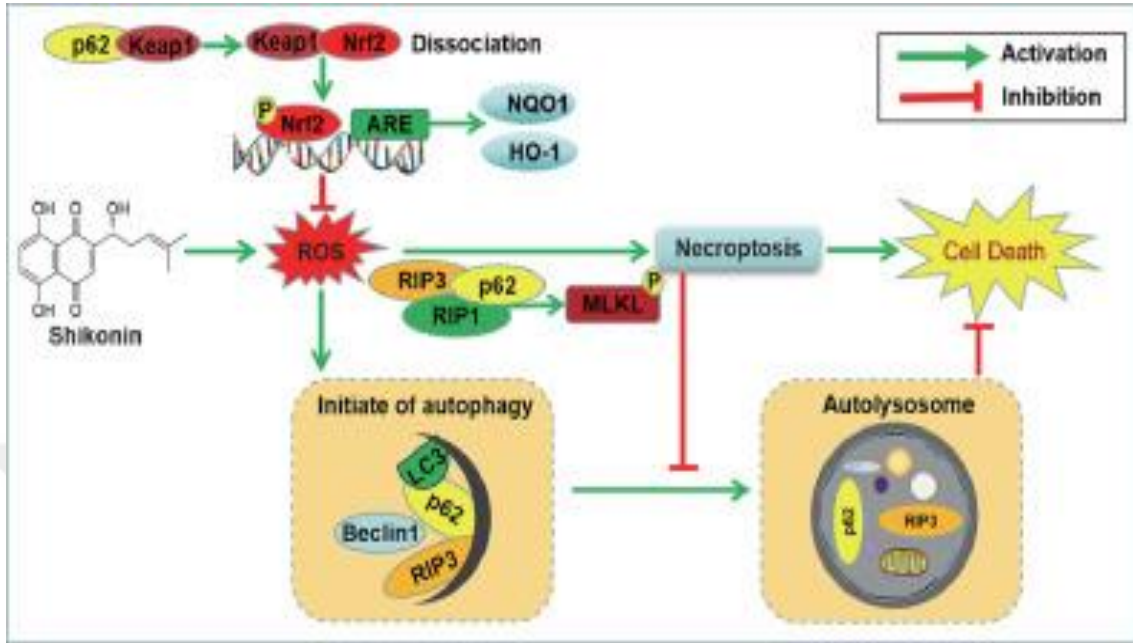
2.4.1.2. Toll Like Reseptör ve Nekroptozisin Düzenlenmesi

Toll Like Reseptör (TLR); virüs, parazit, bakteri, mantar gibi patojenlerle ilişkili moleküllere yanıt veren bir reseptördür. Viral çift sarmallı RNA veya yapay analoglara TLR3 yanıt verirken, lipopolisakkaritlere (LPS) TLR4 yanıt verir.

TLR3 ve TLR4'ün ligandlara bağlanmasından sonra Toll/IL-1(Toll interleokin-1) reseptörü alanı içeren adaptörler alınır. Bu aşamadan sonra tip1 interferon (IFN) yanıtlarına yol açan inflamatuvar sitokinler üretilir. TLR3 için Toll/IL-1 Receptor Domain Containing Adaptor Inducing IFN- β /TIR domain-containing Adaptor Molecule 1 (TRIF/TICAM-1) olmak üzere yalnızca bir adaptör protein vardır. TLR4 yolu ise TRIF veya Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) ile ilerler. TLR ye gelen sinyaller kaspaz-8 aktivasyonu baskılandığında nekroptozisi indükler [83]. RIPK1, RIPK3'ü alır ve fosforile eder böylelikle kompleks-II'yi oluşturur. RIPK1/RIPK3 kompleksi, MLKL'yi alır ve fosforile eder. Nekroptozis gerçekleşir. TNFR1'in indüklediği nekroptozis mekanizmasında olduğu gibi RIPK3, bu mekanizmada da mitokondride ROS üretimini tetikler [86].



Şekil 5: Nekroptozis mekanizmasının özeti 1[81]



Şekil 6: Nekroptosis mekanizmasının özeti 2 [88]

2.4.2. Nekroptosisin İnhibisyonu

Bu süreçlerde temel rol oynayan RIPK1, RIPK3 ve MLKL'yi hedef alan bazı inhibitörler de geliştirilmeye başlanmıştır. Nekrosülfonamid, nekrostatin-1 bunlardan en bilinenleridir [89].

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza katılan hastalar, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hafsa Sultan Hastanesi Jinekoloji ve İnfertilite Polikliniği'ne başvuran hastalar arasından seçildi. Klinik Araştırmaları Etik Kurul'undan alınan 08.05.2023 tarih 461 karar no'lu onay ile çalışmaya başlandı.

Çalışmada kullanılan malzemeler, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2023-083 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Araştırmamıza katılan hastaların hepsi çalışma hakkında bilgilendirilerek, sözlü ve yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formları ile onamları alınmıştır. Hastalardan alınan numuneler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. Çalışmaya 12 adet PKOS, 12 adet metformin kullanan PKOS ve 12 adet kontrol grubu olarak toplam 36 hasta dahil edilmiştir. PKOS grubu hastaları 2003 yılında Hollanda'nın Rotterdam şehrinde ESHRE ve ASRM tarafından fikir birliği ile belirlenen Rotterdam kriterlerine uygun seçilmiştir.

Çalışma dışı tutulma kriterleri:

- 1- 20-45 yaş aralığı dışında olması,
- 2- Beta HCG pozitif olması,
- 3- Kronik hastalık varlığı (Cushing sendromu, Adrenal hiperplazi, PKOS dışı androjen fazlalığı nedenleri, Adenom, Karsinom vb.)
- 4- Hastanın menopoz döneminde olması,
- 5- Sigara ve alkol kullanımı olması,
- 6- Oral kontraseptif kullanıyor olması,
- 7- Endometrium kanseri, endometrial polip ve myom gibi organik patolojileri olmasıdır.

Araştırmaya dahil edilen hastaların sosyo-demografik bilgileri ve jinekolojik öyküleri anket formu kullanılarak doldurulmuştur. Anket formunda hastanın yaşı,

gebelik öyküsü, son adet tarihi, bilinen başka bir hastalığı, son üç ayda ilaç kullanım öyküsü sorgulanmıştır.

Kontrol grubuna; normal menstrüel siklusları olan ya da anormal uterin kanaması olmuş, herhangi bir başka organik patolojinin eşlik etmediği (endometrial polip, myom, endometrium kanseri gibi) PKOS dışı sebepler ile jinekoloji polikliniğine başvuran, adetinin 19-22. günleri arasında olan, beta HCG değeri negatif, 20-45 yaş arası kadınlar dahil edilmiştir. Kontrol grubundaki, PKOS grubundaki ve Metformin Kullanan PKOS grubundaki gönüllüler benzer yaş aralığı ve benzer vücut kitle indeksi (VKİ) değerlerine sahip hastalardan seçilmiştir. Metformin kullanmış PKOS grubuna ise PKOS tanısı ile en az bir ay süreyle 1gr/gün metformin kullanmış hastalar dahil edilmiştir. Anormal uterin kanaması olan ve endometrial örnekleme yapılması gereken hastalardan onam alınarak 3-4 cc de çalışma için pipelle ile örnek alınmış ve bunlardan uygun olanları kontrol grubuna dahil edilmiştir. PKOS ve metformin kullanan PKOS hastalarından da yine onam alınarak pipelle örnekleme yapılmıştır.

Alınan örneklerin histolojik ve immünohistolojik değerlendirme yapılacak kısmı %10 formalin çözeltisine konularak fiksasyonu sağlanırken Western blot ve qPCR yapılacak kısmı sıvı azotta şok dondurma yöntemiyle korunmuş, sonrasında -80°C'de saklanmış ve Histoloji Laboratuvarı'na teslim edilmiştir.

3.1. Histolojik ve İmmünohistolojik Çalışmalar

Tüm gruplara ait dokular %10'luk formalin içerisinde 24 saat tespit edildi. %70 alkolde gece boyu bekletilerek formalinden kurtarıldıktan sonra örnekler, rutin doku takip prosedürünü takiben parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler her bir lizimli lamda 3–4 adet olacak şekilde dizildi.

3.2. Histokimyasal Boyama

Rotarymikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'ten %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akan su

altında yıkandı. Kesitler 2 dakika hematoksilen ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akan suda yıkandı, 1 dakika Eozin ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akan su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

3.3. İndirekt İmmunohistokimya Boyama

Alınan kesitler immünohistokimyasal boyama için bir saat 60°C 'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. pH 6.00 sitrat tamponunda 95°C 20 dk bekletilerek antijen retrieval işlemini takiben, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphatebuffersolution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 10 dk bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mousebiotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 1 dk boyandı. Mayers Hematoksilen ile boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumuna ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları semikantitatif olarak değerlendirildi.

IV. BULGULAR

4.1. Histokimyasal Bulgular

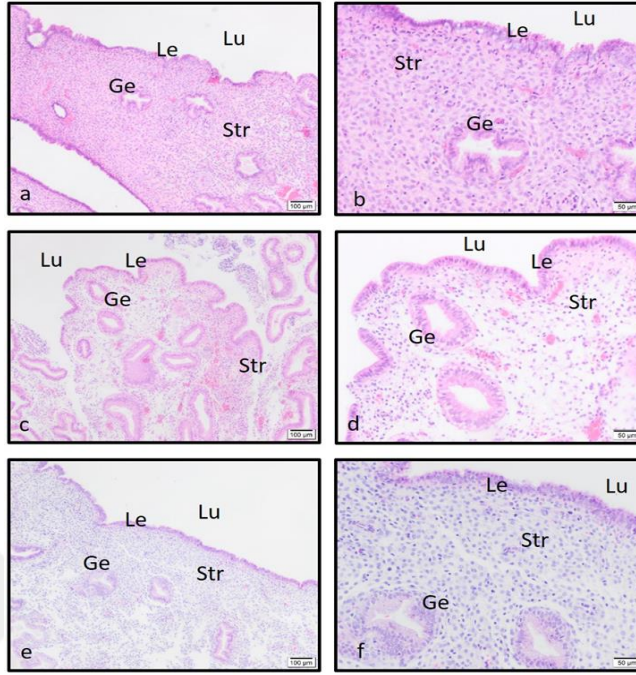
Kontrol grubuna ait endometrium örneklerinin incelenmesinde, endometriumun bazal ve fonksiyonel tabakaları ayırt edildi. Bazal bölgeden proliferatif bezler az miktarda gözlenirken, stromanın miyometrium tabakasına doğru daha dens yapıda olduğu tespit edildi. Endometriumun yüzeyini ve bezlerini örten epitel hücreleri içinde 4 tip hücrenin varlığı gözlemlendi. Bazal hücreler ve proliferatif hücreler, bazofilik sitoplazmaları ve uzamış çekirdeği ile ayırt edildi. Sekretuar hücreler supranükleer salgı vezikülleri varlığı ile tanımlandı. Piramidal şekilli silyalı hücreler yuvarlak merkezi çekirdek görünümleri ile kolayca tanındı (Şekil 7a,7b).

Endometrial bezler nonstafiye küboidal biçimde epitel ile döşeli olduğu tespit edildi. sekretuar döneme ait doku örneklerinde bez lümenin geniş ve kıvrıntılı biçimde olduğu gözlemlendi (Şekil 7a,7b).

Endometrial stromada, en yaygın görülen küçük boyutlu, oval dens çekirdeğe sahip stromal hücreler tespit edildi. Sekretuar fazda predesidualizasyon gözlemlendi, hücrelerin aşırı pembe sitoplazmaya sahip olması ve hücre sınırlarının belirgin olması ile hücreler ayırt edildi (Şekil 7a,7b).

Polikistik over sendromlu hasta örneklerinin hematoksilin-eozin ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde stromada bez miktarının belirgin olarak arttığı tespit edildi. Ayrıca yüzey ve bez epitelinin daha kalın biçim aldığı stromada da ödemin belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 7c,7d).

Metformin verilen hasta grubunun hematoksilin-eozin ile boyanmış preparatların incelenmesine, bez yapının ve ödemin daha az belirgin olduğu yüzey ve bez epitel kalınlığının kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen, polikistik over sendromlulara göre azaldığı tespit edildi (Şekil 7e,7f)



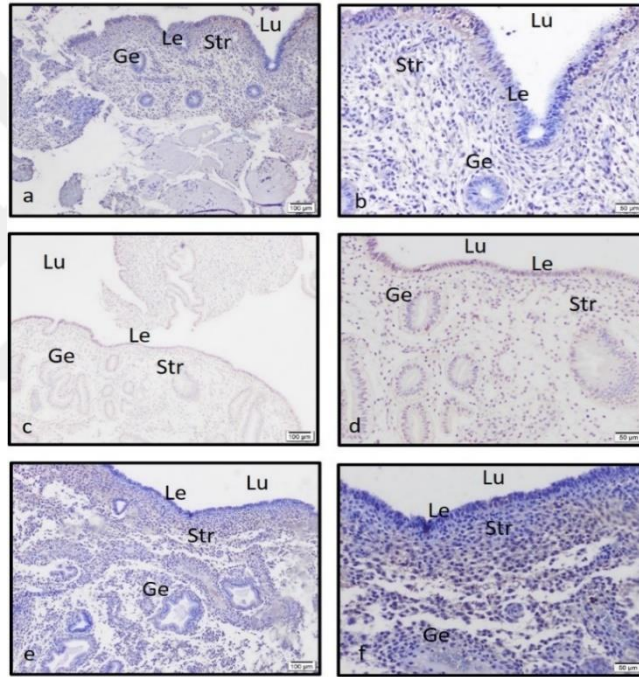
Şekil 7: Mikroskopik Görüntü 1 (Hematoksilen Eozin)

Tüm gruplara ait doku örneklerinin (Kontrol a, b; PKOS c, d; PKOS + Metformin; e, f) hematoksilin eozin ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde endometrium yüzeyinin prizmatik hücreler ile örtülü olduğu görülmektedir. Kontrol grubunda az sayıda bez yapısı gözlenirken, PKOS grubunda bezlerin artmış olduğu, PKOS + Metformin grubunda bez sayısı kontrol grubuna göre artmış gözlenirken, PKOS grubuna göre azalmış olması dikkat çekici bulundu. PKOS grubunda stromada ödem görülmektedir.

(Kısaltmalar Lu: Lümen; Le: Lümen epiteli; Ge: Glandüler epitel; STR: Stroma)

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

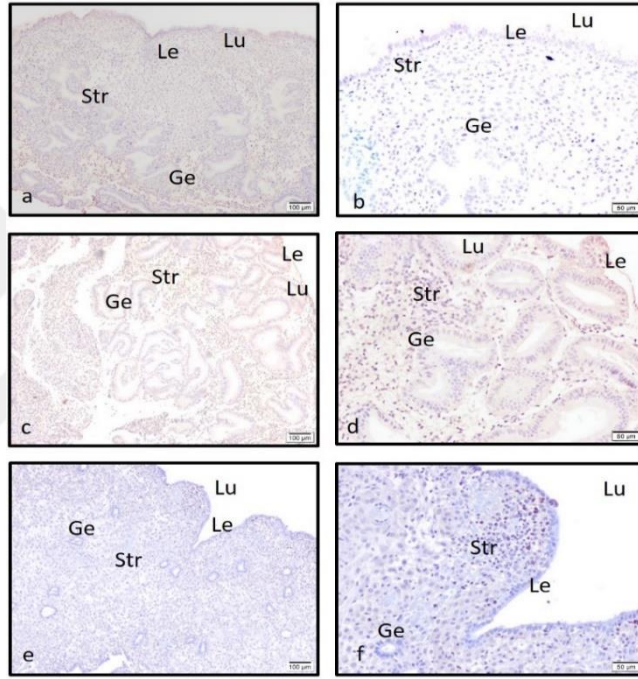
Kontrol grubu örneklerinin RIPK1 primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde immünoreaktivitenin oldukça düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 8a,8b). PKOS grubunda ve PKOS + Metformin grubunda ise RIPK1 immünoreaktivitesinin kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 8c,8d). PKOS grubunda RIPK1 immünoreaktivitesinin daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 8e,8f)



Şekil 8: Mikroskopik Görüntü 2 (RIPK1)

RIPK1 primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça düşük; PKOS grubunda (c, d) artmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha az ancak kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmektedir.

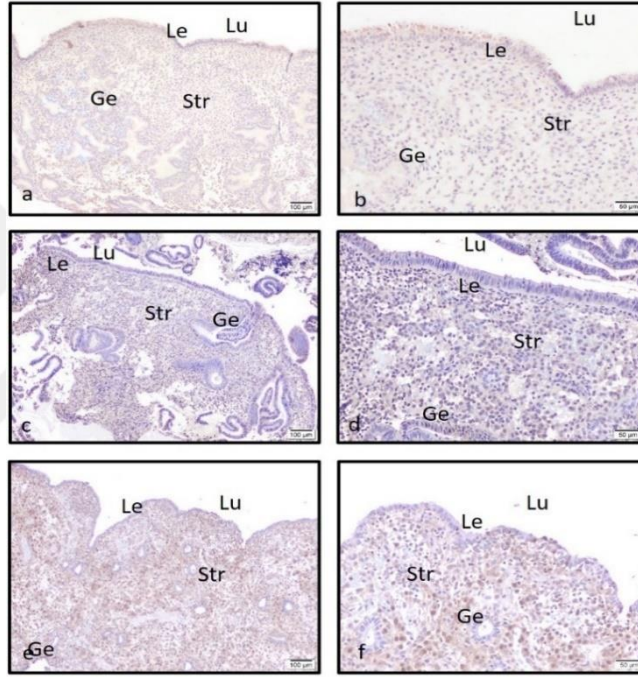
Kontrol grubuna ait doku örneklerinin incelenmesinde P-RIP-1 primer antikoru ile boyanmış preparatlarda immünoreaktivite oldukça düşük gözlenirken (Şekil 9a,9b); PKOS grubunda belirgin olarak artmış bulundu (Şekil 9c,9d). Metformin ile tedavi edilen PKOS'lu hastaların endometrium örneklerinde P-RIP-1 aktivitesi (Şekil 9e,9f) PKOS grubuna göre düşük gözlemlendi, ancak kontrol grubunda fazla olması dikkat çekici bulundu.



Şekil 9: Mikroskopik Görüntü 3 (P-RIP-1)

P-RIP-1 primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça az gözlenirken PKOS grubunda (c, d) artmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha az, ancak kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmektedir.

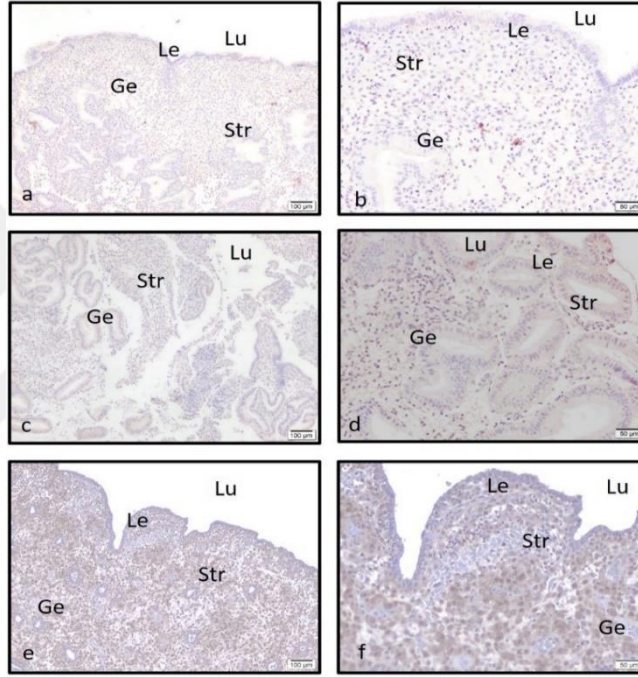
Kontrol grubu örneklerinin RIPK3 primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde immünoreaktivitenin oldukça düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 10a,10b). PKOS grubunda ve PKOS + Metformin grubunda ise RIPK3 immünoreaktivitesinin kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 10c,10d). PKOS + Metformin grubunda RIPK3 immünoreaktivitesinin PKOS grubundan daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 10e,10f)



Şekil 10: Mikroskopik Görüntü 4 (RIPK3)

RIPK3 primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça az gözlenirken PKOS grubunda (c, d) artmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS ve kontrol grubuna göre daha fazla, olduğu görüldü.

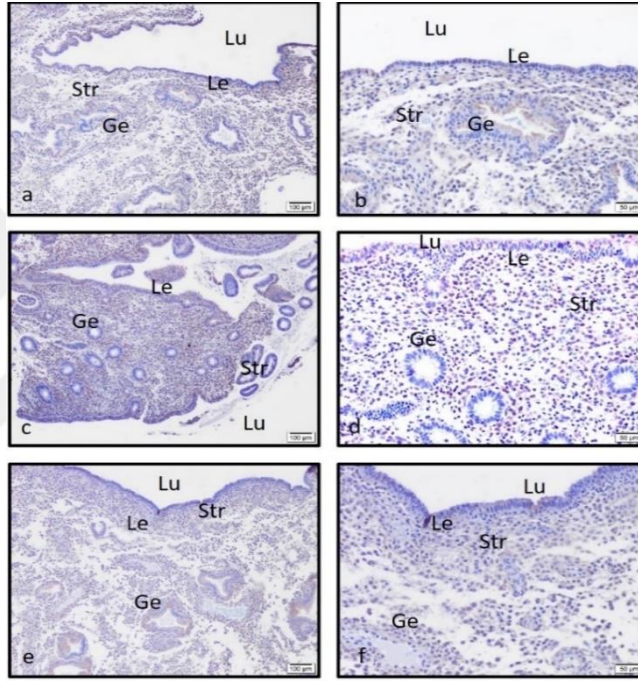
P-RIP3 antikoruna ile boyanmış preparatların kontrol grubuna ait örneklerin incelenmesinde immünoreaktivitenin düşük olduğu tespit edildi (Şekil 11a,11b). Buna karşılık PKOS grubunda P-RIP3 immünoreaktivitesinin belirgin olarak artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 11c,11d). Metformin grubunda ise immünoreaktivite kontrol grubuna göre artmış gözlenirken PKOS grubundan daha düşük olduğu tespit edildi. (Şekil 11e,11f)



Şekil 11: Mikroskopik Görüntü 5 (P-RIP-3)

P-RIP3 primer antikoruna ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça az gözlenirken PKOS grubunda (c, d) artmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha az, ancak kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmektedir.

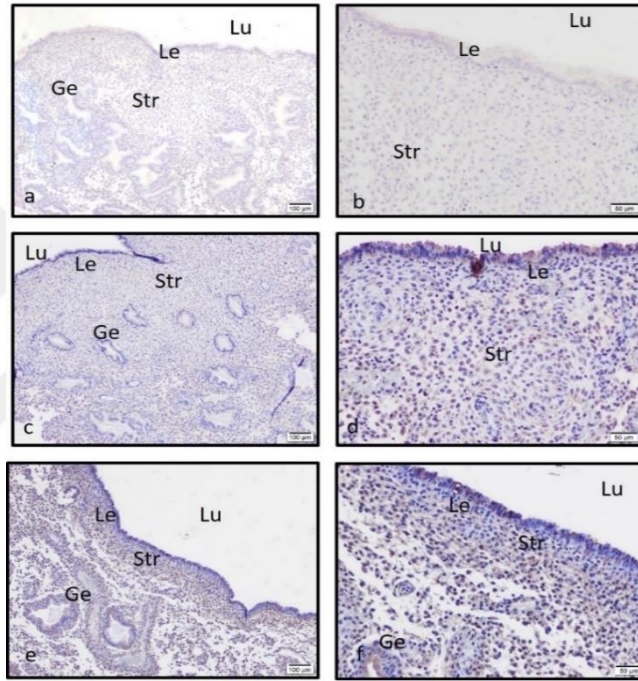
P62 primer antikoru ile boyanmış preparatların immünohistokimyasal teknik ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde kontrol grubunda immünoreaktivite oldukça düşük bulundu (Şekil 12a,12b). Hasta gruplarında ise PKOS grubunda immünoreaktivitenin belirgin artmış olduğu gözlenirken (Şekil 12c,12d); PKOS + Metformin grubunda immünoreaktivitenin yüksek olduğu ancak PKOS grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 12e,12f).



Şekil 12: Mikroskopik Görüntü 6 (P62)

P62 primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça az gözlenirken PKOS grubunda (c, d) artmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha az, ancak kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmektedir.

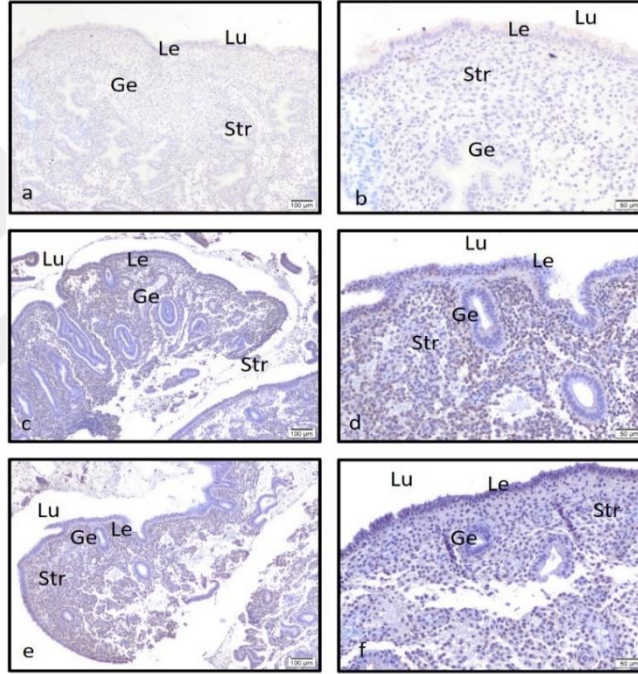
MLKL primer antikoru ile boyanmış preparatların immünohistokimyasal teknik ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde kontrol grubunda immünoreaktivite oldukça düşük bulundu (Şekil 13a,13b). Hasta gruplarında ise PKOS grubunda immünoreaktivite artmış gözlenirken (Şekil 13c,13d) PKOS + Metformin grubunda immünoreaktivitenin yüksek olduğu, PKOS grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 13e,13f)



Şekil 13: Mikroskopik Görüntü 7 (MLKL)

MLKL primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça düşük gözlenirken PKOS grubunda (c, d) artmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha az, ancak kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmektedir.

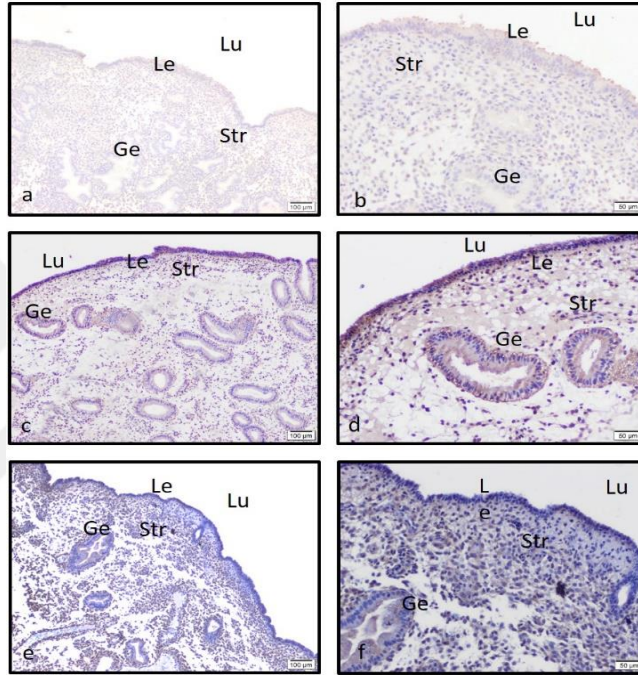
Kontrol grubunun P-MLKL primer antikoru ile boyanmış preparatların immünohistokimyasal teknik ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde immünoreaktivitenin düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 14a,14b). PKOS grubunda P-MLKL immünoreaktivitenin kontrol grubuna göre oldukça artmış olduğu tespit edildi (Şekil 14c,14d). Metformin grubunda P-MLKL immünoreaktivitesinin kontrol grubundan yüksek olduğu, PKOS grubundan ise daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 14e,14f).



Şekil 14: Mikroskopik Görüntü 8 (P-MLKL)

P-MLKL primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça düşük gözlenirken PKOS grubunda (c, d) artmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha az, ancak kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmektedir.

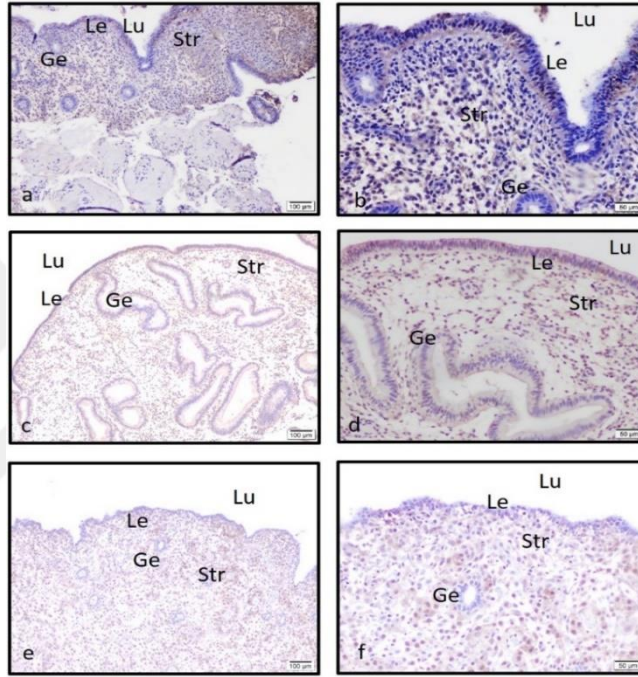
HOXA10A primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde kontrol grubunda immünoreaktivite orta derece gözlemlendi (Şekil 15a,15b). PKOS grubunda (Şekil 15c,15d) ve PKOS + Metformin grubunda ise immünoreaktivitenin daha düşük olduğu gözlemlendi. PKOS grubunda azalmanın daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 15e,15f).



Şekil 15: Mikroskopik Görüntü 9 (HOXA10A)

HOXA10A primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça fazla gözlenirken PKOS grubunda (c, d) azalmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha fazla, ancak kontrol grubundan daha az olduğu görülmektedir.

Kontrol grubu endometrium doku örneklerinin LIF primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde immünoreaktivitenin belirgin olduğu gözlemlendi. PKOS grubunda ve PKOS + Metformin grubunda ise LIF immünoreaktivitesinin daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 16e,16f). PKOS grubunda azalmanın daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 16c,16d).



Şekil 16: Mikroskopik Görüntü 10 (LIF)

LIF primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubunda (a, b) immünoreaktivite oldukça fazla gözlenirken PKOS grubunda (c, d) azalmış gözlemlendi. PKOS + Metformin grubunda (e, f) immünoreaktivite PKOS grubuna göre daha fazla, ancak kontrol grubundan daha az olduğu görülmektedir.

V. TARTIŞMA

PKOS'lu hastaların ovulasyon indüksiyonu sonrası implantasyon başarısızlığının yüksek olması veya gebelik olursa spontan düşük oranlarının artmış olması nedeniyle bu hastalarda infertiliteye sadece anovulasyonun değil endometrial anormalliklerin de sebep olabileceği yapılan pek çok yeni çalışmada öne sürülmüştür [35].

PKOS'lu kadınların, muhtemelen menstrüel sikluslar sırasında progesteron seviyelerinin azalması ve serbest insülin seviyelerinin, insülin benzeri büyüme faktörü-1, androjenlerin ve lüteinize edici hormonun (LH) artması nedeniyle daha yüksek bir implantasyon başarısızlığı ve artmış abortus insidansına sahip oldukları bildirilmiştir [90].

PKOS hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, uterusun PKOS modellerinde daha ağır olduğu, luminal epitel yüksekliği, bez boyutları ve yoğunluğunun arttığı, stromal hücrelerin yoğunluğunda azalma olduğu gösterilmiştir [69]. Bizim çalışmamızda da benzer olarak PKOS'lu hastalarımızdan aldığımız endometrium örneklerinde glandların boyutu ve yoğunluğunun artmış olduğu bulundu.

2011 de Kore'de Park Jc ve ark. 117 tane PKOS'lu hasta ile yaptıkları çalışmada, hastaların endometriumlarını histolojik olarak incelemiş. PKOS hastalarının çoğunda endometrial kalınlık artışı, hiperplazi ve bir kısmında endometrial kanser görmüşlerdir [91]. Bizim bulgularımızda polikistik over sendromlu hasta örneklerinin hematoksilen eozin ile boyanmış preparatların incelenmesinde stromada bez miktarının belirgin olarak artması ayrıca yüzey ve bez epitelinin daha kalın biçim aldığı stromada da ödemin belirgin olduğunun görülmesi bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

PKOS'lu kadınlarda artan insülin direnci ve hiperandrojenemi ile kalıcı anovulasyon, erken foliküler faza kıyasla nispeten sabit östradiol düzeylerine

ulaşır [92]. Ancak, yağ dokusunda androstendionun östrona periferik dönüşümünün artması nedeniyle orta düzeyde yükselmiş östradiol düzeylerine rastlanır ve hiperinsülinemi durumunda, insulinin seks hormonu bağlayıcı globulinin (SHBG) miktarını azaltması nedeniyle dolaşımda serbest östradiol ve testosteron yükselir [93].

Kim ve ark. 2000 yılında PKOS hastalarında infertilite tedavisi için oluşturdukları algorithmada insülin duyarlaştırıcı ajan kullanımına da yer vermişlerdir [49]. PKOS'ta infertilitenin yanı sıra erken gebelik kayıpları da sık görülen bir durumdur. Gebeliklerinin %50'ye yakını ilk 3 ayda abortus ile sonlandığı tahmin edilmektedir. Genetik faktörler ve insülin yüksekliğinin buna neden olduğu düşünölmekte olduğu için yine metformin tedavisi kabul görmüştür.

2003 yılında Lord JM ve ark.; 543 katılımcı ve 13'ünde metformin kullanılan 15 adet çalışmanın dahil edildiği sistematik bir inceleme yapmıştır. Metanaliz sonucu, metformin tedavisinin obeziteden bağımsız olarak kan şekeri regölasyonunu sağladığı ve serbest dolaşan androjenleri düşürdüğünü göstermişlerdir [3].

2017 yılında Zhang Y. ve ark. tarafından Çin'de 70 adet sıanla yapılan deneysel çalışmada PKOS modeli oluşturulmuş ve metformin verilmesinin endometriumu inflamatuar etkiyi azaltarak, androjen reseptör (AR) bağımlı gen ekspresyonunu inhibe ederek endometriumu iyleştirici etkisi olduğu; fakat apoptozu değiştirmedeği gösterilmiştir [94]. Biz de insanda yaptığımız bu çalışma ile metforminin yeni bir hücre ölüm mekanizması olan nekroptozisi, PKOS'lu hastaların endometriumunda azalttığını ve bunun endometrium üzerine iyleştirici etkisi olabileceğini göstermiş olduk.

PKOS'lu kadınlarda endometrial büyüme ve farklılaşma; androjenlerden, insülin ve karşılanmamış östrojenlerden etkilenir. Ovulasyon ve progesteronun düzenleyici etkilerinin yokluğunda, endometrium salgısal dönüşüme uğramaz ve devamlı olarak östradiol'ün uyarıcı ve mitojenik etkileriyle karşı karşıya kalır ve

sürekli östradiol etkisinde kalan endometrium kalınlaşır, Öngörülemeyen kanama düzenlerine, hiperplaziye ve kansere yol açabilir [95].

Desidualizasyon (stromal fibroblastların progesteron etkisiyle farklılaşması) sürecindeki anormallikler; implantasyon başarısızlığı, düşük, preeklampsi ve erken doğum dahil olmak üzere çeşitli implantasyon bozukluklarının patofizyolojik temeli olabilir [96]. Bu sebeple PKOS'lu hastalardaki infertilitenin araştırılmasında endometrium üzerine daha fazla çalışma yapılmalıdır.

PKOS'taki endokrinolojik ve metabolik anormalliklerin endometrium üzerinde karmaşık etkileri olabileceğine ve bunun infertiliteye de yol açabileceğine dair çalışmalar devam etmektedir.

Endometrial reseptivite değişikliği de bu endometrial anormalliklerden biridir. Endometrial reseptivite ilişkili implantasyon yetersizliğine sebep olabilecek bazı moleküler mekanizma değişiklikleri raporlanmıştır [35]. Özellikle hiperandrojenizmin endometriyal hücrelerde, bazı proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek endometriyal gelişim bozukluğu, endometriyal reseptivite azalması ve implantasyon yetersizliğine yol açabileceği gösterilmiştir [7]. Çalışmamızda PKOS'ta, kontrol grubunda ve metformin kullanmış PKOS hastalarında nekroptozis ve endometrial reseptivite incelendi. PKOS hastalarının endometriumunda nekroptozisi inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla ilgili daha önce yapılmış rat deneyleri mevcut olup çalışmamız PKOS'lu kadınların endometriumunda nekroptozisi inceleyen ilk çalışmadır. Bu yönüyle çalışmamızın, PKOS hastalarının infertilite problemlerinin çözümü için yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

2005 yılında Degterev A. ve ark. yazdıkları bir makalede; Fas/ Tümör Nekrozis Faktör (TNF) reseptör ailesinin uyarılması sonucu apoptotik ölüm yolağını içermeyen yeni bir programlı ölüm çeşidini belirlediklerini rapor etmişler ve bunu nekroptozis olarak tanımlamışlardır. Aynı makalede nekroptozisi inhibe eden nekrostatin-1 (Nec-1) adlı bir molekül bulduklarını, farelerde yaptıkları çalışmada gecikmiş iskemik beyin hasarında nekroptozisin katkıda bulunduğunu

ve iskemik inme sonrası nöronların korunmasında nekroptozisin yeni bir hedef olabileceğini bildirmişlerdir [97].

İnme, böbrek iskemisi, miyokard enfarktüsü, organ nakli, romatoid artrit, multipl skleroz ve Crohn hastalığı gibi kronik inflamatuvar hastalıkların gelişiminde ve TNF ile indüklenen sistemik inflamatuvar yanıt sendromunun şiddetlenmesinde nekroptozisin rol oynadığını gösteren hayvan çalışmaları mevcuttur [86]. Ancak uterus ve endometrium ile ilgili pek fazla çalışma yoktur. Kadın hastalıkları ve İnfertilite ile ilgili olarak 2023 yılında Li H. ve ark.'nın, tunikamisin ile indüklenmiş prematür ovaryan yetersizlikli farelerin granüloza hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmada nekroptozisin arttığını ve bunun folikül atrezisine sebep olduğunu göstermişlerdir. Böylece prematür ovaryan yetersizlikte nekroptozisin de rol alabileceği gösterilmiştir [98]. Nekroptozisin granüloza hücrelerindeki etkisini inceleyen bunun gibi sayılı çalışma olup henüz endometriuma etkisini inceleyen çalışmalar bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda nekroptozu insan endometriumunda inceleyerek PKOS'lu hastaların endometriumunda nekroptozisi artmış olarak bulduk. Nekroptoz PKOS için yararlı bir tanı aracı ve tedavi hedefi olabilir. Ancak, nekroptozla ilişkili gen imzaları ve PKOS'taki mekanizması hala belirsizdir.

2012'de Yan L. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; PKOS'lu hastaların endometriumunda apoptozis incelenmiş, endometrial implantasyon penceresi esnasında alınan örneklerde apoptozis kontrol grubuna göre daha az bulunmuştur [99]. Biz ise yeni bir hücre ölüm mekanizması olan nekroptozisi bu çalışmanın aksine PKOS hastalarının endometriumunda artmış olarak bulduk.

Nekroptozisin önemli düzenleyici moleküllerinden birkaçı RIPK1-RIPK3 molekülleridir [81]. Retikülofaji reseptörü CCPG1 aracılı STAT1/STAT3-(p) RIPK1-(p) RIPK3-(p) MLKL yolunun granüloza hücrelerinin nekroptozisini tetikleyebileceği ve prematür ovaryan yetersizlik gelişiminde rol oynayabileceği gösterilmiştir [98]. 2023 yılında Li H. ve ark. çalışmasında; retikülofajinin granüloza hücreleri üzerindeki etkisi CCPG1 ekspresyonunun yukarı ve aşağı

düzenlenmesi yoluyla araştırıldı. İlginç bir şekilde, granüloza hücre nekroptozu CCPG1 ekspresyonu yukarı ve aşağı düzenlendiğinde tetiklendi ve bu hücreler de kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında nekroptozis belirteç molekülleri P-RIPK3 ve P-MLKL'nin ekspresyonunun arttığı bulundu. Çalışmamızda bu duruma paralel olarak biz de P-MLKL ve P-RIPK3'ü PKOS hastalarında kontrol grubuna göre artmış bulduk. Metformin kullanmış PKOS grubuna göre ise daha azdı.

MLKL, RIPK1/RIPK3 kompleksi tarafından alınır ve fosforile edilir. MLKL oligomerize olur, böylece nekrozomu oluşturur [85]. MLKL oligomerlerinin oluşturduğu plazma zarındaki büyük gözenekler, iyon akışına, hücre şişmesine ve membran lizisine sebep olarak nekroptotik hücre ölümüne ve ardından hücre içi materyalin kontrolsüz salınımına yol açar [86]. Dolayısıyla MLKL ve p-MLKL nekroptotik hücre ölümü için önemli bir diğer biyomarkerdir. Daha önce yapılmış çalışmalarda granüloza hücrelerinde artmış MLKL sinyali ile atrezik foliküller ve menopoz arasında ilişki bulunmuştur [100]. Yaptığımız bu çalışmamızda da MLKL ve P-MLKL'nin PKOS hastalarının endometriumunda artması, PKOS'lu hastalarda artan implantasyon anomalileri ve infertilitenin artan nekroptozis ile ilişkili olabileceğini düşündürdü.

Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), İnterlökin 6 ailesine ait endometrial bezler tarafından salınan endometrial implantasyonda önemli rol aldığı gösterilmiş bir sitokindir [7]. Bu proteinin azalması implantasyon sürecinde bazı sorunlara yol açarak infertilite sebebi olabilir. PKOS hastalarında LIF geninin ifadesinin endometrial glandüler epitel hücrelerinde açıkça azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [101]. Bu durum bize PKOS'ta infertilite sebeplerinden birinin de bu olduğunu düşündürür. Çalışmamızda LIF proteinin PKOS'lu hasta endometriumunda azaldığını göstermemiz bunu doğrular niteliktedir.

HOXA10 ile ilgili 2021 de Japonya'da yapılan bir çalışmada, metforminin PKOS endometriumunda in vivo ve insan endometrial hücre hatlarında in vitro androjen reseptörü (AR) ve HOXA10 ekspresyonuna etkisi incelenmiş ve

PKOS'taki anormal endometrium üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur [102]. Bu çalışma sadece üç tane PKOS hastası incelenerek yapılmış biz ise 24 tanesi PKOS olmak üzere toplam 36 hastalık bir çalışma ile bunu gösterdik. 2019'da Zhai J. ve ark., miRNA'lar yolu ile HOXA10 sayısında değişiklikler olduğu ve buna metforminin etki edebileceğini bu sayede endometrial reseptivite ve infertilitede metforminin iyileştirici etkisinin olabileceğini göstermişlerdir [103]. Biz de yaptığımız bu çalışmada metformin kullanan PKOS hastalarında endometrial reseptivite belirteci olan HOXA10'u artmış olarak saptadık. Bu bulgular metforminin PKOS olgularında uygun hastalarda endometrial reseptivite ve implantasyon, dolayısıyla infertilite üzerine olumlu katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Metformin verilen PKOS'lu hasta grubunun hematoksilen eozin ile boyanmış preparatlarının incelemesinde, bez yapısının ve ödemin azaldığı; yüzey ve bez epitel kalınlığının kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen, polikistik over sendromlulara göre azaldığı bulundu. Bu sonuçlar, metforminin PKOS'lu kadınlarda karşılanmamış östrojen ve buna bağlı endometrial kalınlık ile oluşabilecek adet düzensizliği, infertilite ya da endometrium kanseri gibi hastalıklara karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini gösterdi.

RIPK1, RIP3, MLKL, P62'yi PKOS'lu kadınların endometriumunda artmış olarak bulundu. Bir hücre ölüm yolağı olan nekroptosis belirteçleri olan bu markerların, PKOS'lu kadınların endometriumunda artması nekroptosisin PKOS patogeneğinde önemli rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Nekroptosis markerları olan RIPK1, RIP3, P-RIPK, P-RIP3, P-MLKL, MLKL, P62; metformin kullanan PKOS'lu hastalarda PKOS grubuna göre azalmış bulundu. Bu sonuçlar bize metforminin PKOS tedavisinde nekroptosis üzerinden etkili olabileceğini düşündürdü.

HOXA10 ve LIF bilinen endometrial reseptivite markerları olup PKOS'lu kadınların endometriumunda kontrol grubuna göre az bulundu. Metformin kullanan PKOS'lu kadınlarda ise bu immünoreaktivitenin daha fazla olduğu bulundu. Bu sonuç da bize metforminin PKOS'lu kadınlarda endometriyal reseptiviteyi arttırmak için kullanılabileceğini gösterdi.

Nekroptosis markerlarının metformin kullanmış PKOS'lularda azalması, endometrial reseptivite markerlarının ise artmış olması bize metforminin PKOS'lu hastalarda nekroptosis yolağı üzerinden iyileştirici etkisi olabileceğini gösterebilir. Ancak daha geniş bir hasta grubu, metforminin farklı kullanım süreleri ile metformin kullanımının süre ve doz bağımlı hem nekroptosis üzerinden etkileri hem de implantasyon ve infertilite ile ilişkisini incelemek üzere daha yeni çalışmalar yapılması uygun olabilir.

VII. ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada metformin kullanan ve kullanmayan PKOS'lu kadınların endometrium örneklerinde nekroptozis belirteçleri olan RIPK1, RIP3, P-RIP3, P-RIP1, P-MLKL, MLKL, P62 düzeylerinin ve endometrial reseptivite belirteçleri olan HOXA10, LIF'in immünohistokimyasal teknik ile incelenerek bu sonuçların nekroptozis, metformin ve endometrial reseptivite arasındaki ilişkisini ortaya koymak, implantasyon ve infertilite üzerine etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmaya 12 PKOS, 12 Kontrol, 12 Metformin kullanmış PKOS olmak üzere toplam 36 hasta dahil edilmiştir. Menstrüel siklusun 19-22. günleri arasında Pipelle alınan endometrial örneklerin histolojik ve immünohistolojik değerlendirme yapılacak kısmı %10 formalin çözeltilisine konularak Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarına gönderilmiştir.

BULGULAR: Nekroptozis, PKOS'lu kadınların endometriumunda artmış bulunurken metformin kullanan PKOS'lu kadınların endometriumunda daha az artmış bulundu. Endometrial reseptivite, PKOS'lu kadınların endometriumunda azaldı fakat metformin kullanmış PKOS'lu kadınların endometriumunda daha az azalmış bulundu. Nekroptozis ve endometrial reseptivite arasında paralel bir ilişki olabileceğini düşündürdü.

SONUÇ: PKOS'lu kadınlarda artan infertilitenin bir nedeni de endometrium dokusundaki artmış nekroptozis olabilir. Metformin kullanmış PKOS hastalarında, kullanmayan PKOS hastalarına göre daha az nekroptozis görülmesi metforminin, bu yol üzerinden iyleştirici özellik gösterebileceğini düşündürmüştür. Ancak endometriumda artan nekroptozisin infertiliteye sebep olduğunu gösteren daha fazla sayıda hasta ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ANAHTAR KELİMELER: PKOS, Nekroptozis, Metformin, Endometrial reseptivite

VIII. ABSTRACT

AIM: This study aimed to investigate the levels of necroptosis markers RIPK1, RIP3, P-RIP3, P-RIP1, P-MLKL, MLKL, P62 and endometrial receptivity markers HOXA10, LIF in endometrial samples of PCOS women who used and did not use metformin using immunohistochemical techniques, to reveal the relationship between necroptosis, metformin and endometrial receptivity, and to investigate the effects of these results on implantation and infertility.

MATERIALS AND METHODS: A total of 36 patients were included in the study, 12 PCOS, 12 Control, and 12 Metformin-using PCOS. The endometrial samples taken with Pipelle between the 19th and 22nd days of the menstrual cycle were placed in 10% formalin solution and sent to the Histology and Embryology Laboratory for histological and immunohistological evaluation.

RESULTS: Necroptosis was found to be increased in the endometrium of women with PCOS, but less so in the endometrium of women with PCOS who used metformin. Endometrial receptivity was found to be decreased in the endometrium of women with PCOS, but less so in the endometrium of women with PCOS who used metformin. It suggested that there may be a parallel relationship between necroptosis and endometrial receptivity.

CONCLUSION: One of the reasons for increased infertility in women with PCOS may be increased necroptosis in the endometrial tissue. The fact that less necroptosis was observed in PCOS patients who used metformin compared to PCOS patients who did not use it suggests that metformin may have a healing effect through this pathway. However, more patients and more comprehensive studies are needed to show that increased necroptosis in the endometrium causes infertility.

KEYWORDS: PCOS, Necroptosis, Metformin, Endometrial receptivity

IX. KAYNAKLAR

1. Franks, S., *Polycystic ovary syndrome*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**(13): p. 853-861.
2. Dunaif, A., *Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis*. Endocrine reviews, 1997. **18**(6): p. 774-800.
3. Lord, J., I. Flight, and R. Norman, *Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome*. The Cochrane database of systematic reviews, 2003(3): p. CD003053-CD003053.
4. Goodarzi, M.O., et al., *Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis*. Nature reviews endocrinology, 2011. **7**(4): p. 219-231.
5. Batu ÖZtÜrk, A., İ. Kara, and S. Aktaş, *Polikistik over sendromunda uterus değişiklikleri*. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2023. **16**(2): p. 314-324.
6. Wilcox, A.J., D.D. Baird, and C.R. Weinberg, *Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy*. New England Journal of Medicine, 1999. **340**(23): p. 1796-1799.
7. Jiang, N.-X. and X.-L. Li, *The disorders of endometrial receptivity in PCOS and its mechanisms*. Reproductive Sciences, 2022. **29**(9): p. 2465-2476.
8. Uni, R. and M.E. Choi, *Novel roles of necroptosis mediator receptor-interacting protein kinase 3 in kidney injury*. Nephron, 2022. **146**(3): p. 259-263.
9. Stein, I.F. and M.L. Leventhal, *Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries*. American journal of obstetrics and gynecology, 1935. **29**(2): p. 181-191.
10. Vrbikova, J. and V. Hainer, *Obesity and polycystic ovary syndrome*. Obesity facts, 2009. **2**(1): p. 26-35.
11. Berger, J.J. and G.W. Bates Jr, *Optimal management of subfertility in polycystic ovary syndrome*. International journal of women's health, 2014: p. 613-621.
12. Teede, H., A. Deeks, and L. Moran, *Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan*. BMC medicine, 2010. **8**(1): p. 1-10.
13. Yıldırım, A., *Polikistik over sendromu'nda gözlenen biyokimyasal bozukluklar*. Konuralp Medical Journal, 2011. **3**(1): p. 42-48.
14. Speroff, L. and M.A. Fritz, *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 2005: lippincott Williams & wilkins.
15. Yılmaz, M., Ü. İsaoglu, and S. Kadanalı, *Polikistik over sendromuna güncel yaklaşım*. Haseki tıp bülteni, 2009. **47**(1): p. 1-5.
16. Poretsky, L., *On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states*. Endocrine Reviews, 1991. **12**(1): p. 3-13.
17. Geithövel, F., *A comment on the European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine consensus of the polycystic ovarian syndrome*. Reproductive BioMedicine Online, 2003. **7**(6): p. 602-605.

18. Insler, V., et al., *Polycystic ovaries in non-obese and obese patients: possible pathophysiological mechanism based on new interpretation of facts and findings*. Human Reproduction, 1993. **8**(3): p. 379-384.
19. Nestler, J.E., et al., *A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome*. The Journal of clinical endocrinology & metabolism, 1991. **72**(1): p. 83-89.
20. Dunaif, A. and D.T. Finegood, *Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1996. **81**(3): p. 942-947.
21. Tsilchorozidou, T., C. Overton, and G.S. Conway, *The pathophysiology of polycystic ovary syndrome*. Clinical endocrinology, 2004. **60**(1): p. 1-17.
22. Crosignani, P. and A. Nicolosi, *Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity*. Human reproduction update, 2001. **7**(1): p. 3-7.
23. Amato, P. and J.L. Simpson, *The genetics of polycystic ovary syndrome*. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology, 2004. **18**(5): p. 707-718.
24. Aydos, A., Y. Öztemur, and B.G. DEDEOĞLU, *Polikistik over sendromu ve moleküler yaklaşımlar*. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2016. **73**(1): p. 81-88.
25. HORTU, İ. and N. Karadaş, *Polikistik Over Sendromu Patofizyolojisi*. Türkiye Klinikleri Gynecology Obstetrics-Special Topics, 2019. **12**(5): p. 6-9.
26. NIH. *Polycystic Ovary/Ovarian Syndrome (PCOS) Underrecognized, Underdiagnosed, and Understudied* 2019 [cited 2024 22.09]; Available from: https://orwh.od.nih.gov/sites/orwh/files/docs/PCOS_Booklet_508.pdf.
27. Azziz, R., et al., *The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report*. Fertility and sterility, 2009. **91**(2): p. 456-488.
28. ESHRE, T.R. and A.-S.P.C.W. Group, *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome*. Fertility and sterility, 2004. **81**(1): p. 19-25.
29. Hull, M., *Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies*. Gynecological endocrinology, 1987. **1**(3): p. 235-245.
30. Yildiz, B.O. and R. Azziz, *The adrenal and polycystic ovary syndrome*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2007. **8**: p. 331-342.
31. Ehrmann, D.A., et al., *Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess*. New England Journal of Medicine, 1992. **327**(3): p. 157-162.
32. Trivax, B. and R. Azziz, *Diagnosis of polycystic ovary syndrome*. Clinical obstetrics and gynecology, 2007. **50**(1): p. 168-177.
33. Gambineri, A., et al., *Obesity and the polycystic ovary syndrome*. International journal of obesity, 2002. **26**(7): p. 883-896.
34. Apparao, K., et al., *Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome*. Biology of reproduction, 2002. **66**(2): p. 297-304.

35. Shang, K., et al., *Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome*. Reproductive sciences, 2012. **19**(7): p. 674-683.
36. Lee, M.-H., et al., *Hyperandrogenic milieu dysregulates the expression of insulin signaling factors and glucose transporters in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome*. Reproductive Sciences, 2020. **27**: p. 1637-1647.
37. Hacker, N. and J. Vermorken, *Cervical cancer*. In 'Berek & Hacker's Gynecologic oncology, Eds Berek JS and Hacker NF. 2015, Wolters Kluwer, Philadelphia.
38. Tzur, T., R. Kessous, and A.Y. Weintraub, *Current strategies in the diagnosis of endometrial cancer*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2017. **296**: p. 5-14.
39. Coşansu, G., *Diyabet: Küresel bir salgın hastalık*. Okmeydanı Tıp Dergisi, 2015. **31**: p. 1-6.
40. Yilmaz, M., U. Isaoglu, and S. Kadanali, *Current Approach to Polycystic Ovary Syndrome*. HASEKI TIP BULTENI-MEDICAL BULLETIN OF HASEKI, 2009. **47**(1): p. 1-5.
41. Daniilidis, A. and K. Dinas, *Long term health consequences of polycystic ovarian syndrome: a review analysis*. Hippokratia, 2009. **13**(2): p. 90.
42. Gm, R., *Hypertension and associated metabolic abnormalities-the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system*. N Engl J Med, 1996. **334**: p. 374-381.
43. Holte, J., et al., *Elevated ambulatory day-time blood pressure in women with polycystic ovary syndrome: a sign of a pre-hypertensive state?* Human Reproduction, 1996. **11**(1): p. 23-28.
44. Elting, M., et al., *Prevalence of diabetes mellitus, hypertension and cardiac complaints in a follow-up study of a Dutch PCOS population*. Human Reproduction, 2001. **16**(3): p. 556-560.
45. Society, B.C., et al., *JBS 2: Joint British Societies' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice*. Heart, 2005. **91**(Suppl 5): p. v1-v52.
46. Cheang, K.I., J.E. Nestler, and W. Futterweit, *Risk of cardiovascular events in mothers of women with polycystic ovary syndrome*. Endocrine Practice, 2008. **14**(9): p. 1084-1094.
47. Sirmans, S.M. and K.A. Pate, *Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome*. Clinical epidemiology, 2013: p. 1-13.
48. ŞİŞMANOĞLU, A. and B. BAYSAL, *Polikistik Over Sendromlu İnfertil Hastalarda Tedavi Seçenekleri*. Türk Üreme Tıbbi ve Cerrahisi Dergisi, 2017. **1**(1): p. 23-28.
49. Kim, L.H., A.E. Taylor, and R.L. Barbieri, *Insulin sensitizers and polycystic ovary syndrome: can a diabetes medication treat infertility?* Fertility and sterility, 2000. **73**(6): p. 1097-1098.
50. Klein, S., et al., *Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation*. Circulation, 2004. **110**(18): p. 2952-2967.

51. Moran, L.J., et al., *Dietary composition in the treatment of polycystic ovary syndrome: a systematic review to inform evidence-based guidelines*. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2013. **113**(4): p. 520-545.
52. TOPTAŞ, B. and A. Hilmiye, *Polikistik Over Sendromu Olan Kadınlara Uygulanan Beslenme ve Egzersiz Programının Semptomlara Etkisi*. Kadın Sağlığı Hemşireliği Dergisi, 2021. **7**(1): p. 85-96.
53. Çolgar, U., *Reproduktif Endokrinoloji ve İnfertilite*. İstanbul medikal yayıncılık, 2006: p. 1-283.
54. Women's, N.C.C.f. and C.s. Health, *Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems*. 2013: Royal College of Obstetricians & Gynaecologists.
55. FIÇICIOĞLU, C. and P. ÖZCAN, *Birinci Basamak Ovülasyon İndüksiyonu: Oral Ajanlar*. 2017.
56. Polyzos, N.P., et al., *Aromatase inhibitors for female infertility: a systematic review of the literature*. Reproductive biomedicine online, 2009. **19**(4): p. 456-471.
57. Franik, S., et al., *Aromatase inhibitors for subfertile women with polycystic ovary syndrome*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014(2).
58. Klement, A.H. and R.F. Casper, *The use of aromatase inhibitors for ovulation induction*. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 2015. **27**(3): p. 206-209.
59. ŞAHİN, G., et al., *İntrauterin inseminasyon (IUI) sikluslarında ovulasyon indüksiyonu*. TJRMS, 2017. **1**(1): p. 36-41.
60. Group, E.C.W., *Intrauterine insemination*. Human Reproduction Update, 2009. **15**(3): p. 265-277.
61. Costantino, D., et al., *Metabolic and hormonal effects of myo-inositol in women with polycystic ovary syndrome: a double-blind trial*. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2009. **13**(2).
62. Ciotta, L., et al., *Effects of myo-inositol supplementation on oocyte's quality in PCOS patients: a double blind trial*. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2011. **15**(5).
63. Kjotrød, S., V. von Düring, and S. Carlsen, *Metformin treatment before IVF/ICSI in women with polycystic ovary syndrome; a prospective, randomized, double blind study*. Human Reproduction, 2004. **19**(6): p. 1315-1322.
64. Gjönnaess, H., *Polycystic ovarian syndrome treated by ovarian electrocautery through the laparoscope*. Fertility and sterility, 1984. **41**(1): p. 20-25.
65. Palter, S. and D. Olive, *Reproductive physiology*. Novak's Gynecology, ed. Berek, SJ (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002), 2002. **159**.
66. Sadler, T.W., *Langman's medical embryology*. 2022: Lippincott Williams & Wilkins.
67. Pathare, A.D., I. Hinduja, and R.C. Mahadik, *Basic aspects of endometrial receptivity in PCOS patients*. Molecular Biology Reports, 2022. **49**(2): p. 1519-1528.
68. Hosseinzadeh, P., et al., *Polycystic ovary syndrome and the forgotten uterus*. F&S Reviews, 2021. **2**(1): p. 11-20.

69. Mirabolghasemi, G. and Z. Kamyab, *Changes of the uterine tissue in rats with polycystic ovary syndrome induced by estradiol valerate*. International Journal of Fertility & Sterility, 2017. **11**(1): p. 47.
70. Gardner, D., et al., *Yardımla üreme teknikleri temel kitabı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010.
71. Cohen, A.M., et al., *Comparing endometrial receptivity array to histologic dating of the endometrium in women with a history of implantation failure*. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2020. **66**(6): p. 347-354.
72. Griesinger, G., S. Trevisan, and B. Cometti, *Endometrial thickness on the day of embryo transfer is a poor predictor of IVF treatment outcome*. Human reproduction open, 2018. **2018**(1): p. hox031.
73. Díaz-Gimeno, P., et al., *A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature*. Fertility and sterility, 2011. **95**(1): p. 50-60. e15.
74. Cozzolino, M., et al., *Evaluation of the endometrial receptivity assay and the preimplantation genetic test for aneuploidy in overcoming recurrent implantation failure*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2020. **37**: p. 2989-2997.
75. Craciunas, L., et al., *Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis*. Human reproduction update, 2019. **25**(2): p. 202-223.
76. Lopes, I.M.R.S., et al., *Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation*. Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition), 2011. **57**(6): p. 688-695.
77. Lopes, I.M.R.S., et al., *Histomorphometric analysis and markers of endometrial receptivity embryonic implantation in women with polycystic ovary syndrome during the treatment with progesterone*. Reproductive Sciences, 2014. **21**(7): p. 930-938.
78. Hu, C., et al., *Immunophenotypic profiles in polycystic ovary syndrome*. Mediators of Inflammation, 2020. **2020**.
79. Wang, Y. and T.-D. Kanneganti, *From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways*. Computational and structural biotechnology journal, 2021. **19**: p. 4641-4657.
80. Coşkun, G. and H. Özgür, *Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması*. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2011. **20**(3): p. 145-158.
81. Canan, K., Y. ÇALIŞKAN, and Z. Yönden, *Apoptozis*. The Medical Journal of Mustafa Kemal University, 2012. **3**(11): p. 26-37.
82. Gözüaçık, D., *Otofaji analiz yöntemleri ve uygulama aşamaları (Autophagy analysis techniques and applications)*. 2011.
83. Yu, Z., et al., *Necroptosis: a novel pathway in neuroinflammation*. Frontiers in pharmacology, 2021. **12**: p. 701564.
84. Petrie, E.J., J.M. Hildebrand, and J.M. Murphy, *Insane in the membrane: a structural perspective of MLKL function in necroptosis*. Immunology and cell biology, 2017. **95**(2): p. 152-159.

85. Belavgeni, A., et al., *Ferroptosis and necroptosis in the kidney*. Cell chemical biology, 2020. **27**(4): p. 448-462.
86. Bertheloot, D., E. Latz, and B.S. Franklin, *Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death*. Cellular & molecular immunology, 2021. **18**(5): p. 1106-1121.
87. Cai, Z. and Z.-G. Liu, *Execution of RIPK3-regulated necrosis*. Molecular & cellular oncology, 2014. **1**(2): p. e960759.
88. Liu, X., et al., *Necroptosis inhibits autophagy by regulating the formation of RIP3/p62/Keap1 complex in shikonin-induced ROS dependent cell death of human bladder cancer*. Phytomedicine, 2023. **118**: p. 154943.
89. Khoury, M.K., et al., *Necroptosis in the pathophysiology of disease*. The American journal of pathology, 2020. **190**(2): p. 272-285.
90. Amooee, S., et al., *Comparing endometrial hysteroscopic and histological findings of infertile women with polycystic ovary syndrome and unexplained infertility: A cross-sectional study*. International Journal of reproductive biomedicine, 2020. **18**(1): p. 33.
91. Park, J.C., et al., *Endometrial histology and predictable clinical factors for endometrial disease in women with polycystic ovary syndrome*. Clinical and Experimental Reproductive Medicine, 2011. **38**(1): p. 42.
92. Venturoli, S., et al., *Episodic pulsatile secretion of FSH, LH, prolactin, oestradiol, oestrone, and LH circadian variations in polycystic ovary syndrome*. Clinical Endocrinology, 1988. **28**(1): p. 93-107.
93. Robinson, S., et al., *The relationship of insulin insensitivity to menstrual pattern in women with hyperandrogenism and polycystic ovaries*. Clinical endocrinology, 1993. **39**(3): p. 351-355.
94. Zhang, Y., et al., *Metformin ameliorates uterine defects in a rat model of polycystic ovary syndrome*. EBioMedicine, 2017. **18**: p. 157-170.
95. Elliott, J.L., et al., *Endometrial adenocarcinoma and polycystic ovary syndrome: risk factors, management, and prognosis*. Southern medical journal, 2001. **94**(5): p. 529-531.
96. Evans, J., et al., *Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease*. Nature Reviews Endocrinology, 2016. **12**(11): p. 654-667.
97. Degterev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nature chemical biology, 2005. **1**(2): p. 112-119.
98. Li, H., et al., *The activation of reticulophagy by ER stress through the ATF4-MAP1LC3A-CCPG1 pathway in ovarian granulosa cells is linked to apoptosis and necroptosis*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(3): p. 2749.
99. Yan, L., et al., *Expression of apoptosis-related genes in the endometrium of polycystic ovary syndrome patients during the window of implantation*. Gene, 2012. **506**(2): p. 350-354.
100. Blohberger, J., et al., *Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions?* Cell death & disease, 2015. **6**(3): p. e1685-e1685.

101. Kara, M., et al., *Evaluation of endometrial receptivity by measuring HOXA-10, HOXA-11, and leukemia inhibitory factor expression in patients with polycystic ovary syndrome*. Gynecology and minimally invasive therapy, 2019. **8**(3): p. 118-122.
102. Ohara, M., et al., *Metformin reduces androgen receptor and upregulates homeobox A10 expression in uterine endometrium in women with polycystic ovary syndrome*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2021. **19**: p. 1-10.
103. Zhai, J., et al., *Metformin regulates key microRNAs to improve endometrial receptivity through increasing implantation marker gene expression in patients with PCOS undergoing IVF/ICSI*. Reproductive Sciences, 2019. **26**(11): p. 1439-1448.

