

SİBEL DEMİRÇİ DELİPİNAR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018





**T.C.
STANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**FARELERDEKİ POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE miR-21
ve mTOR İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

SİBEL DEMİRCİ DELİPİNAR

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. İSMAİL SEÇKİN**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

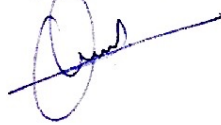
Bu çalışma 29.11.2018 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı Doktora
Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. İsmail SEÇKİN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi




Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Hakan EKMEKÇİ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Serap ARBAK
Acıbadem Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi Fakülte

BEYAN

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

SİBEL DEMİRCİ DELİPİNAR



İTHAF

Canım aileme ve sevgili eşim Berk Mansur DELİPINAR'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sayın hocalarım Prof Dr İsmail SEÇKİN, Prof Dr Meral KOYUTÜRK, Prof Dr Elif GÜZEL MEYDANLI, Doç. Dr. Gamze TANRIVERDİ, Doç. Dr. Gözde ERKANLI, Prof Dr Oktay ARDA, Prof Dr Faruk ALKAN, Prof. Dr Hüseyin OKTAR, Prof Dr Şenol ERTÜRKOĞLU, Prof Dr Mustafa TAŞYÜREKLİ'ye, bana bir aile ortamı yarattıkları ve yetişmemde gösterdikleri emek ve sabır için teşekkürü borç bilirim.

Başım her sıkıştığında yardımına koşan ve zamanını benden esirgemeyen sevgili Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya, Uzm. Dr. Melek Özlem KOLUSAYIN OZAR'a, Dr. Öğr. Gör. Şule AYLAY'a, Uzm. Dr. Hande KALEM TUTKAN'a, Uzm. Dr. Emine MAMAL'a, Uzm. Dr. Belisa KALECI'ye, Dr. Öğr. Gör. Aslı EMİNCİK'e, Elif YAPRAK SARAÇ'a, Uzm. Dr. Burcu BİLTEKİN'e, Tuğba EKİZ'e, Başak İŞILDAR'a, Serbay ÖZKAN'a, Halil İbrahim SAYGI'ya, Zehra SEZER'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Biyokimyasal çalışmalarında kıymetli zamanlarını bana ayıran ve bilgilerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Hakan EKMEKÇİ'ye ve Prof. Dr. Zeynep ÖZTÜRK'e; PCR analizlerimde bana sonsuz destek olan sayın Doç. Dr. Duygu GEZEN AK'a ve Merve ALAYLIOĞLU'na; RNA izolasyonu için bana laboratuvarlarını açan sayın Prof. Dr. Ahmet Gökhan AKKAN'a ve yardımları için Deniz ÖZEN'e; Aslı KİREÇTEPE AYDIN'a; morfolojik çalışmalarım için bana teknik destek sağlayan sayın Mehmet Ali DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destekleri ile moralimi hep yüksek tutmamı sağlayan, başta bir tanecik kardeşim Nilay SÖNMEZ'e, Dilek DUÇ ÇELTİK'e, Esin DUÇ URHAN'a, Oğuzhan URHAN'a, Tülin GÜNAY'a, Öznur YÜNCÜ'ye, Leyla Ayşe ERÖZENCİ'ye ve Belgin SOYSAL'a ayrı ayrı sonsuz teşekkür ederim. Sizler beni bu hayatta tamamlayan parçalarsınız ve iyi ki hayatımdasınız.

Hayatımın bu en zorlu sürecini tamamlamam esnasında sevgisini, desteğini, inancını ve sabrını benden esirgemeyen, hayat arkadaşım Berk Mansur DELİPINAR. Bu hayat sensiz çok anlamsız olurdu. Hayatıma anlam kattığın ve bana inandığın için teşekkür ederim.

Son olarak benim ben olmamı sağlayan, doğduğum günden bugüne benden bir tek gün sevgilerini, ilgilerini ve desteklerini eksik etmeyen, onlarsız bir dünya düşünemediğim canım annem Hediye DEMİRCİ ve birtanecik babam Necdet DEMİRCİ'ye her şey için, en çok da bana olan inançları için sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24841

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
4. BULGULAR.....	65
5. TARTIŞMA	131
KAYNAKLAR	142
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	157
ÖZGEÇMİŞ	158

TABLOLAR LİSTESİ

- Tablo 2-1** :Çeşitli otoritelere göre PKOS'un tanı kriterleri.
- Tablo 2-2** :Androjen uyarılı PKOS fare modelleri ve özellikleri.
- Tablo 4-1** :Deneyin ilk ve son günü (1. ve 21. günü) deney hayvanlarının ağırlıklıklarının istatistiksel olarak gösteren tablo.
- Tablo 4-2** :Deney gruplarındaki hayvanların, 21. gündeki serum E₂ ve P₄ hormon seviyelerini istatistiksel olarak gösteren tablo.
- Tablo 4-3** :Toplam folikül sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-4** :Primordial folikül sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-5** :Primer folikül sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-6** :Sekonder folikül sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-7** :Graaf folikül sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-8** :Atretik folikül sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-9** :Kistik folikül sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-10** :KL sayımı için One -Way ANOVA çoklu karşılaştırma testi sonuçları.
- Tablo 4-11** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki PCNA immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo
- Tablo 4-12** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki Cas-3 immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo
- Tablo 4-13** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki mTOR immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo
- Tablo 4-14** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2448) immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo
- Tablo 4-15** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2481) immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2-1** :PGH'leri, gelişimin 4. haftasından 6. haftasına kadar yolk kesesinin kaudal endodermal tabakasında bulunur.
- Şekil 2-2** :Dişi ve erkekte germ hücrelerinin mayotik nuklear olgunlaşması.
- Şekil 2-3** :Gelişimin değişik evrelerindeki ovaryum kesitleri. A. 4. Ay. Oogonialar, overin kortikal kısmında kümeler halinde gruplaşmıştır. Bazıları henüz mitoz aşamasındayken, bazıları da primer oosit haline gelmiş ve 1. mayotik bölünmenin profaz evresine girmiştir. B. 7. Ay. Oogoniaların hemen tümü 1. Mayotik bölünmenin profaz evresindeki primer oositlere dönüşmüş durumdadır. C. Doğumda. Oogonialar yoktur. Primer oositlerin her biri, tek tabaka folikül hücreleri tarafından çevrelenerek primordial folikülü oluşturmuş durumdadır. Oositler, ovulasyonun hemen öncesine kadar içinde kalacakları diploten evresindedirler.
- Şekil 2-4** :Genital sırtların ve paramezonefrik kanalların oluşumu. (A), (D) 5. ve 6. haftalarda, arka karın duvarında genital sırtlar oluşur. (B) Her paramezonefrik kanal, mezonefrik kanala kaudal olarak paralel (ok) uzanan sölomik epitel hücrelerinin çoğalması ve invajinasyonu ile gelişir. (C) Mezonefrik ve paramezonefrik kanalların birbirleri ile ve gelişmekte olan gonadlar ve böbrekler ile olan ilişkisi. (D) PGH'leri, periton boşluğunu kaplayan sölomik epitel hücrelerini, çoğalması ve somatik destek hücrelerini oluşturması için uyandır.
- Şekil 2-5** :Doku seviyesinde insan dişi gonad gelişimi. SRY yokluğunda, somatik destek hücreleri folikül hücrelerine farklılaşır. Bu hücreler, oositleri kuşatarak ovaryumun dış kortikal bölgesinde lokalize olma eğilimini gösteren primordial follükülleri oluşturur. Mezonefrik kanallar ve mezonefrik tübüller, epoöphoron, paroöphoron ve Gartner kistleri gibi kalıntılar dışında kaybolur. Paramezonefrik kanallar, oviduktlar, uterus ve vajinayı oluşturmak üzere gelişmeye devam eder.
- Şekil 2-6** :**A.** Gelişimin 7. haftasında, primitif cinsiyet kordonlarının dejenerasyonunu ve kortikal kordonların oluşumunu gösteren overin transvers kesiti. **B.** Gelişimin 5. ayında over ve genital kanallar. Medullar kordonlardaki dejenerasyona dikkat ediniz. Mezonefrik boşaltım tübülleri rete ile ilişkili değildir. Overin kortikal bölgesi, folikül hücreleri ile çevrelenmiş oogonya gruplarını barındırmaktadır.
- Şekil 2-7** :Transkripsiyon faktörlerine, büyüme faktörlerine ve dişi gonadların oluşturulmasından sorumlu çeşitli hücre tiplerinin kökenine genel bakış.
- Şekil 2-8** :Dişi üreme organlarının anatomik yapısı.
- Şekil 2-9** :Ovaryumda yumurtanın olgunlaşması ve ovulasyon.
- Şekil 2-10** :Primordiyal folikül. Şematik olarak 1. mayotik bölünmenin profazında duraklamaya girmiş olan oosit görülmektedir.
- Şekil 2-11** :Erken primer folikül. Gelişimin erken evresindeki bir primer folikülün şematik çizimi.
- Şekil 2-12** :Geç primer folikülün şematik çizimi.
- Şekil 2-13** :Sekonder folikülün şematik çizimi.
- Şekil 2-14** :Graaf folikülün şematik çizimi.

- Şekil 2-15** :Menstrual sikluskdaki ovaryan, endometrial ve hormonal değışiklikler.
- Şekil 2-16** :Ovaryan siklustaki mayotik olaylar ve zamanlama.
- Şekil 2-17** :Foliküler gelişim.
- Şekil 2-18** :Ovaryumdaki östrojen, progesteron ve androjen üretiminin, LH ve FSH ile, iki hücreye ve iki gonadotropin sistemine dayalı olarak düzenlenmesi. LH hem teka hem de GH'leri üzerine etki eder; FSH sadece GH'leri üzerine etki eder. FSH ve LH, G-proteinine bağılı reseptörler aracılığıyla adenilat siklazı uyarır. Adenosin trifosfattan (ATP) üretilen siklik adenosin monofosfat (cAMP), steroidojenik enzimleri uyaran protein kinaz A'yı aktive eder. Gs, G proteini; GDP, guanozin difosfat; GTP, guanozin trifosfat 53.
- Şekil 2-19** :Ovaryumda steroid hormonların biyosentez yolları. $\Delta 4$ yolağı, pregnenolonu progesterona dönüştürür ve korpus luteumdaki esas yolaktır. $\Delta 5$ yolağı, pregnenolonu androjenlere ve daha sonra östrojenlere dönüştürür ve teka hücrelerinde tercih edilen yolaktır. Ayrıca, sadece adrenal bezde görülen CYP21 ve CYP11a'nın bir sonucu olarak, 17OH-progesteronun, aldosterona ve kortizole dönüştürülmesi de gösterilmiştir. Geri dönüşü olmayan reaksiyonlar tek bir okla; geri dönüşümlü reaksiyonlar çift oklarla gösterilmektedir 53.
- Şekil 2-20** :PKOS'un farklı fenotipleri.
- Şekil 2-21** :mTOR sinyal yolağı.
- Şekil 2-22** :miRNA biyosentezi.
- Şekil 3-1** :Östrus periyodlarını tanımlama aracı. Bu araç, östrus döngüsünün 4 periyodu boyunca, değışiklik gösteren hücre türlerinin ve oranlarının şematik bir temsildir. Daire işaretindeki çizgiler, östrus fazının değıştiğı alanları işaret etmektedir. Her bir kadranın (2 çizgi arası) boyutu, kabaca o periyodun uzunluğunu temsil eder. Döngünün tamamı 4-5 gün sürer. Bu grafiğı kullanmak için, vajinal smear hücreleri incelenir ve her hücre tipinin göreceli sayısı belirlenir. Sonra, grafiğın üzerine hayali bir ok yerleştirilir. Yerleştirilen bu ok, smearde görülen hücre türleri ve oranları okun altında görününceye kadar saat yönünde hareket ettirilir. Okun hareketi sabitlenince, bulunduğu kadrandaki faz, östrus fazını işaret eder.
- Şekil 3-2** :Balb/c farelerin östrus fazlarına göre dış genital organlarının görünümü.
- Şekil 3-3** :ELISA testinde E_2 bağlanmasını gösteren standart eğri grafiğı.
- Şekil 3-4** :ELISA testinde P bağlanmasını gösteren standart eğri grafiğı.
- Şekil 4-1** :Kontrol grubuna ait vajinal smear preparatları. Kontrol grubundaki deney hayvanları, normal östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 2 tam siklusu tamamlamışlardır.
- Şekil 4-2** :PKOS-Sham (SY) grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile SY enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, normal östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 2 tam siklusu tamamlamışlardır. (Büyütme x40).
- Şekil 4-3** :İnhibisyon-Sham (DMSO) grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile DMSO enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, bir miktar uzamayla birlikte normal östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 1 tam, bir de yarım siklusu tamamlamışlardır. (Büyütme x40).
- Şekil 4-4** :PKOS grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile DHEA enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, uzamış östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 1 tam siklusu bile tamamlamamışlardır.

(Büyütme x40).

- Şekil 4-5** :PKOS+İnhibisyon grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile DHEA ve KU-0063794 enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, uzamış östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 1 tam siklusu bile tamamlayamamışlardır. (Büyütme x40).
- Şekil 4-6** :İnhibisyon grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile KU-0063794 enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, düzensiz östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 2 siklus tamamlamış ancak hiç östrus fazına girmemiştir. (Büyütme x40).
- Şekil 4-7** :Deneyin ilk ve son günü (1. ve 21. günü) deney hayvanlarının ağırlıklarının gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-8** :Deney gruplarındaki hayvanların, 21. gündeki serum E_2 ve P_4 hormon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-9** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan toplam folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-10** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan primordial folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-11** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan primer folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-12** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan sekonder folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-13** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan Graaf folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-14** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan atretik folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-15** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan kistik folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-16** :Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan KL sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-17** :Gruplardaki deney hayvanlarının genel over morfolojilerini gösteren resim. A. Kontrol grubu; B. SY grubu; C. DMSO grubu; D. PKOS grubu; E. PKOS+İnhibisyon grubu; F. İnhibisyon grubu. (H&E; x4).
- Şekil 4-18** :Kontrol grubuna ait ovaryumlardan kesitler. Siyah yıldız: Primordiyal folikül; PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; GF: Graaf folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum. (H&E; A,B,C,D,F x20; E x40)
- Şekil 4-19** :Kontrol grubuna ait ovaryum yapısını gösteren resim. KL: Korpus luteum; SF: Sekonder folikül; Mavi yıldız: Primer folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; Siyah dikdörtgen: Şekil 4-13'de büyütülen alan. (Masson'un trikrom boyası

x10).

- Şekil 4-20** :Şekil 4-12’de siyah çerçeve içindeki alanı gösteren resim. Sarı yıldız: Primordiyal folikül; PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; FH: Folikül hücreleri; GH: Granüloza hücreleri, Siyah ok: Zona pellusida (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-21** :Kontrol grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. GF: Graaf folikül; Siyah yıldız (*): Atretik folikül. (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-22** :Kontrol grubuna ait bir KL’un yapısını gösteren resim. KL: Korpus luteum. (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-23** :SY grubuna ait ovaryumlardan kesitler. PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; GF: Graaf folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum. (H&E; A,C,E x10, B,D,F x20).
- Şekil 4-24** :SY grubuna ait ovaryum yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum; Siyah dikdörtgen: Şekil 4-18’de büyütülen alan. (Masson’un trikrom boyası, x10).
- Şekil 4-25** :Şekil 4-17’de siyah çerçeve içindeki alanı gösteren resim. PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; ZP: Zona pellusida (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-26** :SY grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. GF: Graaf folikül; (PF): Primer folikül. (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-27** :Kontrol grubuna ait bir KL’un yapısını gösteren resim. (PF): Primer folikül; (SF): Sekonder folikül; (KL): Korpus luteum. (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-28** :DHEA grubuna ait ovaryum kesitleri. Siyah yıldız: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; GF: Graaf folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum; ZP: Zona pellusida. (H&E; A,x10; B,C,D,E x20; Fx40).
- Şekil 4-29** :DHEA grubuna ait ovaryum yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; GF: Graaf folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; Siyah dikdörtgen: Şekil 4-23’de büyütülen alan. (Masson’un trikrom boyası, x10).
- Şekil 4-30** :DHEA grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; GF: Graaf folikül; KH: Kümüls hücreleri; GH: Granüloza hücreleri; ZP: Zona pellusida (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-31** :DHEA grubuna ait Sekonder foliküllerin yapısını gösteren resim. SF: Sekonder folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; Siyah ok: Ödematöz stroma. (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-32** :DHEA grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. GH: Granüloza hücreleri; ZP: Zona pellusida (Masson’un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-33** :PKOS grubuna ait ovaryumlardan kesitler. Siyah yıldız: Kistik foliküller; Siyah ok: Kistik foliküllerin lümenine dökülen GH’leri; Mavi ok: Kistik foliküllerin içerisindeki dejeneratif oositler. (H&E; A,B,C x10; D,F x20; E x40).
- Şekil 4-34** :PKOS grubuna ait foliküllerden kesitler. Siyah yıldız: Kistik foliküller; Mavi yıldız: Atretik foliküller; Siyah ok: Dejenere olan ZP’lar; Mavi ok: Kistik foliküllerin içerisindeki dejeneratif oositler; GH: Granüloza hücreleri. (H&E; A,B,C x20; D,E,F x40).
- Şekil 4-35** :**A:** PKOS grubuna ait bir ovaryumdan ovule edilen bir oosit. **B:** A şeklinde dikdörtgen içerisindeki alanın büyütülmüş hali. Siyah yıldız: Dejenere oosit. Siyah ok: bütünlüğünü kaybetmiş ve dejenere olmuş ZP; Mavi ok: Oosit ile

birlikte atılan, genellikle piknotik nukleuslu olan kümülüs hücreleri. (Masson'un trikrom boyası; A x10; B x40).

- Şekil 4-36** :PKOS grubuna ait ovaryum yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; Siyah yıldız: Kistik folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül (Masson'un trikrom boyası, x10).
- Şekil 4-37** :PKOS grubuna ait kistik bir folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Kistik folikül; Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi ok: Kistik folikül içerisindeki dejenere oosit; Mavi yıldız: Sekonder folikül içerisindeki dejenere oosit; Siyah daireler: Kistik folikül içerisine dökülmüş olan GH'leri; Çift başlı ok: Kistik folikülü çevreleyen incelmış GH tabakası (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-38** :PKOS grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi ok: Birbirinden ayrılmalar gösteren GH'leri. (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-39** :PKOS grubuna ait bir ovaryumun yapısını gösteren resim. A: Siyah dikdörtgen içerisindeki alanın büyütülmüş resmi. Nadiren de olsa görülen bir KL'un oldukça açık renkli sitoplazmaya sahip olan lutein hücreleri dikkat çekici. B: Siyah daire içerisindeki bir sekonder folikülün büyütülmüş resmi. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; GH: Birbirinden ayrılmalar gösteren ve genellikle piknotik nukleuslara sahip olan GH'leri. (Masson'un trikrom boyası, Küçük resim x10; Ax40; Bx40).
- Şekil 4-40** :PKOS+İNH grubuna ait foliküllerden kesitler. Siyah yıldız: Kistik foliküller; Mavi yıldız: Dejeneratif oositler; Siyah ok: ZP'dan infiltre olan makrofaj benzeri hücreler; Mavi ok: Dilate kan damarları. (H&E; A,B x10; C,D x20; E,F x40).
- Şekil 4-41** :PKOS+İNH grubuna ait bir ovaryumun yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Kistik folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül (Masson'un trikrom boyası, x10).
- Şekil 4-42** :PKOS+İNH grubuna ait bir sekonder folikülün ve KL'un yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum. (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-43** :PKOS+İNH grubuna ait kistik bir folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Kistik folikül; Siyah ok: Kistik folikül içerisine dökülmüş olan GH'leri; Mavi yıldız: Atretik folikül (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-44** :PKOS+İNH grubuna ait kistik ve sekonder bir folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; Çift başlı ok: Kistik folikülü çevreleyen incelmış GH tabakası (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-45** :PKOS+İNH grubuna ait bir ovaryumun yapısını gösteren resim. A: Siyah A dairesi içerisindeki alanın büyütülmüş resmi. Primer bir folikül içerisinde, oldukça fazla dejenerasyona uğramış olan oosit ve ZP dikkat çekici. B: Siyah B dairesi içerisindeki bir sekonder ve kistik folikülün büyütülmüş resmi. C: Siyah C dairesi içerisindeki foliküllerin büyütülmüş resmi. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi yıldız: Kistik folikül. (Masson'un trikrom boyası; Küçük resim x10; Ax40; Bx40; Cx40).
- Şekil 4-46** :İNH grubuna ait ovaryumlardan ve bu ovaryumlara ait foliküllerden kesitler. Siyah yıldız: Dejeneratif oositler; Mavi ok: Ödematöz stroma; Siyah ok: Dilate kan damarları. (H&E; A,B x10; C,D x20; E,F x40).
- Şekil 4-47** :İNH grubuna ait bir ovaryumun ve bu ovaryumdaki Graaf foliküllerin yapısını gösteren şekil. A,E ve F: Dejeneratif bir primer oosit ve bozuk yapıdaki bir ZP içeren sekonder foliküller. B,C,D: Antrumlarında dökülmüş GH'leri içeren ve

dejeneratif primer oositler içeren Graaf foliküller. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Mavi yıldız: Atretik folikül. Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi ok: Dökülmüş GH'leri. (Masson'un trikrom boyası; Küçük resim x10; Ax40; Bx40; Cx40; Dx40; Ex40; Fx40).

- Şekil 4-48** :İNH grubundaki bir ovaryumdaki çeşitli foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Dejenere oositler; Mavi ok: Dilate kan damarları;; Siyah ok: Ödematöz stroma. (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-49** :İNH grubundaki bir ovaryumdaki primer ve sekonder foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Sekonder foliküldeki dejeneratif oosit; Mavi yıldız: Primer foliküllerdeki dejeneratif oositler; Mavi ok: Ödematöz stroma; Siyah ok: Dejenere ZP. (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-50** :İNH grubundaki bir ovaryumda atreziye giden foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP. (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-51** :İNH grubundaki bir ovaryumda atreziye giden foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Mavi yıldız: Atretik folikül; Siyah ok: Dilate kan damarı. (Masson'un trikrom boyası, x40).
- Şekil 4-52** :Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki PCNA immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-53** :Deney gruplarına ait PCNA immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-54** :Deney gruplarına ait PCNA immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-55** :Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki Cas-3 immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-56** :Deney gruplarına ait Cas-3 immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-57** :Deney gruplarına ait Cas-3 immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-58** :Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki mTOR immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-59** :Deney gruplarına ait mTOR immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-60** :Deney gruplarına ait mTOR immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-61** :Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2448) immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

- Şekil 4-62** :Deney gruplarına ait P-mTOR (Ser 2448) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-63** :Deney gruplarına ait P-mTOR (Ser 2448) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-64** :Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2481) immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).
- Şekil 4-65** :Deney gruplarına ait P-mTOR (Ser 2481) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-66** :Deney gruplarına ait P-mTOR (Ser 2481) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.
- Şekil 4-67** :Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki miR-21 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

4E-BP1	:4E bağlayıcı protein 1 (4E-binding protein)
ACTH	:Adrenokortikotropik hormon
AMH	:Anti Mülleryan Hormon
AT	:Ataksi telanjiektazi
ATP	:Adenosin trifosfat
BMP15	:Kemik morfogenezik protein 15 (bone morphogenic protein 15)
Ca⁺²	:Kalsiyum
cAMP	:Siklik adenosin monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate)
Cas-3	:Kaspaz-3 (Caspase-3)
CC	:Klomifen sitrat (clomiphene citrate)
DAB	:3,3'-diaminobenzidin
DHEA	:Dehidroepiandrosteron
DHT	:Dehidrottestosteron
DMSO	:Dimetilsülfoksit
E₂	:Östrojen (estrogen)
eEF2K	:Ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz (Eukaryotic elongation factor-2 kinase)
EGF	:Epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor)
eIF4B	:Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4B (Eukaryotic translation initiation factor 4B)
ELISA	:Enzim bağlı immün assay (Enzym-linked immun sorbent assay)
ER	:Endoplazmik retikulum
ERα	:Östrojen reseptörü α (estrogen receptor α)
ERβ	:Östrojen reseptörü β (estrogen receptor β)
FSH	:Folikül stimulan hormon (follicle stimulating hormone)
Gcll	:Germ cell-less
Gcna1	:Germ hücre nükleer antijeni 1 (germ cell nuclear antigen 1)
GDF-9	:Büyüme farklılaştırma faktörü-9 (Growth differentiation factor-9)
GnRH	:Gonadotropin-salgılatıcı hormon (gonadotropin-releasing hormone)
GSK-3β	:Glikojen sentaz kinaz 3 β
H&E	:Hematoksilen & Eozin
H₂O₂	:Hidrojen peroksit
hCG	:İnsan koryonik gonadotropini (Human chorionic gonadotropin)
HCl	:Hidroklorik asit
I-IGF	:İnsülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor)
IRS1	:İnsülin reseptör substratı 1
KBG	:Kortikosteroid-bağlayıcı globulin
KL	:Korpus luteum
LH	:Luteinleştirici hormon
mRNA	:Messenger RNA
mTOR	:Memeli rapamisin hedefi (mammalian target of rapamycin)
mTORC-1	:mTOR kompleksi-1 (mammalian target of rapamycin complex-1)
mTORC-2	:mTOR kompleksi-2 (mammalian target of rapamycin complex-2)
mVh	:Murine vasa homolog
OHSS	:Ovaryan hiperstimülasyon sendromu
OK	:Ovaryum kanseri
OMI	:Oosit maturasyon inhibitörü
P₄	:Progesteron
PCNA	:Proliferating Cell Nuclear Protein
PGH	:Primordial germ hücresi
PI3K	:Fosfatidilinositol 3-kinaz (phosphatidylinositol-3- kinase)

PIKK	:Fosfatidilinositol kinaz-ilişkili kinaz (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase)
PKOM	:Polikistik ovaryan morfoloji
PRA	:Progesteron reseptörü A
PRB	:Progesteron reseptörü B
pre-miRNA	:Prekürsör miRNA
pri-miRNA	:Primer miRNA
RISC	:RNA ile indüklenen susturucu kompleksi (RNA-induced silencing complex)
RKT	:Reseptör tirozin kinazlar
RNA	:Ribonükleik asit
RT-PCR	:Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time-polymerase chain reaction)
S6K1	:S6 kinaz 1
Sdf-1	:Stromal hücre kaynaklı faktör-1 (stromal cell-derived factor-1)
SGK1	:Serum ve glukokortikoid kaynaklı protein kinaz 1
SRY	:Y kromozomundaki cinsiyet belirleme bölgesi (sex determining region on Y)
SY	:Susam yağı
TDF	:Testis belirleme faktörü (testis-determining factor)
TGF-β	:Dönüştürücü büyüme faktörü- β (transforming growth factor- β)
VEGF	:Vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor)
WNT4	:Wingless tipte MMTV integrasyon bölgesi ailesi üyesi 4 (Wingless-type : : MMTV integration site family, member 4)
ZP	:Zona pellusida

ÖZET

DEMİRCİ DELİPİNAR, S. (2018). Farelerdeki Polikistik Over Sendromu Modelinde miR-21 ve mTOR İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Abd. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Anovulatuvar infertilitenin en yaygın nedenlerinden biri olan polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınlarda görülen kompleks bir endokrinopatidir ve çevresel faktörlerin bu hastalığın kökeni ve gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan PKOS çalışmalarında, hücrenin proliferasyonu, büyümesi, metabolizması gibi süreçlerde rol oynayan bir serin/tironin kinaz olan mammalian target of rapamycin (mTOR) ile PKOS arasında bir ilişki olabileceği ortaya konulmuştur. Kodlama yapmayan küçük RNA molekülleri olan mikroRNA (miRNA)'lar da, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve hormon biyosentezi gibi çeşitli hücresel, fizyolojik ve patolojik süreçlerin post transkripsiyonel düzenlenmesinden sorumludurlar. Ovaryumda eksprese edilen çok sayıda miRNA, ovaryan bozukluklardaki folikül büyümesi, atrezi, ovulasyon ve steroidogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar ve bunlardan en önemlilerinden biri miRNA-21 (miR-21)'dir.

Biz de buradan yola çıkarak, farelerdeki deneysel PKOS modelinde, hücresel fonksiyonlara ortak yollar üzerinden etki eden mTOR ve miR-21 arasındaki ilişkiyi incelemeyi hedefledik. Bunun için 42 adet 22-25 günlük dişi Balb/c fareyi 6 deney grubuna ayırdık: Kontrol grubu, PKOS Sham grubu, PKOS grubu, İnhibisyon grubu, PKOS +İnhibisyon grubu, İnhibisyon Sham grubu. Hayvanlarda PKOS oluşturmak için 20 gün boyunca 0,01 ml %95 etanol + 0,09 ml susam yağı (SY)'nda çözünmüş 6mg/100g dehidroepiandrosteron (DHEA) enjeksiyonu subkutan olarak; mTOR inhibisyonu yapmak için 0,1 ml, dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözünmüş 1 mg/100g KU-0063794 enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulandı. Deney sonunda hayvanlardan elde edilen serum örneklerinden ELISA (enzym-linked immunsorbent assay) yöntemi ile östrojen (E₂) ve progesteron (P₄) hormon seviyeleri ölçüldü.

Hayvanların ovaryumlarından biri, histomorfolojik incelemeler için rutin doku tabibinden geçirildi ve elde edilen kesitlere Hematoksilin-Eosin (H&E) ve Masson'un trikrom boyası uygulandı. İmmunohistokimyasal incelemeler için mTOR, P-mTOR (Ser-2448), P-mTOR (Ser-2481), Proliferating Cell Nuclear Protein (PCNA) ve caspase-3 (Cas-3) primer antikorları uygulandı. RT-PCR (Real time-polymerase chain reaction) analizi için, hayvanların diğer ovaryumlarından total RNA (ribonükleik asit) izolasyonu yapıldı ve gen amplifikasyonu için mir-21 primeri kullanıldı. Çalışmadan elde edilen veriler One-Way ANOVA testi ile uygun istatistiksel metodlar kullanılarak değerlendirildi.

PKOS grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları, hormon E₂ ve P₄ seviyeleri, PCNA, Cas-3, mTOR, P-mTOR (Ser-2448) ve P-mTOR (Ser-2481) immünreaktiviteleri kontrol grubuna göre artmıştı. mTOR inhibisyonu yapılan PKOS+İNH grubunda, vücut ağırlıkları artış göstermezken, İNH grubunda azalmıştı. mTOR inhibisyonu, granüloza hücre (GH) proliferasyonu ve apoptozunu da azaltmıştı. Ancak hormon seviyelerinde, kontrole yakın bir iyileşme gözlenmedi. Ayrıca mTOR inhibisyonunun, morfolojik olarak PKOS'ta gördüğümüz dejeneratif bulguları iyileştirmediği gibi, sağlıklı bir ovaryumda da ciddi bozulmalara ve anovulasyona neden olması dikkat çekiciydi. PKOS grubundaki yüksek miR-21 seviyesine, inhibisyon gruplarındaki yüksek miR-21 seviyelerinin eşlik etmesi de, mTOR inhibisyonunu, PKOS tedavisinde kullanılabilecek bir alternatif olmaktan uzaklaştırıyordu.

Elde ettiğimiz bu verilerin, ileri çalışmalar ile birlikte, PKOS (ön)tanı ve tedavisinde geliştirilecek yöntemler için ışık tutacağını öngörüyoruz.

Anahtar Kelimeler : Polikistik over sendromu, mTOR, MicroRNA, miR21, ovaryum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24841

ABSTRACT

DEMİRCİ DELİPİNAR, S. (2018). Investigation of miR-21 and mTOR relation in polycystic ovary syndrome model in mice. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. Doctoral Thesis, İstanbul. 2018.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) which is one of the most common causes of anovulatory infertility is a complex endocrinopathy affecting women in the reproductive age group and it is known that environmental factors have a role in the origin and development of this disease. In the PCOS studies, it is revealed that there may be a relation between PCOS and the mammalian target of rapamycin (mTOR) which is a serine/threonine kinase having a role in processes such as proliferation, growth and metabolism of a cell. Also, microRNAs (miRNAs) which are noncoding small RNA molecules are responsible for post-transcriptional regulation of a variety of cellular, physiological and pathological processes such as cellular proliferation, differentiation, apoptosis and hormone biosynthesis. A large number of miRNAs expressed in ovary play a crucial role in regulation of follicular growth, atresia, ovulation and steroidogenesis in ovarian disorders and one of the most important ones is miRNA-21 (miR-21).

Starting from this point, we aim at investigating the relation between miR-21 and mTOR which affect the cellular functions through common pathways in experimental PCOS model in mice. For this experiment, we divided 42 Balb/c female mice (22-25 weeks of age) into 6 experimental groups: Control group, PCOS Sham group, PCOS group, Inhibition group, PCOS+Inhibition group, Inhibition Sham group. For 20 days, the mice were subcutaneously injected with 6mg/100g of dehydroepiandrosterone (DHEA) dissolved in 0.01 ml of 95% ethanol+0.09 ml of sesame oil (SO) in order to generate PCOS; and were intraperitoneally injected with 1 mg/100g of KU-0063794 dissolved in 0,1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) in order to provide mTOR inhibition. At the end of the experiment, estrogen (E₂) and progesterone (P₄) hormone levels of the serum samples from the mice were measured via ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). One of the ovaries of the mice was subjected to a routine tissue processing for histomorphological investigation and Hematoxylin-Eosin (H&E) and Masson's trichrome stains were applied onto the obtained section. For immunohistochemical investigations, mTOR, P-mTOR (Ser-2448), P-mTOR (Ser-2481), Proliferating Cell Nuclear Protein (PCNA) and caspase-3 (Cas-3) primer antibodies were applied. For RT-PCR (Real time-polymerase chain reaction) analysis, a total RNA (ribonucleic acid) isolation from the other ovary of the mice is performed and mir-21 primer was used for gene amplification. Data obtained from this study were evaluated via One-Way ANOVA test by using convenient statistical methods.

The body weights, E₂ and P₄ hormone levels, PCNA, Cas-3, mTOR, P-mTOR (Ser-2448) and P-mTOR (Ser-2481) immunoreactivities of the mice in PCOS group increased compared to the control group. In the PCOS+INH group performed mTOR inhibition, the body weights did not show any increase, however there was a reduction in INH group. The mTOR inhibition also reduced the GH cellular proliferation and apoptosis. However, a near-control improvement was not observed in hormone levels. Moreover, it was remarkable that the mTOR inhibition did not improve the degenerative findings morphologically seen in PCOS and it caused serious degenerations and anovulation in a healthy ovary. Accompaniment of high levels of miR-21 in inhibition groups to the high level of miR-21 in PCOS group prevented mTOR inhibition from being an alternative to be used in PCOS treatment.

We anticipate that these data will shed light on the methods to be developed for pre-diagnosis and treatment of PCOS along with further studies.

Key Words: Polycystic ovary syndrome, mTOR, MicroRNA, miR21, ovary.
The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.
Project No: 24841

1. GİRİŞ VE AMAÇ

PKOS, üreme çağındaki kadınların % 5-10'unda görülen, ovaryumda 10 veya daha fazla foliküler kistin bulunmasıyla karakterize, kompleks bir endokrinopatidir. Sergilediği değişken klinik bulgular nedeniyle son derece heterojen bir sendrom olduğu için, tanı kriterleri tartışma konusu olmuştur. Pekçok otorite, 2003 Rotterdam/ASRM-sponsorluğundaki PKOS Fikir Birliği Çalışma Grubu'nun kurallarını kabul eder ve buna göre PKOS tanısı için şu kriterlerden en az ikisinin mevcut olması gerekmektedir: a) Oligoovulasyon ve/veya anovulasyon; b) Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm; c) Ultrason incelemesinde polikistik ovaryan morfoloji (PKOM) ¹. Hastalık menarşla başlar ve belirtiler genellikle oligomenor, amenor, anovulasyon, çok sayıda antral folikül varlığı, dolaşımdaki luteinleştirici hormon (LH)'ın aşırı sekresyonu ve folikül stimulan hormon (FSH)'un düşük veya ortalama seviyeleri, obezite, hirsutizm ve insülin direncidir ². PKOS ayrıca hipotalamo-hipofizyal dissenkronizasyon, anormal pulsatil gonadotropin salgısı, granüloza/teka hücre disfonksiyonu ve hiperandrojenizm ve hiperinsülinemi de dahil olmak üzere çeşitli metabolik bozukluklar gösterir ³⁻⁸. Anovuluar infertilitenin en yaygın nedenlerinden biri olan PKOS'un mekanizması hala belirsiz olmakla birlikte, çevresel, epigenetik ve hormonal faktörlerin bu hastalığın gelişmesinde önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir ⁹⁻¹¹.

mTOR, sık rastlanan bir serin/tironin kinazdır ve hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, metabolizma, apoptoz gibi hücresel faktörlerde rol oynayan, farklı stres etkenlerinin, büyüme faktörlerinin, besinlerin ve hormonların kontrolüyle ilişkili olan bir moleküldür ¹²⁻¹⁶. mTOR, hücre büyümesi ve akıbetinden sorumlu olan iki multipotent kompleks oluşturur: mTOR kompleksi-1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi-2 (mTORC2) ¹²⁻¹⁷. mTOR sinyalinin puberte başlangıcı ve gonadotropin salgımında önemli roller oynadığı, ayrıca mTOR inhibitörü olan rapamisinin dişi sıçanlarda LH sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir ¹⁸. Ayrıca yapılan PKOS çalışmalarında, mTOR sinyalizasyonunda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık bulunmamışken, P-mTOR (Ser-2448) protein seviyeleri önemli derecede artış göstermiştir ¹⁹. Bu çalışmalar sonucunda, mTOR sinyal yolağının, PKOS mekanizması ve ovaryan fonksiyonlar ile yakın ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.

miRNA'lar, endojen, küçük, kodlamayan, tek-zincirli, 18-22 nükleotid uzunluğundaki RNA molekülleridir²⁰. miRNA'lar, hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz ve hormon biyosentezi gibi çeşitli hücreyel, fizyolojik ve patolojik süreçlerin, posttranskripsiyonel düzenlenmesinden sorumludurlar. Ovaryumda eksprese edilen çok sayıda miRNA, ovaryan bozukluklardaki folikül büyümesi, atrezi, ovulasyon ve steroidogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. miR-21, ovaryumdaki farklı gelişim süreçlerinde, en fazla eksprese edilen miRNA'lardan biridir. Son çalışmalar, miRNA'ların farklı ekspresyonlarının ve disregülasyonlarının, ovaryum kanseri (OK), PKOS ve prematüre ovaryan yetmezlik gibi ovaryan hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir^{21,22}. Ayrıca miR-21, PKOS hastalarında, obezite ve dolaşımdaki androjen konsantrasyonundan etkilenen metabolik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır²³.

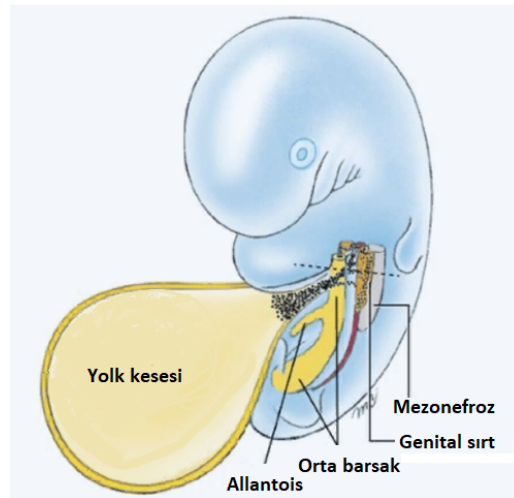
Biz de buradan yola çıkarak bu çalışmada, farelerdeki deneysel PKOS modelinde, hücreyel fonksiyonlara benzer yolaklar üzerinden etki eden mTOR ve miR-21 arasındaki ilişkiyi incelemeyi hedefliyoruz. Bunun için, mTOR sinyal yolağını hem sağlıklı, hem de PKOS'lu farelerde inhibe ederek, inhibisyon yapılmayan gruplarla karşılaştırmalı olarak hormon seviyelerindeki ve hücreyel olaylardaki farkı ortaya koymayı amaçlıyoruz. Ayrıca mTOR inhibisyonunun gruplardaki miR-21 ekspresyonunu ne yönde değiştireceğini göstermeyi hedefliyoruz. Elde edeceğimiz verilerin, ileri çalışmalar ile birlikte, PKOS (ön) tanı ve tedavisinde geliştirilecek yöntemler için ışık tutacağını öngörüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVARYUM EMBRİYOLOJİSİ

2.1.1. Primordial Germ Hücreleri

Hem erkek hem de dişi gametlerin öncü hücreleri olan ilkel germ hücreleri, gestasyonun dördüncü haftasında, Yolk kesesi denilen ekstraembriyonik bir zar içinde tespit edilebilir (Şekil 2-1). Gastrülasyon aşamasında ortaya çıktığına inanılan bu hücelere **primordiyal germ hücreleri (PGH'leri)** ve onların soyuna da germ hattı adı verilir. PGH'leri, diğer hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilen soluk sitoplazmaları ve yuvarlak şekilleri nedeniyle, Yolk kesesi içinde ve sonraki göçleri sırasında tanınabilirler. Ayrıca bu hücreler, bir dizi moleküler marker ile etiketlenebilir ²⁴. Epiblasttan köken alan PGH'leri, primitif çizginin kaudal kısmına ve ekstraembriyonik alana hareket ederler ²⁵⁻²⁷. Bu hücreler dört ve altıncı haftalar arasında ameboid hareketler ile, Yolk kesesinden bağırsak tüpünün duvarına ve bağırsak mezenteri aracılığı ile dorsal vücut duvarına göç ederler (Şekil 2-1). PGH'leri daha sonra, orta çizginin her iki tarafında, gevşek mezenkimal dokuda, sölomik kavitenin membranöz (epitelyal) astarına kadar uzanırlar. PGH'leri, göç sırasında mitozla çoğalmaya devam ederler ve bu hücrelerin çoğu, vücut duvarında, gonadları oluşturacakları seviyede toplanırlar. Ancak bazı PGH'leri, göçleri sırasında ekstragonadal sahada mahsur kalarak **teratom** denilen bir tümör türüne yol açabilir.

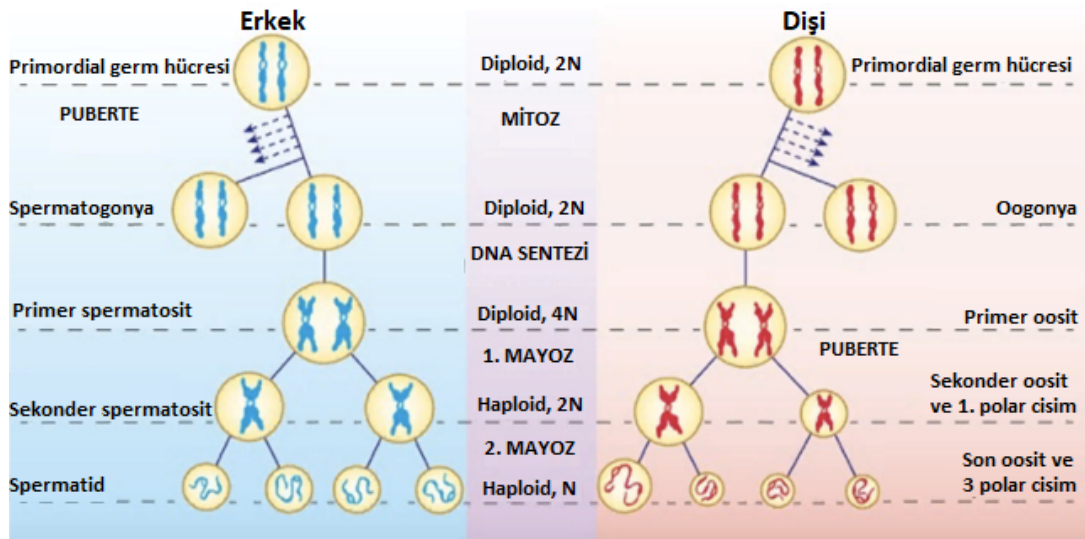


Şekil 2-1: PGH'leri, gelişimin 4. haftasından 6. haftasına kadar yolk kesesinin kaudal endodermal tabakasında bulunur ²⁷.

PGH'lerinin gelişmekte olan gonadlara göçü, tenascin C, β 2 integrin ve laminin gibi adezyon moleküllerinin yanısıra, Sdf-1 (stromal cell–derived factor-1) ligand ve Cxcr4 reseptörü gibi bazı kemokinler tarafından düzenlenir²⁷. PGH'lerinin çoğalması ve hayatta kalması, bu hücrelerin veya ilişkili hücrelerin içerdiği TIAR ve nanos3 gibi trofik faktörler (hücre büyümesini ve hayatta kalmayı teşvik eden faktörler) ile steel faktör (c-kit ligandı) ve LIF (interlökin) gibi sitokinler tarafından sağlanır.²⁷⁻³³ C-kit, göç yolu boyunca PGH apoptozunu baskılar. Bu da PGH'lerinin neden göç yolundan çıktıklarında çoğunlukla dejenere olduklarını açıklar. PGH'leri olası gonadların içine girdikten kısa bir süre sonra gonosit olarak isimlendirilirler ve bu hücrelerin son farklılaşmasını düzenlemek adına murine vasa homolog (mVh), germ cell nuclear antigen 1 (Gcna1) ve germ cell–less (Gcl1) gibi çok sayıda gen eksprese edilir^{27,34-41}.

2.1.2. Gametogenez

Hem erkek hem de dişilerde, PGH'leri gonadlar içinde önce mitotik bölünmeler geçirerek gametogenez başlatırlar, daha sonra olgun erkek ve dişi gametlere (spermatozoa ve oosit) dönüşürler. Ancak, bu işlemlerin zamanlaması iki cinsiyette farklıdır (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Dişi ve erkekte germ hücrelerinin mayotik nuklear olgunlaşması²⁷.

Erkeklerde PGH'leri (bu süreçte gonositler olarak adlandırılır) embriyonik gelişimin altıncı haftasından ergenlik dönemine kadar uykuda kalır. Ergenlik çağında, seminifer tübüller olgunlaşır ve gonositler, spermatogonyalara farklılaşır.

Spermatogonyalar mayoz bölünme ile olgun spermatozoaları oluşturur. Spermatozoalar ergenlikten ölüme kadar sürekli olarak üretilir.

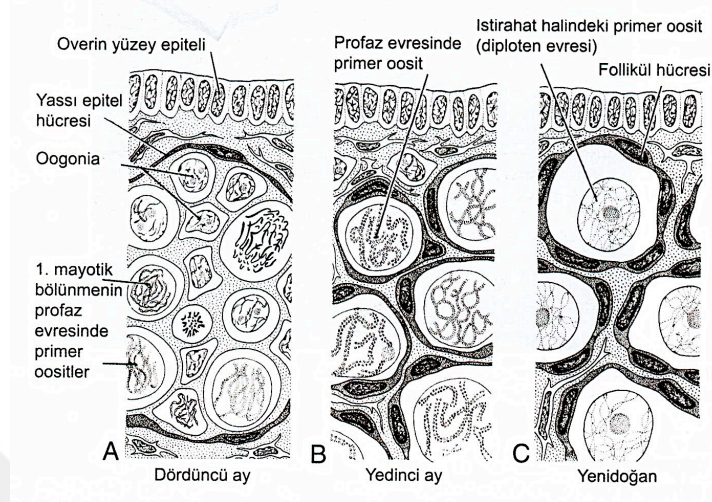
Buna karşılık dişilerde, PGH'leri (gonositler) somatik destek hücreleri tarafından sarıldıktan sonra birkaç mitotik bölünme daha geçirir ve daha sonra oogonialara farklılaşırlar. Fetal gelişimin beşinci ayında, tüm oogonialar mayoz bölünmelerine başlayarak **primer oositler** adını alır. Ancak, mayozun erken evrelerinde, tüm seks hücreleri uyku durumuna girer ve cinsel olgunluğa kadar birincil oosit olarak duraklamada kalır. Ergenlik çağı ile birlikte, her ay birkaç folikül, hipofizyal gonadotropik hormonlara yanıt olarak gelişmeye devam eder ancak genellikle sadece bir primer oosit, sekonder oosite olgunlaşır ve yumurtalıktan dışarı atılır (ovulasyon). Ovulasyonla atılan bu oosit mayotik duraklamada ikinci bir faza girer ve döllenme olana kadar mayoz bölünmesini tamamlamaz. Bu aylık döngüler menopoz başlangıcına kadar devam eder. Erkek ve dişi gametogenez süreci, sırasıyla **spermatogenez** ve **oogenez** adını alır.

2.1.2.1. Oogenez

Dişi germ hücreleri somatik destek hücreleri tarafından sarıldıktan sonra, bir dizi mitotik bölünmeler geçirir ve sonra oogoniaya farklılaşır. Gelişimin 12. haftasında, oogoniaların bir kısmı mitotik bölünmelerini devam ettirirken, bir kısmı da 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girerek uykuda kalır. Uykudaki oogonialar artık **primer oosit**dir. Kısmen yoğunlaşmış profaz kromozomlarını içeren nukleusları, çok büyük ve sıvı doludur ve **germinal vezikül** olarak adlandırılır. Germinal vezikülün bu şiş halinin, uzun süre mayotik duraklamada kalan oosit DNA'sını koruduğu düşünülmektedir ²⁷. Somatik destek hücrelerinden köken alan, tek katlı, yassı, epitelyal **folikül hücreleri**, her bir primer oositi sıkıca çevreler. Bu epitelyal kapsül ve çevrelediği primer oosit, **primordial folikülü** oluşturur. Bundan sonraki birkaç ay içinde oogoniaların sayısı hızla artar ve beşinci ayın sonunda, tüm oogonialar, primer oosit olmak üzere ilk mayotik bölünmelerini başlatır, ve primordial folikül sayısı yaklaşık yedi milyona ulaşır. Bu sırada hücre ölümü başlar ²⁵ ve foliküllerin çoğu sonradan dejenere olur. Doğumda, sadece 700.000-2.000.000 primordial folikül bulunurken, ergenlik çağında bu sayı 400.000'e kadar azalır.

Doğumdan hemen önce, primer oositlerin tümü, 1. mayozun profazının diploten evresinde dinlenme fazına girmiş durumdadır ve bu oositler puberteye kadar bu evrede

kalırlar (Şekil 2-3). Bu süre zarfında oositlerin olgunlaşması, folikül hücrelerinden salgılanan **oosit maturation inhibitor (OMI)** tarafından baskılanır²⁵.



Şekil 2-3: Gelişimin değişik evrelerindeki ovaryum kesitleri. A. 4. Ay. Oogoniyalar, overin kortikal kısmında kümeler halinde gruplaşmıştır. Bazıları henüz mitoz aşamasındayken, bazıları da primer oosit haline gelmiş ve 1. mayotik bölünmenin profaz evresine girmiştir. B. 7. Ay. Oogoniyaların hemen tümü 1. mayotik bölünmenin profaz evresindeki primer oositlere dönüşmüş durumdadır. C. Doğumda. Oogoniyalar yoktur. Primer oositlerin her biri, tek tabaka folikül hücreleri tarafından çevrelenerek primordial folikülü oluşturmuş durumdadır. Oositler, ovulasyonun hemen öncesine kadar içinde kalacakları diploten evresindedirler²⁶.

2.1.3. Gonadların Gelişimi

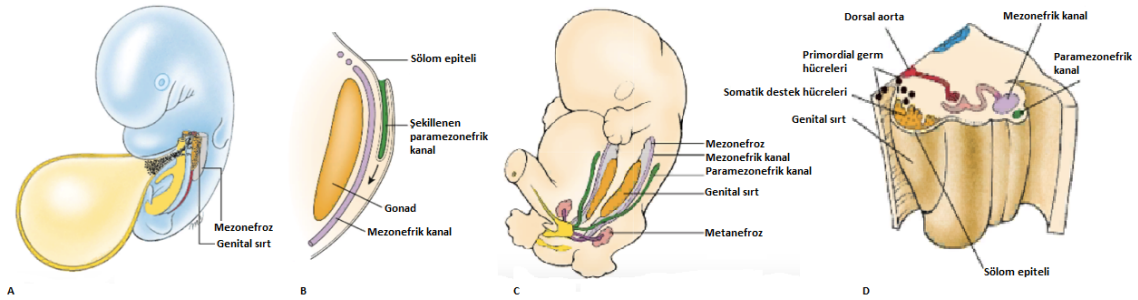
2.1.3.1. Farklılaşmamış Evre

Her iki cinsiyette de, gonadların oluşumu ve farklılaşması, PGH'lerinin ara mezoderm içerisine ulaşması ile başlar. PGH'leri normalde beşinci hafta boyunca yolk kesesinden dorsal mezenter aracılığıyla, arka vücut duvarında onuncu toraks seviyesine yakın bir alana göç ederler (Şekil 2-4 A). Burada, gelişmekte olan mezonefrik böbreklerin sadece medial ve ventralinde bulunan sölom epiteline bitişik yerleşirler. Buna karşılık, sölom epiteli proliferer olur, kalınlaşır ve PGH'leri ile birlikte, bir çift **genital sırt** oluşturur (Şekil 2-4). 6. hafta boyunca sölom epitelinden köken alan hücreler, daha sonra germ hücrelerini saracak olan **somatik destek hücrelerini** oluşturur (Şekil 2-4 D).

Altıncı haftadan sonra, bu somatik destek hücrelerini, erkek ve dişilerde farklı kaderler izler. Ayrıca 6. hafta boyunca, hem erkek hem de kadın embriyolarda, mezonefrik kanalların lateralinde yeni bir çift kanal olan **paramezonefrik kanallar (Müller kanalları)** şekillenmeye başlar (Şekil 2-4 B-D). Bu kanallar, üçüncü torasik segmentten kaudal olarak ürogenital sinüsün arka duvarına uzanan sölomik epitel

hücrelerinin çoğalmasıyla kalınlaşan bir şeridin kraniokaudal yönde invajinasyonu ile ortaya çıkar. Daha sonra paramezonefrik kanalların kaudal uçları, gelişen pelvik mesane ile sadece medialde sağ ve sol mezonefrik kanalların açıklıklarına bağlanmak için büyür. İki paramezonefrik kanalın kaudal uçları, gelişmekte olan pelvik üretraya temas etmeden hemen önce birleşir.

6. haftanın sonunda, erkek ve dişi genital sistemleri görünüşte ayırt edilemezler, ancak küçük hücresel farklılıklar halihazırda mevcuttur. Her iki cinsiyette de, germ hücreleri ve somatik destek hücreleri gonadal taslaklarda bulunur ve tam olarak gelişmiş mezonefrik ve paramezonefrik kanallar yan yana uzanır. Genital gelişimin farklılaşmamış evresi bu noktada sona erer. 7. haftadan itibaren, erkek ve dişi genital sistemleri farklı gelişimsel yolları takip eder.



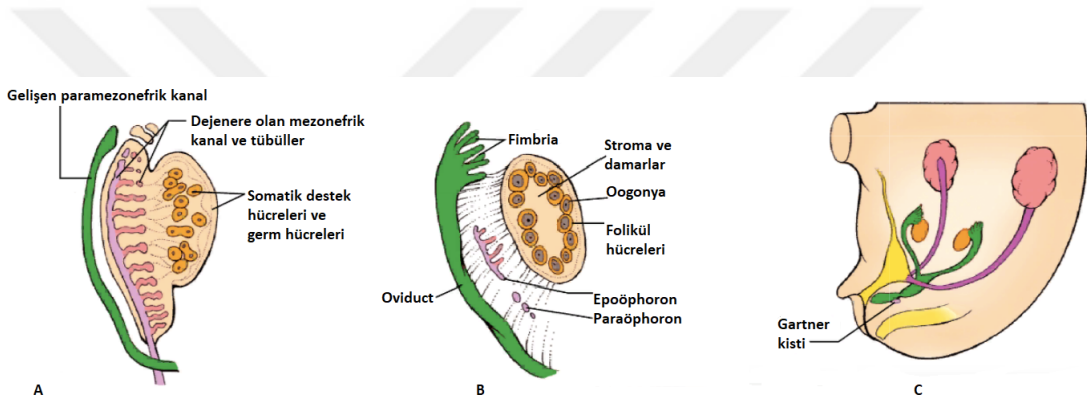
Şekil 2-4: Genital sırtların ve paramezonefrik kanalların oluşumu. (A), (D) 5. ve 6. haftalarda, arka karın duvarında genital sırtlar oluşur. (B) Her paramezonefrik kanal, mezonefrik kanala kaudal olarak paralel (ok) uzanan sölomik epitel hücrelerinin çoğalması ve invajinasyonu ile gelişir. (C) Mezonefrik ve paramezonefrik kanalların birbirleri ile ve gelişmekte olan gonadlar ve böbrekler ile olan ilişkisi. (D) PGH'leri, periton boşluğunu kaplayan sölomik epitel hücrelerini, çoğalması ve somatik destek hücrelerini oluşturması için uyarır²⁷.

2.1.3.2. Ovaryumların Gelişimi

Genetik olarak dişilerde iki X seks kromozomu, erkeklerde ise bir X ve bir Y seks kromozomu vardır. Cinsiyetin farklanması, bazıları otozomal olan çok sayıda genin rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Cinsiyet kromozomu çiftleri, erkek ve dişi gelişim yollarının seçilmesini belirlemesine rağmen, cinsel gelişim sonrasındaki aşamaları sadece cinsiyet kromozomlarındaki genler tarafından değil, aynı zamanda çoğu **otozomlar** üzerinde kodlanmış hormonlar ve diğer faktörler tarafından da kontrol edilir²⁷. Seksüel dimorfizm, kısa kolunda (Yp11) **SRY (sex determining region on Y)** genini taşıyan Y kromozomu tarafından belirlenir²⁵. Bu nedenle gonadların temel gelişim yolu, ovaryum gelişiminde ayrılık gösterir. SRY gen ifadesi, Sertoli hücrelerinin farklılaşmasını başlatarak gonadın testis yönünde gelişimini yönlendirir. Çünkü bu

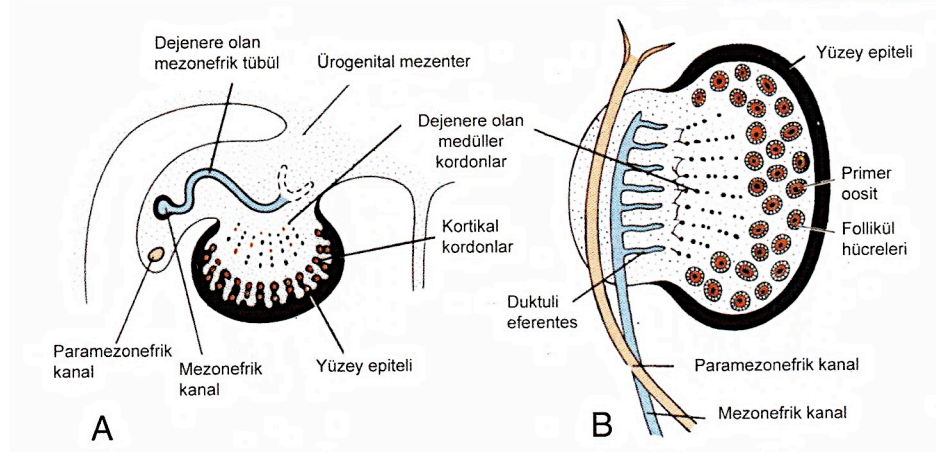
genin protein ürünü, rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri uyaran **testis-determining factor (TDF)**'dür.

Dişi embriyosunda XX somatik destek hücreleri Y kromozomu ya da SRY geni içermezler. Bu nedenle Sertoli hücreleri yerine folikül hücrelerine farklılaşırlar. Sertoli hücreleri **Anti Müllerian Hormon (AMH)** üretiminden ve testis içindeki diğer tüm hücre tiplerinin farklılaşmasından sorumludur ve yokluğunda ne AMH, ne de testosteron üretilir. Bundan dolayı da dişilerde, erkek genital kanalların ve aksesuar cinsel yapıların gelişimi uyarılmazken, bunun yerine, paramesonefrik kanalların gelişimi devam eder ve Fallop tüpleri, uterus ve vajinaya farklılanması için uyarılır (Şekil 2-5).



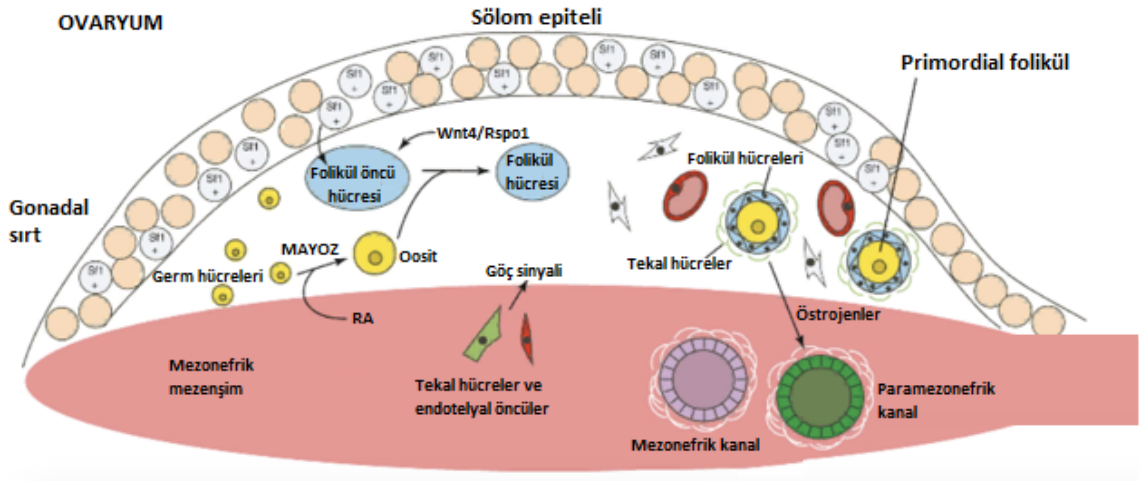
Şekil 2-5: Doku seviyesinde insan dişi gonad gelişimi. SRY yokluğunda, somatik destek hücreleri folikül hücrelerine farklılaşır. Bu hücreler, oositleri kuşatarak ovaryumun dış kortikal bölgesinde lokalize olma eğilimini gösteren primordial follikülleri oluşturur. Mezonefrik kanallar ve mezonefrik tübüller, epoöforon, paraöforon ve Gartner kistleri gibi kalıntılar dışında kaybolur. Paramesonefrik kanallar, oviduktlar, uterus ve vajinayı oluşturmak üzere gelişmeye devam eder²⁷.

Dişi gonadın yüzey epiteli, erkeklerdekinin aksine çoğalmaya devam eder ve 7. haftada burada çoğalan hücreler alttaki mezenşim içine gömülerek **kortikal kordonlar** adı verilen ikinci nesil kordonları oluşturur (Şekil 2-6). 4. ayda dişilerde, sölomik epitel hücrelerinden delaminasyon yapan somatik destek hücreleri, erkeklerde olduğu gibi Sertoli hücrelerine farklılaşmak yerine PGH kümelerini kuşatırlar (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: A. Gelişimin 7. haftasında, primitif cinsiyet kordonlarının dejenerasyonunu ve kortikal kordonların oluşumunu gösteren overin transvers kesiti. B. Gelişimin 5. ayında over ve genital kanallar. Medullar kordonlardaki dejenerasyona dikkat ediniz. Mezonefrik boşaltım tübülleri rete ile ilişkili değildir. overin kortikal bölgesi, folikül hücreleri ile çevrelenmiş oogonya gruplarını barındırmaktadır²⁶.

Erkeklerde, Sertoli hücreleri, 1. mayoz başlamadan önce germ hücre gelişimini engeller. Dişilerde ise, folikül hücreleri tarafından kuşatılan bu germ hücreleri oogonyalara farklılaşarak çoğalırlar ve primer oositleri oluşturmak üzere 1. mayoz bölünmelerini tamamlarlar (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Transkripsiyon faktörlerine, büyüme faktörlerine ve dişi gonadların oluşturulmasından sorumlu çeşitli hücre tiplerinin kökenine genel bakış. AMH: anti-Müllerian hormon; AR: Androjen reseptörü; RA: Retinoik asit²⁷.

Bu mayotik oositler, komşu somatik destek hücrelerini, folikül hücrelerine (veya granülosa hücreleri) farklılaşmak için uyarır ve daha sonra tek bir oositi çevreleyerek primordial folikülleri oluşturur. Bu foliküller genellikle ovaryumun kortikal bölgesinde lokalize olur. Medullar bölge, organın damarlardan, sinirlerden ve bağ dokusundan oluşan kısmıdır. Folikül hücreleri bu noktada, ergenliğe kadar oositlerin daha fazla

gelişmesini engeller ve daha sonra bir grup primer oosit her ay gametogenezi sürdürmek için uyarılır.

2.2. OVARYUM ANATOMİSİ

Ovaryumlar, düzensiz bir yüzeye sahip, küçük, oval şekilli ve grimsi renkte organlardır. Bir ovaryumun gerçek boyutu, bir kadının yaşına ve hormonal durumuna bağlıdır; modifiye bir periton ile kaplı olan yumurtalıklar, doğurganlık yıllarında yaklaşık 3-5 cm uzunluğundadır ve menopozda gitgide küçülerek sonunda atrofik hale gelir. Ovaryumlar, uterusun her iki tarafında, fallop tüplerinin altında, **geniş ligament (ligamentum latum uteri)** içinde yerleşmiş olan bir çift organdır. Ovaryum, eksternal iliak damarlara, obliterik umblikal artere ve üretere bağlı bir boşluk olan **ovaryan fossa (fossa ovarica)**'da bulunur.

2.2.1. Ovaryan Ligamentler

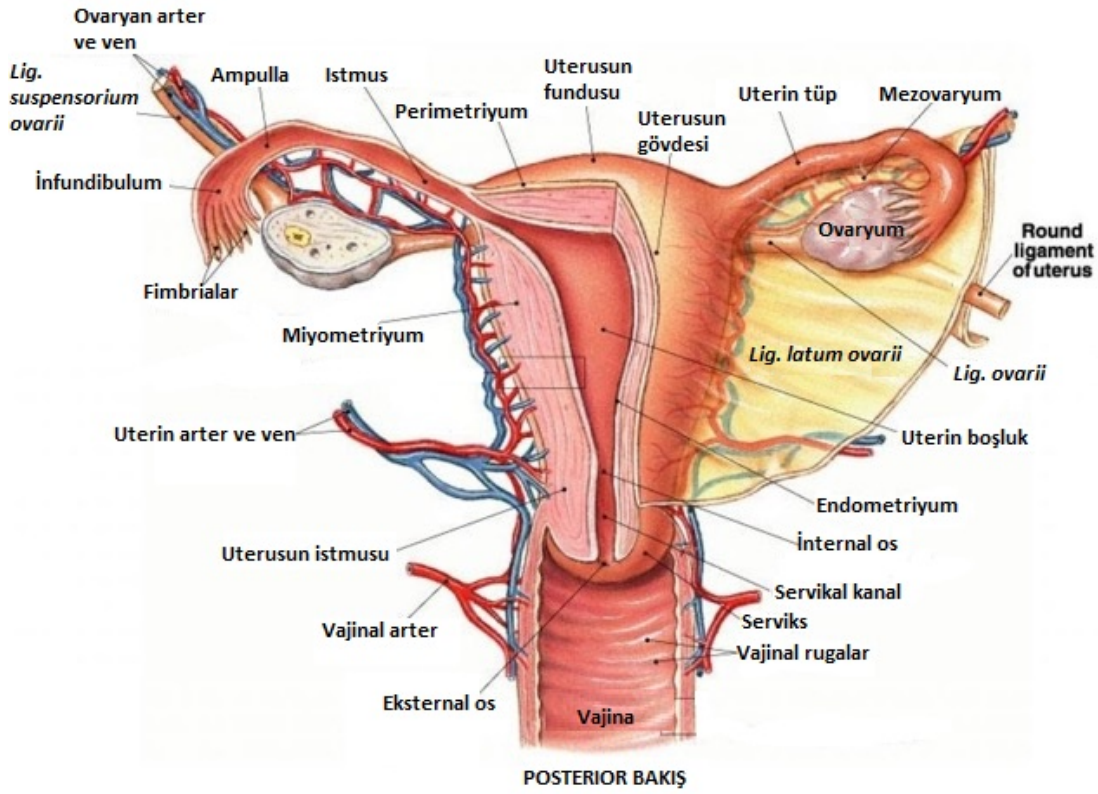
Ovaryumları birkaç çift ligament destekler. Ovaryumlar, embriyonik fibröz kordon **gubernakulumun** bir kalıntısı olan ⁴² **ovaryan ligament (ligamentum ovarii proprium-ligamentum uteroovaricum)** ile uterus yan duvarına, tuba uterinaların tutunma yerine yakın bir noktadan bağlanır ⁴³. Geniş ligamentin posterior kısmı, ovaryumu destekleyerek arteriyal ve venöz damarlarını barındıran **mesovaryum**'u oluşturur. Ovaryumlar pelvik duvara ise, ovaryumun damar ve sinirlerini de içeren **infundibular pelvik ligament (ligamentum suspensorium ovarii)** ile bağlanır (Şekil 2-8).

2.2.2. Ovaryumların Damarlanması, İnnervasyonu ve Lenfatik Drenajı

Ovaryumların kan akışı, aorta abdominalisin bir dalı olan **ovaryan arter (a. ovarica)** tarafından sağlanır. Ovaryan arter ve ven, ovaryuma **hilumdan** girer ve çıkar. Sol ovaryan ven, sol renal vene akarken, sağ ovaryan ven, doğrudan inferior vena cava (inferior vena cava)'ya boşalır.

Ovaryuma sinirler, ligamentum suspensorium ovarii aracılığı ile hilumdan girer. İnnervasyon ise, **ovaryan, hipogastrik ve aortik pleksuslar** tarafından gerçekleştirilir ⁴⁴⁻⁴⁶.

Ovaryumların lenfatik drenajı öncelikle **lateral aortik nodlarla** sağlansa da, **iliak nodlar** da direnaja katılır ⁴⁴⁻⁴⁶ ve lenf **nodii lumbalis**'e akar ⁴³.



Şekil 2-8: Dişi üreme organlarının anatomik yapısı ⁴⁶.

2.3. OVARYUMUN HİSTOFİZYOLOJİSİ

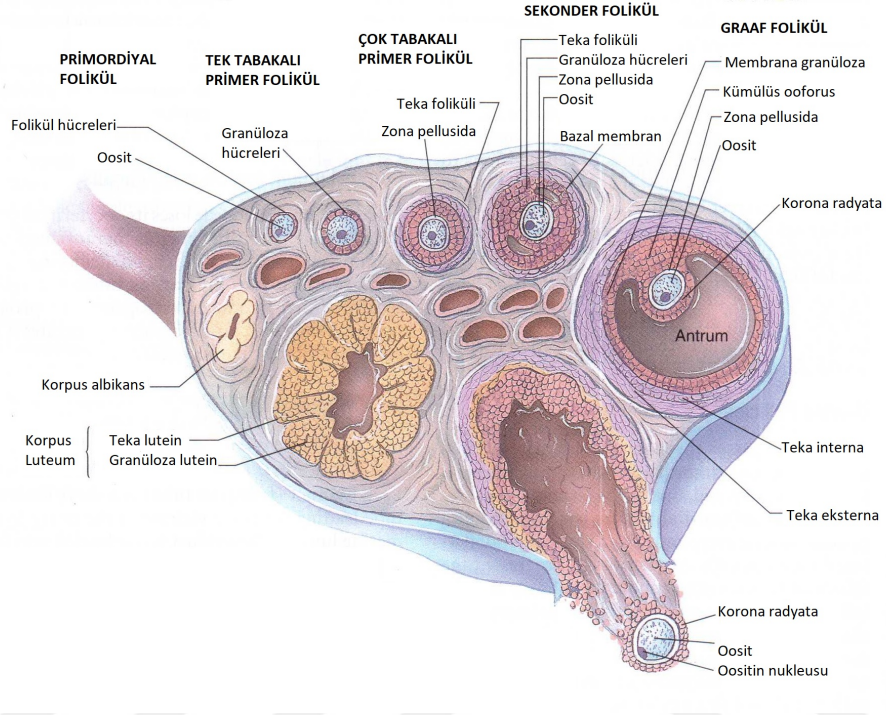
2.3.1. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar, dışarıdan germinal epitel ile çevrili, korteks ve medulladan oluşan organlardır. **Germinal epitel**, hilum bölgesinde tek katlı yassı, organın geri kalan bölümünde tek katlı kübik epitelden meydana gelir. Germinal epitelin hemen altında, kortek ile arasında, sıkı bağ dokusundan oluşan ve organı bir kapsül gibi saran **tunika albuginea** bulunur ^{42,47}. **Kortikal bölge**, organın periferinde yer alan ve ovaryan folikülleri barındıran sellüler bağ dokusundan oluşur. Foliküllerin etrafındaki stromada, dağınık bir halde düzenlenmiş olan düz kaslar bulunur. **Medullar bölge**, bir sınır ile kortikal bölgeden ayrılmaz. Organın merkezinde, interstisyel hücreleri, kan damarlarını (ovaryumun sarmal ve kıvrımlı arteri ve venler) ⁴⁷ lenf damarlarını ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusundan oluşmuş kısımdır.

2.3.2. Folikül Gelişimi

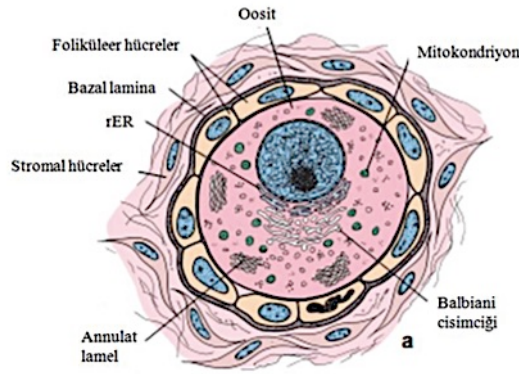
Ovaryumda 3 temel tip folikül bulunur (Şekil 2-9):

1. Primordiyal foliküller
2. Büyümekte olan foliküller
3. Olgun (Graaf) foliküller



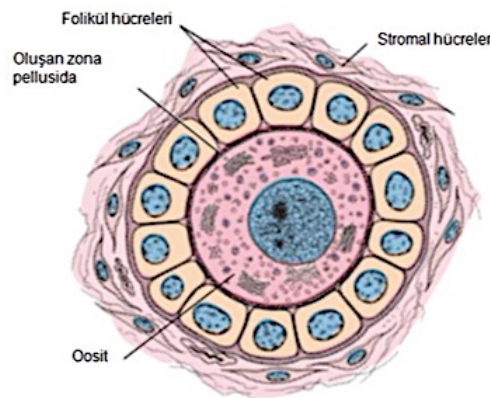
Şekil 2-9: Ovaryumda yumurtanın olgunlaşması ve ovulasyon ⁴⁸.

Primordial foliküller ilk olarak gelişimin 3. ayında ortaya çıkarlar ve erken gelişimleri gonadotropin uyarısından bağımsızdır ⁴². Olgun ovaryumdaki primordial foliküller, tunika albugineanın hemen altındaki kortikal bölgede yerleşir. Yaklaşık 30 µm çapındaki oosit, tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrelenmiştir ve folikül hücrelerinin dış yüzeyi, bir bazal lamina ile sınırlandırılmıştır. Oosit, ökromatik bir nukleus ve eksantrik yerleşimli bir ya da daha fazla nukleolus içerir. Ooplazma (oositin sitoplazması), ultrastrüktürel düzeyde, Golgi membranları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum, mitokondriyon ve lizozomların birlikte oluşturduğu **Balbani cisimciği** adında bir yapı ve nuklear zarf kesitlerinden oluşan **anüler lameller** içerir (Şekil 2-10).



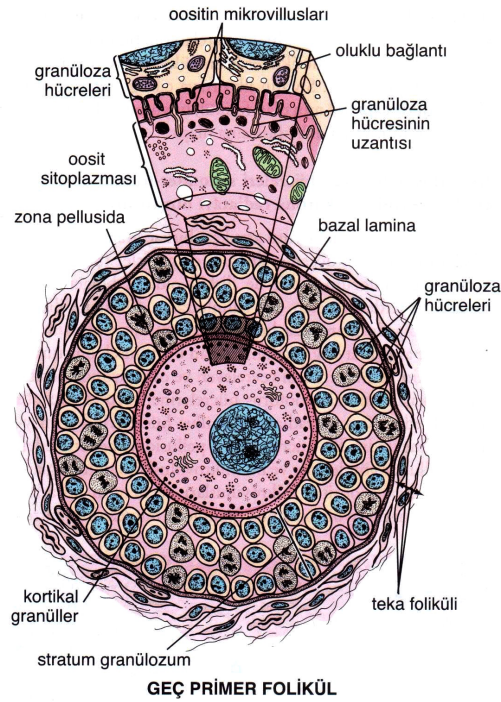
Şekil 2-10: Primordiyal folikül. Şematik olarak 1. mayotik bölünmenin profazında duraklamaya girmiş olan oosit görülmektedir ⁴².

Puberteye ulaşıldığında ovaryumlar, primordial foliküllerden oluşan bir folikül havuzudur ve her menstrual siklusta 5-15 primordial folikül, farklı aşamalardan geçerek olgunlaşmaya başlar ²⁷. Foliküller **büyüyen foliküle** dönüşmeye başladığında, folikül hücrelerinde ve komşu stromada birtakım değişiklikler meydana gelir. Primordial foliküller, hipofizyal gonadotrofinlerden bağımsız olarak kalınlaşır ve tek katlı yassı folikül hücreleri, tek katlı kübik hücrelere dönüşür (Şekil 2-11). Bu foliküller artık **primer folikül** adını alır. Folikül hücreleri ile birlikte oosit, birkaç tip glikoproteinden (**zona pellusida glikoproteinleri: ZP-1, ZP-2, ZP-3**) oluşan ince bir asellüler madde sentezler ve bu madde oosit yüzeyinde ince bir tabaka oluşturur. **Zona pellusida (ZP)** adındaki bu tabaka, folikül hücreleri ve oosit arasında fiziksel bir bariyer oluşturuyormuş gibi görünmesine rağmen (Şekil 2-12), aslında hücre içi bağlantılar aracılığı ile oosit hücre zarına ve ince uzantılar ile folikül hücrelerine bağlıdır ^{27,42,47}. Bu uzantılar ve hücre içi bağlantıları ovulasyondan hemen öncesine kadar bozulmadan kalır ve muhtemelen hem gelişimsel sinyalleri hem de metabolik desteği oosite iletirler ²⁷.



Şekil 2-11: Erken primer folikül. Gelişimin erken evresindeki bir primer folikülün şematik çizimi ⁴².

Bu 5-15 primer folikülün folikül hücreleri daha sonra, oosit çevresindeki çok katmanlı kapsülü (**stratum granulozum-membrana granuloza**) oluşturmak üzere proliferasyon olurlar ve **granuloza hücreleri** adını alırlar (Şekil 2-12). Bu proliferasyon, transforming growth factor- β (TGF- β) ailesi üyesi **growth differentiation factor-9 (GDF-9)** aracılığı ile gerçekleşir ²⁵. Bazal lamina, bağ dokusu ile folikül hücreleri arasındaki yerini korur. Oositin ve folikülün normal gelişimi için gerekli olan besinlerin geçişi için granuloza hücreleri arasında yaygın oluklu bağlantılar (gap junction) gelişir.



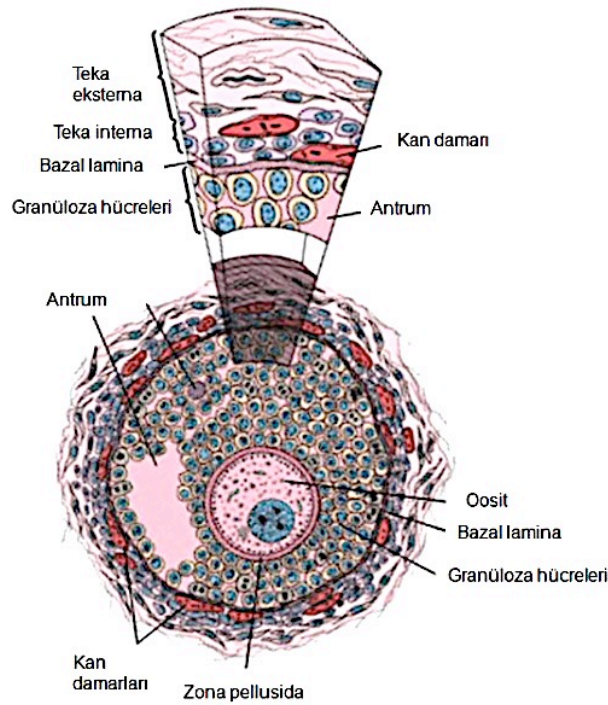
Şekil 2-12: Geç primer folikülün şematik çizimi ⁴².

Granuloza hücreleri proliferasyona uğrayınca, foliküle komşu olan stromal hücreler, **teka folikülü** adındaki bağ doku kılıfını oluştururlar (Şekil 2-12). Teka folikülü daha sonra 2 tabakaya farklılaşır:

Teka interna: Bazal laminaya komşu, steroid hormon üreten hücre ultrastrüktürüne sahip olan kübik salgı hücrelerinden oluşan iç tabakadır ve oldukça vaskülarizedir. Salgı hücrelerinin yanısıra bu tabakada fibroblastlar ve kollajen lif demetleri bulunur.

Teka eksterna: Düz kas hücreleri ve kollajen lif demetlerinden oluşan dış bağ doku tabakasıdır.

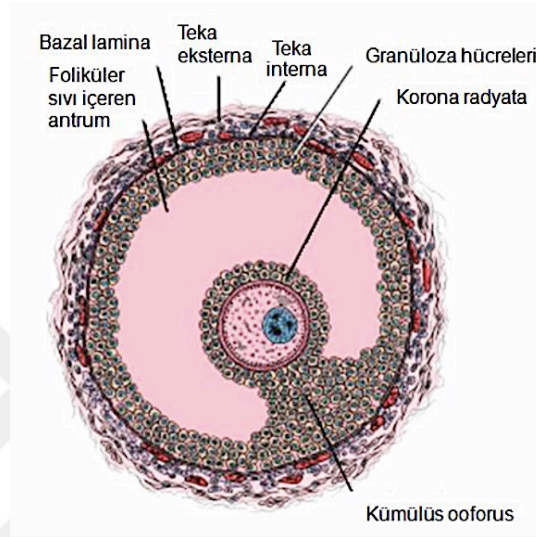
Bu noktadan sonra, büyüyen foliküllerin bazıları dejenere olurken, birkaç tanesi yükselen FSH seviyesine yanıt olarak büyümeye devam eder. Oosit ve folikül gelişimi için ayrıca büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü-EGF, insülin benzeri büyüme faktörü I-IGF I) ve kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarına ihtiyaç vardır ⁴². 6-12 sıralı stratum granulozum tabakasındaki folikül hücreleri arasında, küçük hücrelerarası boşluklar (**Call-Exner cisimleri**) görülür ⁴⁷ ve daha sonra bu boşluklar, hyaluronan bakımından zengin **folikül sıvısı (likör folikülü)** ile dolmaya başlayarak küçük kaviteler oluşturur. Daha sonra bu kaviteler birleşerek hilal şeklinde tek bir boşluk olan **antrum**u meydana getirir. Bu foliküller de artık **sekonder folikül veya antral folikül** olarak isimlendirilir (Şekil 2-13). Bu evrede yaklaşık olarak 125 µm çapında olan oosit, granuloza hücrelerinden folikül sıvısına salgılanan **OMI** tarafından baskılanarak daha fazla büyümmez.



Şekil 2-13: Sekonder folikülün şematik çizimi ⁴².

Granuloza ve teka hücrelerinin birlikte salgıladığı E_2 sayesinde, endometriyum proliferatif evreye girer, servikal mukus sperm geçişine izin verecek kadar inceler ²⁵. Sonunda, büyüyen foliküllerden biri öncelik kazanır ve sıvı emerek büyümeye devam eder. Oosit, **kümülüs hücreleri** denilen bir grup granuloza hücresi tarafından sarılır ve antruma doğru bir çıkıntı yapar. Bu çıkıntı **kümülüs ooforus** (yumurta tepeciği) adını alır. Kumülüus hücreleri, granuloza hücreleri ile bağlantıdadır ve ovulasyonda, oosit ile

birlikte atılan ve oositin hemen etrafını çevreleyen kümülüs hücrelerine **korona radiata** denilmektedir. Büyük, şişmiş bu folikül artık **olgun folikül** veya **Graaf folikül** olarak tanımlanır (Şekil 2-14). Foliküllerin geri kalanı ise atreziye uğrar (**atretik folikül**). Foliküller, gelişimlerinin herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilir. Atretik foliküller, camsı membran denilen kalın, kıvrılmış membranöz materyal, ZP ve dejenere oosit ile folikül hücrelerinin kalıntılarından ayırt edilir⁴⁷.



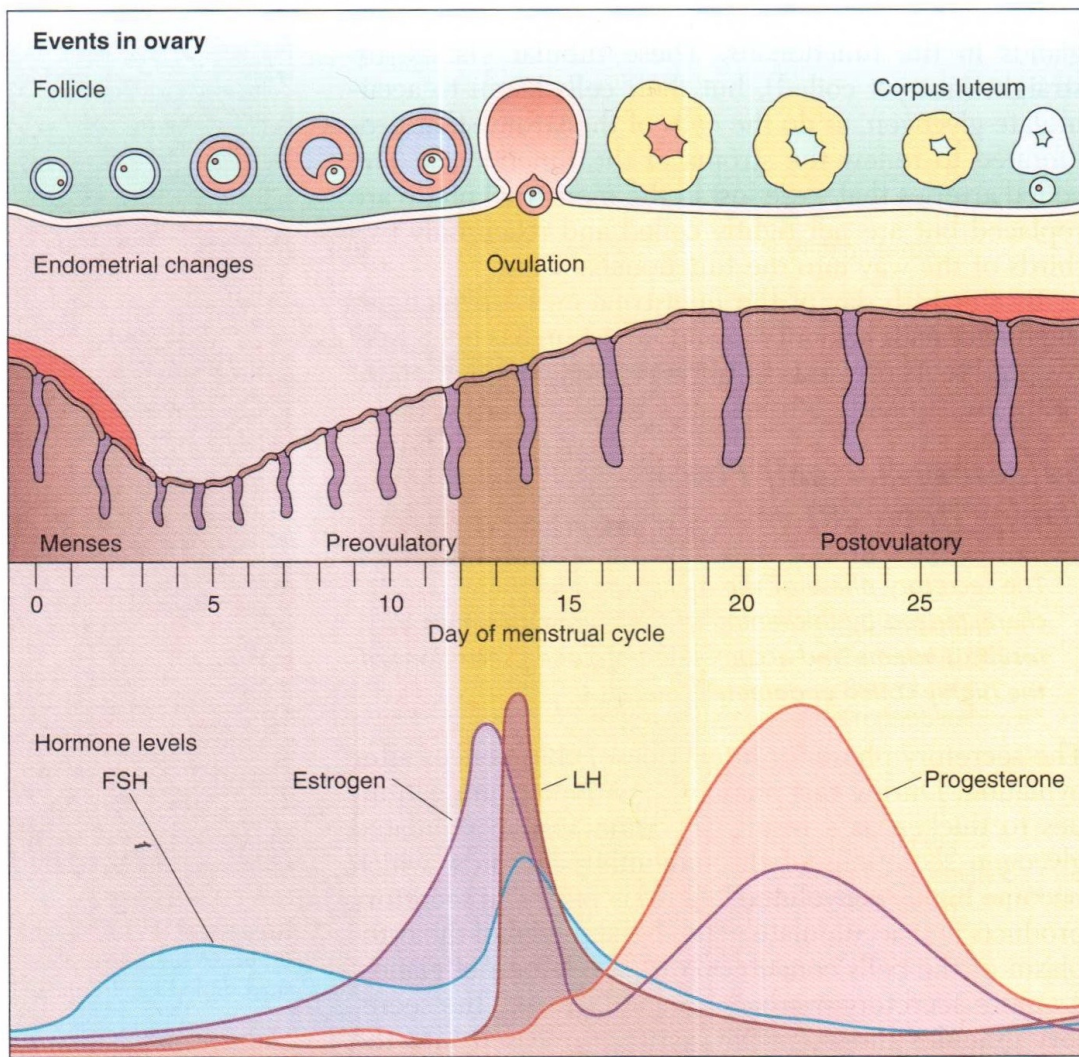
Şekil 2-14: Graaf folikülünün şematik çizimi⁴².

2.3.3. Menstrual Siklus ve Ovulasyon

Kadınlarda, puberteden (menarş) menopoza girinceye kadar, hipotalamik, hipofizyal ve ovaryan hormonların kontrolü altındaki aylık döngüleri **menstrual siklus** adı verilir ve bu döngü, her ay olgunlaşmış bir dişi gametin ovulasyonu ve uterusun kendini döllenmiş bir embriyonun implantasyonuna hazırlaması ile sonuçlanır. Bu 28 günlük döngü şunlardan oluşur:

- Her ay, (genellikle) tek bir primordial folikülün olgunlaşması
- Uterin endometriyumun eş zamanlı proliferasyonu
- Ovulasyon (Olgunlaşan oositin ovaryumdan atılması)
- Ovulasyonun gerçekleştiği folikülün gelişmeye devam ederek endokrin KL'a dönüşmesi
- İmplantasyon gerçekleşmezse, uterin endometriyumun dökülmesi ve KL'un gerilemesi

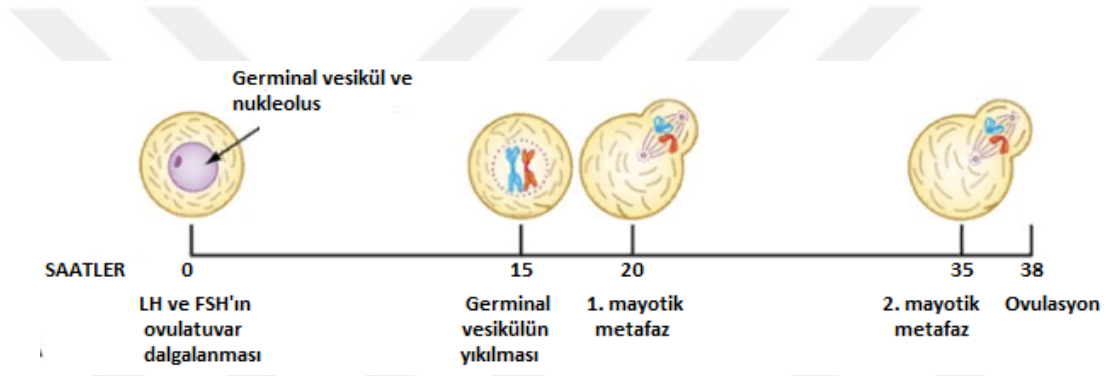
Menstrual siklusun, bir önceki siklusta dejenere olan uterin endometriumun dökülmesi (**menstruasyon**) ile başladığı kabul edilir. Döngünün beşinci gününde (menstruasyon başladıktan sonraki beşinci gün), hipotalamus tarafından salgılanan küçük bir peptit hormon olan **gonadotropin-salgilatıcı hormon (gonadotropin-releasing hormone - GnRH)** sekresyonundaki artış, hipofiz bezinden iki gonadotropik hormonun (gonadotropinler) salgılanmasını uyarır: **FSH ve LH** (Şekil. 2-5). Hipofizyal gonadotropin seviyelerindeki artış, ovaryumlardaki follikülogenezi ve uterin endometrium proliferasyonunu düzenler.



Şekil 2-15: Menstrual sikluskdaki ovaryan, endometrial ve hormonal değişiklikler ⁴⁷.

Menstrual döngünün yaklaşık onüç ya da ondördüncü günü (endometriumun proliferatif fazının sonunda), FSH ve LH düzeyleri aniden çok keskin bir şekilde yükselir (Şekil 2-15). Hipofizyal gonadotropinlerdeki bu dalgalanma, olgunlaşmış

sekonder foliküllerdeki primer oositleri, mayozu devam ettirmeleri için uyarır. Yirmi saat içinde kromozomlar, metafaz plağında sıralanır. Sekonder oositi oluşturmak üzere hücre bölünmesi hızla gerçekleşir ve **birinci polar cisim** oluşur (Şekil 2-16). Sekonder oosit, hemen ikinci mayotik bölünmesine başlar ancak ovulasyondan yaklaşık üç saat önce ikinci mayozun metafaz evresinde duraklamaya girer. Germinal vezikül yıkılınca, kümülüs hücreleri, hücre-hücre bağlantılarını kaybedip ayrışarak yumurtayı çevrelerler. Sonuç olarak, oosit ve onu çevreleyen gevşek kümülüs hücre kitlesi, antral kaviteye doğru çıkıntı yapar. Birkaç saat içinde, kümülüs hücreleri, kümülüs hücre kitlesini birkaç kat genişletmek için, hyaluronik asitten zengin bol miktarda ekstrasellüler matriks salgılar²⁷.



Şekil 2-16: Ovaryan siklustaki mayotik olaylar ve zamanlama²⁷.

Ovulasyon süreci inflamatuvar yanıtla benzerdir. Ovulasyonla sonuçlanan ve ard arda gerçekleşen olayların, inflamatuvar medyatörler olan histamin ve prostaglandinlerin salgılanması tarafından başlatıldığı düşünülmektedir. FSH ve LH dalgalanmasından birkaç saat sonra, folikül daha vaskülerize ve ödematöz hale gelerek gözle görülür şekilde pembeleşir. Folikül, ovaryumun yüzeyine doğru yer değiştirir (Şekil 2-9). Ovulasyon yaklaşırken, folikül duvarı incelmeye başlar, böylece **stigma** adı verilen küçük, meme şeklinde bir çıkıntı meydana gelir. Sonuç olarak, folikül duvarındaki düz kas hücreleri, bölgedeki fibroblastlar tarafından üretilen kollajen-yıkıcı enzimler ve diğer faktörlerin serbest bırakılması, folikülün yırtılmasına neden olur. Oosit, hyaluronik asit matriksine bağlı kümülüs hücreleri ile birlikte, yavaş yavaş ovaryum yüzeyine doğru hareket eder. Foliküler stromal hücrelerden P₄ yapımı uyarılır (**luteinizasyon**) ve bu olayların sonucunda foliküller yırtılarak **ovulasyon** gerçekleşir²⁵. Ovulasyon, FSH ve LH dalgalanmasının başlamasından yaklaşık otuz sekiz saat sonra gerçekleşir. Kümülüs-oosit kompleksi, fimbriadan ovidükte girdikten sonra ovidükt

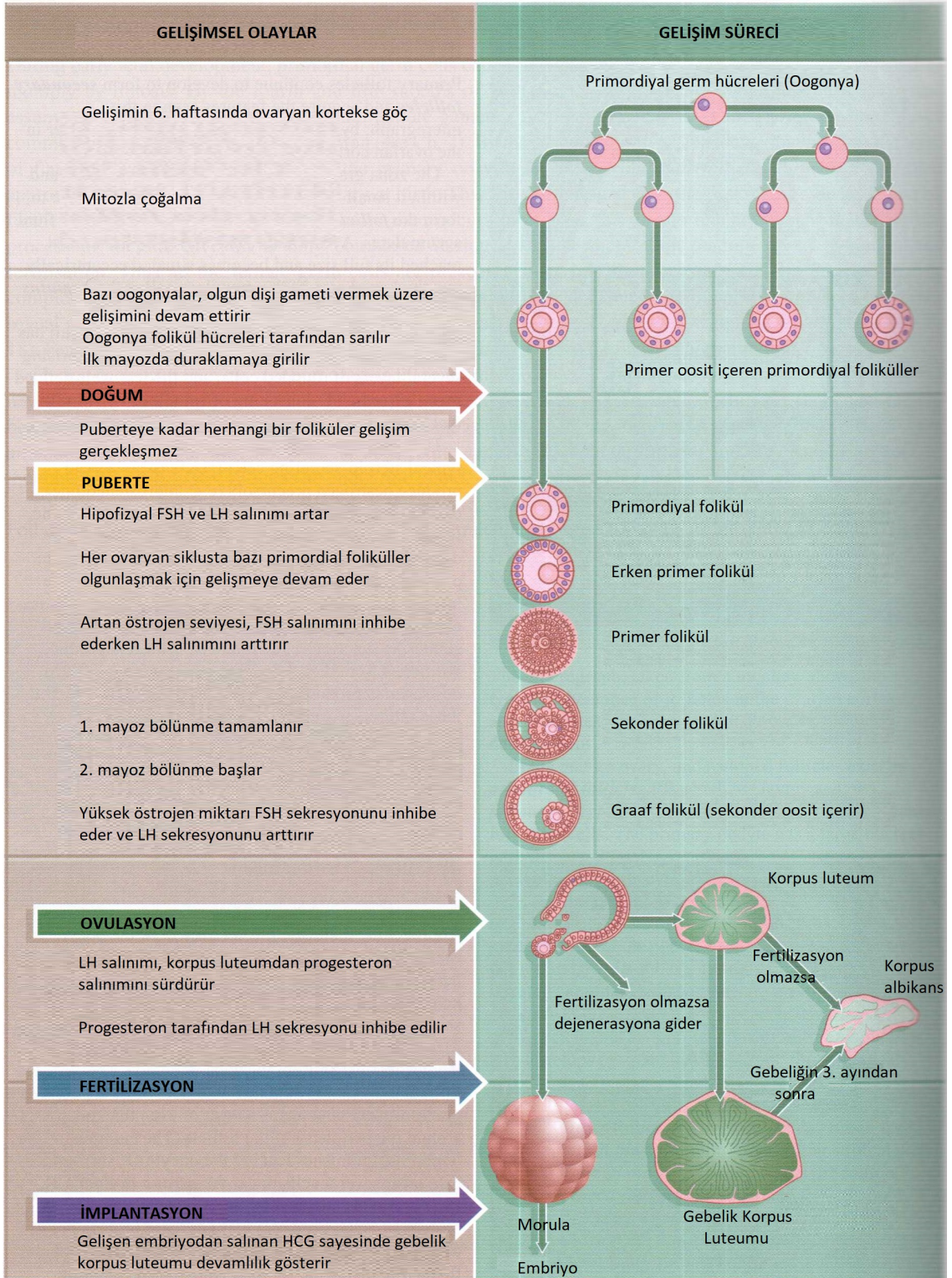
duvarındaki sillerin senkronize hareketi ile ampullaya taşınır. Ampulla içinde, oosit dölleme kapasitesini kaybetmeden önce yirmi dört saat boyunca canlı kalabilir.

2.3.4. Luteal Evre

Ovulasyondan sonra değişim Őu evreleri izler:

1. Folikülün bazal membranı yırtılır.
2. Foliküler hücre kümesi vaskülarize olur ve antrum boşluğuna kan dolarak pıhtılaşıır. Böylece geçici bir yapı olan **korpus hemorajikum** oluşur^{42,47}. Daha sonra yeni oluşmuş kan damarları, fibroblastlar ve kollajen lifler fibrin pıhtı içine girer.
3. Foliküler hücreler, LH etkisi altında sitoplazmalarında sarı bir pigment biriktirerek tipik steroid sentezleyen hücre özelliğindeki **foliküler lutein hücrelerine** dönüşürler (Şek 2-9). Bu hücreler FSH ve LH etkisi altında P₄ ve E₂ salgırlarlar.
4. Teka interna hücreleri de **teka lutein hücrelerine** dönüşerek LH uyarısına yanıt olarak androstenedion ve P₄ üretirler.

Bu değişimler sonucunda, hormon salgılayan endokrin bir yapı olan **Korpus luteum (KL)** oluşur^{42,47}. P₄, östrojenik hormonların da katkısıyla uterusun sekretuar evreye girmesini sağlar²⁵. Dölleme gerçekleşmezse, ovulasyonu izleyen 9. günden itibaren KL küçölmeye başlar ve ovulasyondan sonraki 14. günde dejenerasyona uğrayarak **korpus albicans** denilen fibrotik bir skar dokusuna dönüşür^{42,47} (Şekil 2-17). Bu sırada P₄ üretimi de azaldığından menstrual kanama başlar. Oositin dölleme durumunda ise, embriyonun sinsityotrofoblastları tarafından üretilen **human chorionic gonadotropin (hCG)** hormonu, KL'un gerilemesini engelleyerek gebelik korpus luteumunun (Korpus luteum graviditatis) oluşmasını sağlar. Gebeliğin ilk 4 ayında gerekli olan P₄'u bu yapı temin ederken, 4. aydan sonra gerekli olan P₄ hormonu, plasenta tarafından temin edilir.



Şekil 2-17: Foliküler gelişim ⁴⁹.

2.3.5. Östrojenler

2.3.5.1. Östrojenlerin Biyosentezi

Östrojenler, çeşitli dokularda üretilen, 18 karbonlu bir steroid hormon ailesidir^{50,51}. 17- β östradiol, östron ve östriol doğal östrojenlerdir. Ovaryan orjinli primer östrojen ise 17- β östradioldür⁵⁰. 17- β östradiol, dolaşımdaki östron ile denge halindedir. Östron daha sonra östriole dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşir. Bu 3 östrojen içinde etkisi en kuvvetli olan 17- β östradiol, en zayıf olan ise östrioldür⁵¹. 17- β östradiolün östrojenik kuvveti, östrona göre 12 kat, östriole göre 80 kat daha fazladır⁵².

Ovaryan östrojenler, over foliküllerinin teka interna ve granüloza hücrelerinden, KL'dan ve plasentadan salgılanır⁵¹. Ya biyosentetik yolla androjenlerden, ya da dolaşımdaki androstenedionun aromatazasyonu ile sentezlenirler. Aromataz (CYP19), androstenedionun östrona, testosteronun ise östradiole dönüşümünü katalizleyen enzimdir (Şekil 2-18)^{50,51}.

Teka interna hücreleri, LH reseptörlerine sahiptir. LH, siklik adenozin monofosfat (cAMP) üzerinden etki göstererek, kolesterolün, E₂ prekürsörü olan androstenediona dönüşümünü sağlar⁵¹. Androstenedionun bir kısmı, östradiole dönüşür ve dolaşıma geçer. Bir kısmı da GH'lerine aktarılır ve testosteron üretilir⁴⁷. Testosteron GH'lerinde aromataz enzimi aracılığı ile östradiole çevrilir⁴⁷. GH'lerinde bulunan çok sayıdaki FSH reseptörü, cAMP üzerinden etki göstererek aromataz etkinliğini artırır ve bu hücrelerin östradiol salgısını güçlendirir⁵¹.

2.3.5.2. Östrojenlerin Etki Mekanizması

Diğer steroidler gibi östrojenler de hücre çekirdeğindeki reseptörleri ile birleşir ve oluşan kompleks, DNA ile bağlanınca messenger RNA (mRNA) oluşumu artar⁵¹. Böylece hücre işlevinde değişikliklere neden olacak yeni proteinler üretilir. İki farklı östrojen reseptörü tanımlanmıştır: **Östrojen reseptörü α (ER α)** ve **östrojen reseptörü β (ER β)**. ER α , uterus, testis, hipofiz, böbrek, epididim ve adrenal bez; ER β ise over, prostat, akciğer, mesane, beyin ve kemik dokularında bulunur. Hipofizin over fonksiyonlarını düzenlerken ER α 'yı; over foliküllerinin içerisine salgılanan E₂'nin ise ER β 'yı kullandığı düşünülmektedir⁵¹. Çünkü yapılan çalışmalarda ER α geni devredışı bırakılan dişi ve erkek farelerin steril olduğu, bunun aksine ER β geni devredışı bırakılan

dişi ve erkek farelerin normal gelişim gösterdiği ve dişi farelerin üreyebildikleri gösterilmiştir ⁵¹. Ancak bu etki mekanizmalarının yanısıra, östrojenlerin, beyinde nöron deşarjı veya gonadotropin salgılanmasındaki geribildirim gibi hızlı etkilerini, membran reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirdiğine inanılmaktadır ⁵¹.

2.3.5.3. Östrojenlerin Etkileri

- Üreme ile ilgili dokuların gelişimini uyarır.
- Over foliküllerinin gelişimini ve uterus tüplerinin hareketini kolaylaştırır.
- Endometrium, serviks ve vajinanın döngüsel değişikliklerine etki eder.
- Uterusun kan akımını artırır.
- Uterus düz kaslarının kasılmasını ve uterusun oksitosine duyarlılığını artırır.
- FSH salgısını azaltır.
- LH salgısına bazen negatif geribildirim, bazen pozitif geribildirim yapar.
- Meme kanallarının
- Anjiyotensinojen ve tiroid bağlayıcı globulin salgısını artırır.
- Epifiz kapanmasına neden olur.
- Alzheimer hastalığının ilerlemesini yavaşlatır.
- Menstruasyondan önce vücutta su ve tuz tutulumunu artırır.
- Plazma kolesterol düzeyini azaltır ve NO üretimini artırarak vazodilatasyon yapar ve aterogenezi engeller.

2.3.6. Progesteron

2.3.6.1. Progesteron Üretimi

Progestinler içerisinde en önemlisi, 21 karbonlu steroid bir hormon olan P₄'dur ⁵². Ancak küçük miktarlarda bulunan bir başka progestin, 17 α -hidroksiprogesterondur. Bu hormon P₄'la birlikte salgılanır ve aslında onunla aynı etkiye sahiptir. Bu nedenle P₄, tek önemli progestin olarak kabul edilir ⁵². P₄, KL, plasenta, ovaryan foliküller ve az miktarda da olsa testis ve böbrek üstü bezinden salgılanır. Ovaryan foliküllerden 17 α -hidroksiprogesteron salgılanır. Dolaşımdaki P₄'un yaklaşık %2'si serbesttir, %80'i albumine, %18'i ise kortikosteroid-bağlayıcı globuline (KBG) bağlıdır.

Teka hücreleri, GH'lerine pregnenolon sağlar ve GH'leri de pregnenolonu P₄'a dönüştürür (Şekil 2-18). Foliküler evrenin sonuna doğru, P₄ salgısı artmaya başlar.

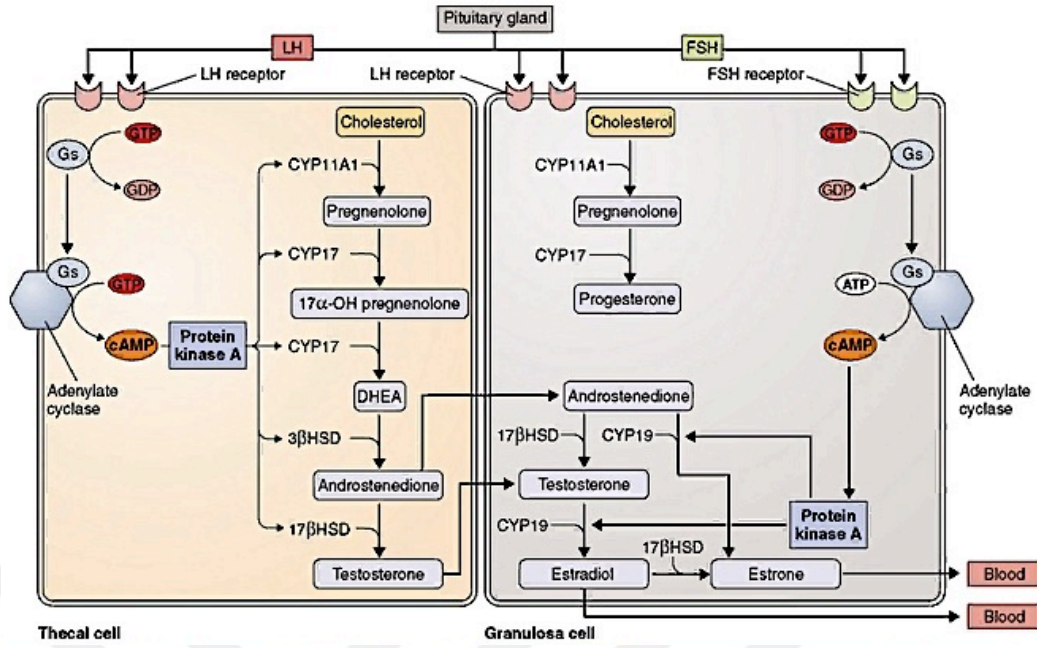
Luteal fazda KL, adenilat siklazın işlev kazanması sonucu LH uyarısı altında yüksek miktarda P₄ salgılar ve plazma P₄ seviyesi belirgin bir artış gösterir (Şekil 2-19) ⁵¹.

2.3.6.2. Progesteronun Etki Mekanizması

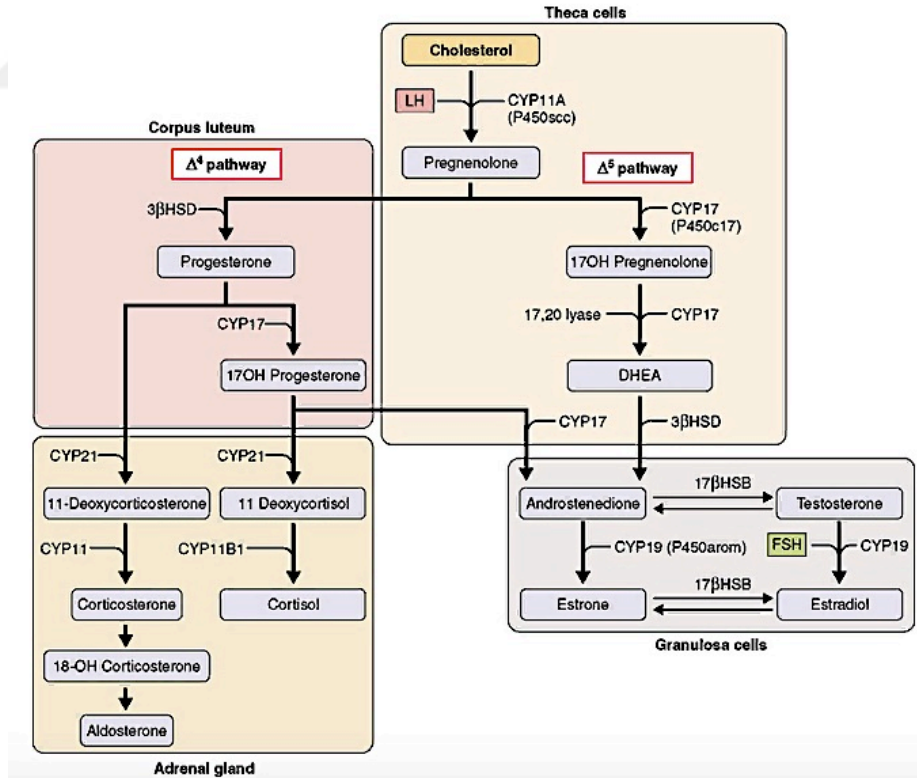
P₄'ün, tek bir genden üretilen iki reseptör izoformu vardır: **Progesteron reseptörü A (PRA)** ve **progesteron reseptörü B (PRB)**. P₄ yokluğunda bu reseptörlere bir ısı şoku proteini bağlıdır ⁵¹. Reseptöre P₄'ün bağlanması, bu ısı şoku proteinini serbest bırakır ve reseptörün DNA'ya bağlanan kısmı açığa çıkar. Reseptör kompleksi ile DNA'nın bağlanması ise mRNA sentezini başlatır. PRA aktive edildiğinde PRB'nin bazı etkilerini inhibe eder.

2.3.6.3. Progesteronun Etkileri

- Endometriumdaki E₂ reseptörlerinin sayısını azaltır.
- Uterusun proliferatif fazdan sekretuar faza geçişini uyarır.
- Uterus düz kaslarının kasılmasını ve uterusun oksitosine duyarlılığını azaltır.
- 17-β östradiolün, daha düşük etkili östrojenlere dönüştürülme hızını artırır.
- Meme lobül ve alveollerinin gelişimini uyarır, süt salgısını destekler.
- Yüksek dozu LH salgısını inhibe eder ve östrojenlerin inhibe edici etkisini güçlendirerek ovulasyonu engeller.
- Isı oluşturur ve muhtemelen ovulasyon sırasında bazal vücut sıcaklığının artışından sorumludur.



Şekil 2-18: Ovaryumdaki östrojen, progesteron ve androjen üretiminin, LH ve FSH ile, iki hücreye ve iki gonadotropin sistemine dayalı olarak düzenlenmesi. LH hem teka hem de GH'leri üzerine etki eder; FSH sadece GH'leri üzerine etki eder. FSH ve LH, G-proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla adenilat siklazı uyarır. Adenosin trifosfattan (ATP) üretilen siklik adenosin monofosfat (cAMP), steroidojenik enzimleri uyanan protein kinaz A'yı aktive eder. Gs, G proteini; GDP, guanozin difosfat; GTP, guanozin trifosfat⁵³.



Şekil 2-19: Ovaryumda steroid hormonların biyosentez yolları. Δ^4 yolağı, pregnenolonu progesterona dönüştürür ve korpus luteumdaki esas yolaktır. Δ^5 yolağı, pregnenolonu androjenlere ve daha sonra östrojenlere dönüştürür ve teka hücrelerinde tercih edilen yolaktır. Ayrıca, sadece adrenal bezde görülen CYP21 ve CYP11a'nın bir sonucu olarak, 17OH-progesteronun, aldosterona ve kortizole dönüştürülmesi de gösterilmiştir. Geri dönüşü olmayan reaksiyonlar tek bir okla; geri dönüşümlü reaksiyonlar çift oklarla gösterilmektedir⁵³.

2.4. POLİKİSTİK OVER SENDROMU (PKOS)

2.4.1. İnsan'da PKOS

PKOS, üreme çağındaki kadınların yaklaşık %5 ila 10'unu etkileyen karmaşık, çok faktörlü bir endokrinopatidir ve anovulatuvar infertilitenin en yaygın nedenidir ^{19,54-61}. Hastalık menarşla başlar ve semptomlar genellikle oligomenore, amenore, anovülasyon, çok sayıda antral folikül, dolaşımdaki LH'nin hipersekresyonu ile daha düşük veya eşdeğer FSH seviyeleri, obezite, hirsutizm, hiperinsülinemi, insülin direnci, hipotalamik-hipofizyal dissenkronizasyon, anormal pulsatil gonadotropin salgısı, granüloza/teka hücre disfonksiyonu, çeşitli metabolik bozukluklar ve aşırı ovarian androjen üretimidir ^{19,62-66}.

PKOS, değişken klinik tabloları ile oldukça heterojen bir sendrom olduğu için tanı kriterleri tartışmalıdır. Stein ve Leventhal, bu sendromu ilk kez 1935 yılında tanımlamışlardır ⁶⁷, PKOS tanısı için belirlenen kriterlerin çeşitli otoriteler tarafından güncellenmiş şekli ise Tablo 2-1'de verilmektedir ⁶⁸⁻⁶⁹.

Tablo 2-1: Çeşitli otoritelere göre PKOS'un tanı kriterleri ⁷⁰.

TANIMLAMA/YIL	TANISAL KRİTERLER
NIH-1990	Eşzamanlı varlığı gerekir: 1. Hiperandrojenizm (klinik ve/veya biyokimyasal) 2. Ovarian disfonksiyon
Retterdam (ESHRE/ASRM)-2003	En az iki kriterin varlığı gereklidir: 1. Hiperandrojenizm (klinik ve/veya biyokimyasal) 2. Ovarian disfonksiyon 3. Polikistik over morfolojisi (PKOM)
AES-2006	Hiperandrojenizmin (klinik ve/veya biyokimyasal) varlığı gerekir ve: 1. Ovarian disfonksiyon 2. PKOM
Androjen Fazlalığı ve PKOS Derneği (Androgen Excess and PCOS Society)-2009	Eşzamanlı varlığı gerekir: 1. Hiperandrojenizm (klinik ve/veya biyokimyasal) 2. Ovarian disfonksiyon (ovulatuvar disfonksiyon ve/ veya PKOM)

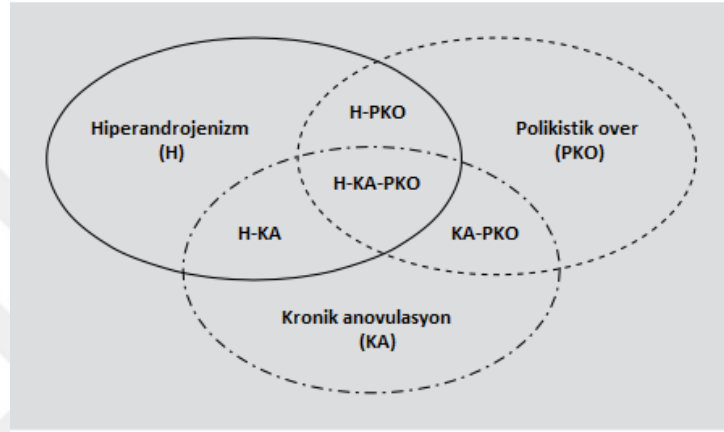
Günümüzde bu kriterlerin olası kombinasyonları kullanılarak dört farklı fenotipte PKOS tanımlanmıştır ve bu farklı fenotipler Şekil 2-20’de görülmektedir ⁷⁰.

Tip A: Hiperandrojenizm, kronik anovülasyon ve polikistik ovaryumlar.

Tip B: Hiperandrojenizm ve kronik anovülasyon.

Tip C: Hiperandrojenizm ve polikistik ovaryumlar.

Tip D: Kronik anovülasyon ve polikistik ovaryumlar.



Şekil 2-20: PKOS’un farklı fenotipleri ⁷⁰.

PKOS’lu kadınlar, genellikle metabolik sendroma tıpa tıp benzeyen metabolik bozukluklara sahiptir ^{60,61,71-74}. Metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıkların gelişimi için Ulusal Kolesterol Eğitimi Yetişkin Tedavi Programına göre, diyabet ve prediyabet, abdominal yağlanma, yüksek kolesterol ve yüksek kan basıncını kapsayan risk faktörleri grubudur ^{68,75-78}. PKOS’lu kadınların %38-88’i obezdir ve %50-70’i insülin direncine sahiptir ⁷⁹⁻⁸³. Sonuç olarak PKOS, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi uzun dönemli hastalıklar ile ilişkili bir endokrinopatidir ^{60,71,72,84,85}.

İkizlerde yapılan kalıtım çalışmaları, PKOS patogenezinin %70’inden fazlasını genetik faktörler ile açıklamaktadır ⁸⁶. Ayrıca genomla ilişkili güncel çalışmalar, obezite, insülin direnci ve FSH’daki genetik varyasyonlarla ilişkili fazlaca korunmuş genlerle PKOS’un genetik olarak ilişkili olduğunu göstermiştir ⁸⁷.

PKOS’lu kadınlar hamile kaldıklarında, gestasyonel diyabet, gebelikle indüklenen hipertansiyon ve preeklamsiyi içeren metabolik gebelik komplikasyonları ve erken doğum gibi perinatal komplikasyonlar da daha fazla görülür ⁸⁸. Dahası PKOS’lu kadınların bebeklerinde, özellikle kardiyovasküler ve ürogenital anomaliler gibi

konjenital anomalilerin riskleri de artar ⁸⁹.

2.4.1.1. Polikistik Ovaryum Morfolojisi (PKOM)

PKOS'lu kadınların ovaryumları hafifçe genişler ve çok sayıda küçük (2-9 mm) antral foliküller içerir. Merkezi stroma artar ve bu foliküller genellikle perifere doğru yerleşirler ⁹⁰. Polikistik overin bu farklı görünümü, her bir ovaryum için 12 folikülden fazlası veya 10 ml'den fazla ovaryum hacmi ile tanımlanmıştır (Rotterdam, 2004a,b). Histolojik olarak büyüyen preantral foliküller ve erken antral folikül oluşumu normale benzer. Ancak mid-antral aşamadaki normal gelişim, folikül büyüme duraksaması ve dejeneratif değişimler göstermeye başlar ⁹⁰. Foliküler sıvı birikimi ve antrumun genişlemesi giderek artar. Folikül genişledikçe GH tabakası apoptoza gider ve giderek daha fazla atretik hale gelir. Sonunda folikül duvarı GH'lerinden yoksun hale gelerek ince duvarlı bir kist görünümünü alır ve kistik folikülleri şekillendirir.

2.4.1.2. PKOS'ta İnsülin Direnci ve Hiperandrojenizm

PKOS'un etiyojisi hem genetik yatkınlık, hem de çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinden etkilenir. PKOS'lu kadınlar, yaşam tarzı ve obezite aracılı ekstrinsik insülin direnciyle şiddetlenen intrinsik insülin direncine sahiptir ⁹¹. Steroidogenez ve androjen mekanizmasının çeşitli yollarının çalışmasına rağmen, hiperandrojenizmin PKOS'taki patogenezi hala belirsizdir. Androjen fazlalığı, konjenital adrenal hiperplazi veya androjen üreten ovaryum tümörleri olan hiperandrojenik kadınlarda PKOM görülmektedir ⁹²⁻⁹⁴. Ayrıca uzun dönem androjen tedavisi alan kadın-erkek transseksüeller, genellikle PKOM sergiler ⁹⁵⁻⁹⁷. Yüksek dozda testosteron uygulanan insan olmayan primatlarda da benzer bulgular görülmüş, artan ovaryum büyüklüğüne, preantral ve antral folikül sayılarında artışlar eşlik etmiştir ⁹⁸. Ek olarak androjenin GH'lerinde FSH reseptör ekspresyonunun artışı indüklediği gösterilmiş ve bu androjen etkisi açısından bir mekanizma olarak düşünülmüştür.

PKOS, puberteden önce veya pubertede ortaya çıkabilir ^{99,100}. Yapılan çalışmalarda, PKOS'lu kızlarda GnRH salım sıklığında artış görülmüştür ¹⁰¹. GnRH'daki bu artış, fazla LH salınımına yol açar. Çok erken safhalarda, büyüyen foliküllerle birlikte LH reseptör ekspresyonunun zamanından önce kazanımıyla birlikte bu durum, ovaryan androjen üretiminin artışına neden olur ¹⁰¹. Hiperandrojenizmin bir diğer nedeni de, hiperinsülinemi olabilir. Çünkü insülin, LH ile birlikte ovaryumun steroidojenik cevabını uyandır ¹⁰².

Androjenler, folikülogenezin yanı sıra, adiposit fonksiyonunda da çeşitli etkilere sahiptir. PKOS'lu kadınlarda hiperandrojenizm, abdominal depolarda yağ birikmesiyle karakterize android vücut yağı dağılımıyla ilişkilidir ¹⁰³. Hiperinsülineminin varlığı obeziteden bağımsızdır ¹⁰⁴ ve dolayısıyla PKOS'da bağımsız bir faktör olabilir. Hiperandrojenizmin hiperinsülinemiye yol açıp açmadığı veya tam tersi hiperinsülineminin hiperandrojenizme neden olup olmadığı ise belirsizdir ve her ikisi de mümkündür ¹⁰⁵. Ayrıca, androjenlerin yanı sıra artan folikül havuzundan salınan diğer faktörlerin, metabolik fenotipe yol açıp açmadığı da bilinmemektedir.

2.4.1.3. Büyüme ve farklılaşma faktörü-9'un rolü

Yapılan çalışmalar, PKOS'da büyüyen foliküllerdeki en fazla artışın, primer aşamadaki folikül sayısında gerçekleştiğini göstermiş ve primerden sekonder aşamaya geçişin PKOS'da daha yavaş olabileceğini düşündürmüştür ¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. TGF- β ailesinin oosite özel bir üyesi olan büyüme farklılaşma faktörü-9, folikülogenezde kritik rol oynar ⁹⁰. Farelerde yapılan çalışmalar, GDF-9'un primer folikülden sonraki büyüme için gerekli olduğunu ve dişi GDF-9 knock-out farelerin primer aşamada folikülogenezlerinin tamamıyla engellenerek infertil hale geldiklerini göstermiştir ¹⁰⁸⁻¹⁰⁹, PKOS'lu ve normal ovaryumlarda, GDF-9 ekspresyonunu incelemiş; GDF-9 ekspresyonunun PKOS ovaryumlarında, transizyonelden Graaf foliküllere kadar tüm gelişimsel aşamalardaki oositlerde, normale kıyasla azaldığını göstermişlerdir. Filho ve ark., PKOS'da primer foliküllerin oositlerinin sadece %8-12'sinde GDF-9 sinyali olduğunu, normal kontrollerde ise %96'sında bulunduğunu ve daha gelişmiş foliküllerde sinyal olduğunda, normal foliküllere kıyasla daha zayıf olduğunu göstermiştir ¹⁰⁹. Böylece primer folikül aşamasındaki büyümenin yavaşlamasına makul bir açıklama gelmiştir. Dolayısıyla PKOS'da büyüme hataları folikülogenezin en erken aşamalarında, antral folikülün duraksamasından hemen önce başlayabilir.

2.4.1.4. Anti-müllerian hormon (AMH)

TGF- β ailesinin bir diğer üyesi olan AMH, özellikle büyüyen preantral ve küçük antral foliküllerin GH'leri tarafından üretilir ve folikül olgunlaşmasının ilerlemesini negatif olarak düzenler ¹¹⁰. PKOS ovaryumlarında primordiyal ve primer foliküllerde AMH ekspresyonu, normal ovaryumlara kıyasla azalmıştır ¹¹¹. Erken aşamadaki foliküllerde AMH ekspresyonunun kısmi azalması, PKOS'da preantral folikül sayısının artışı için olası bir mekanizma ortaya koyabilir. İlginçtir ki PKOS'lu kadınlarda serum

AMH düzeyleri normal kadınlarda görülen değerlere kıyasla 2-3 kat artmaktadır. Bu PKOS'da folikül sayısının artışına atfedilirken güncel kanıtlar, her GH'de in vitro AMH üretiminin bu hastalıkta arttığını göstermektedir ¹¹². Diğer bir deyişle PKOS ovaryumlarında her küçük antral folikül, ilgili normal bir folikülden daha fazla AMH üretir. Özetlersek bu bulgular PKOS'lu kadınlarda AMH ekspresyonunun erken büyüyen foliküllerde azalarak gelişimin ilerlemesine izin verebileceğini düşündürmektedir. Ancak antral aşamaya gelen folikül büyümesiyle birlikte artan AMH üretimi, artan folikül sayısının ve her hücre için daha fazla üretimin sonucu olarak meydana gelebilir.

2.4.2. PKOS'un Kemirgen Modelleri

Hiperandrojenizm, PKOS'un ana sebebi olarak düşünülmektedir. Bu nedenle çoğu PKOS hayvan modeli androjenlerle indüklenmektedir. PKOS fare modellerinde en sık kullanılan androjenler testosteron, DHEA ve dehidrotosteron (DHT)'dur ^{113,114}. Ancak bazı modellerde östrojen tedavisi de uygulanmıştır ¹¹³. Androjenler ile oluşturulan bu modellerde, üç ana modelleme paradigması kullanılmıştır:

1. Prenatal ve/veya neonatal steroid manipülasyonu kullanarak polikistik ovaryumların gelişimsel programlaması: Bu yöntem primatlarda ve koyunlarda tanımlanan PKOS'un prenatal androjenizasyon modelini tekrarlamaktadır ¹¹⁵.
2. Pubertal veya yetişkin hayvanların steroid ile manipülasyonu ^{100,116}.
3. Polikistik ovaryum fenotipine sahip knock-out ve knock-in transgenik fare modellerinin değerlendirilmesi.

Gelişimin farklı aşamalarında steroid indüksiyonu, pre- veya postnatal hayatta veya yetişkinlikte PKOS'un farklı fenotiplerini indüklemek için kullanılır ve çoğunlukla hiperinsülinemi ve/veya insülin direncinin başlamasıyla ilişkilendirilmektedir ¹¹⁴. PKOS, artan insülin direnci insidansı ile birlikte polifoliküler ovaryumlar, hiperandrojenizm ve anovülasyonun yer aldığı bir fenotipik spektrumunu yansıtır. Ancak FSH düzeyleri karakteristik olarak normal menstrual siklus aralığında kalır. PKOS'lu kadınlarda pulsatil LH salgısı ve serum LH'ı artarken PKOS'lu obez kadınlar normal veya hafif artmış konsantrasyonlarda LH'a sahip olmaya yatkındır. Tek problem kemirgen ovaryumu ve mono-ovüler türler arasındaki farktır.

Normal östrus siklusunda en az altı ovülasyonlu poli-ovüler türlerden sıçan ve fare ovaryumlarında herhangi bir dönemde çok sayıda büyük folikül bulunur. Bu preovulatuvar foliküller kısmen sağlıklıdır, büyümektedir ve fonksiyonel olarak normaldir ve apoptoz, atrezi ve aromataz aktivitesi analiziyle belirlenebilir. Dahası, geçerli östrus siklusunun ve önceki östrus siklusunun lutealize giden KL'ları da bulunur ve ovaryuma hakim kitleyi oluşturur. Yetişkin hayvanlarda herhangi bir sebeple ovülasyonun olmaması, ovaryumda KL yokluğuyla ve çoklu antral foliküllerin varlığıyla kolayca tanınabilir. Ancak, kemirgenlerde polikistik ovaryumların doğası, kadınlardaki gibi olmayabilir.

Kadınlarda FSH plazma düzeylerinin düşük olduğu normal menstrual siklusun luteal fazında veya hipogonadotropik hipogonadizimli kadınlarda (örneğin Kallman Sendromu) foliküller, ebat olarak yaklaşık 5 mm'e kadar görülür, FSH yokluğunda veya düşük FSH varlığında bu ebat büyümeye devam eder ^{117,118}. Folikül büyümesinin bu aşaması gonadotropinden bağımsız aşama olarak adlandırılır; gonadotropinlerden özellikle FSH folikül büyümesinin hızını etkileyebilmesine rağmen gerekli değildir ¹¹⁹. 18-20 mm çaptaki preovulatuvar ebatta foliküllerin büyümesi tamamen FSH ve LH'a bağımlıdır, bu da folikül büyümesinin gonadotropin bağımlı aşamasıdır. PKOS'lu kadınlarda folikül büyümesi, bu gonadotropin bağımlı aşamada duraksar. Preovulatuvar folikülün çapının yarısından daha küçük olan foliküllerin ebatları 5 mm ila 10 mm arasında değişir. Aslında bu duraksayan foliküllerin neredeyse çoğu kistikdir, sağlıklı bir oosit içerir ¹²⁰ ve ekzojen FSH ile kurtarılabilir. Aslında çoklu preovulatuvar foliküllerin gelişimiyle birlikte ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS), gonadotropinlerle ovaryan stimülasyonu yapılan PKOS'lu kadınlarda ana risktir ¹²¹. Tersine kemirgen modellerin birkaçında foliküller, bir preovulatuvar folikülün ebadına eşit veya daha büyüktür ve bazıları veya çoğu tedaviye bağlı olarak ve tedavi sırasında aslında atretik ve kistik olabilir. PKOS'lu kadınlar normal veya hafif artmış serum östradiol konsantrasyonlarına sahiptir. Bazı kemirgen modeller letrozol kullanılarak östrojenleri elimine etmektedir veya aromataz geninin knockout edildiği ArKO transgenik farelerde ovaryumların endojen androjen üretimi artmaktadır. Ancak östrojen yokluğunda preovulatuvar folikül sayısı artacak ve preovulatuvar LH artışı başlatılmazken ovaryumlarda gonadotropin kullanımı artırılarak ovülasyon inhibe edilecektir. Bu da polikistik ovaryum izlenimi vermekte fakat PKOS ile bağlantısı yanıltıcı olabilmektedir.

2.4.2.1. Dihidrotestosteron (DHT)

DHT ile tedavi, kemirgenlerde PKOS benzeri fenotipi uyarmak için en sık kullanılan yaklaşımdır. DHT, aromatize edilemeyen bir androjen olduğundan dolayı testosteronun tersine östradiole çevrilemez. Bu nedenle DHT tedavisiyle elde edilen sonuçlar tamamen DHT'ye atfedilebilmektedir. Ancak veriler DHT'nin, östrojen reseptörü β 'ya bağlanabilen 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol'e metabolize edilebildiğini göstermektedir¹²². Buna karşın DHT androjen reseptörüne karşı testosterondan daha yüksek affiniteye sahiptir, bu da daha güçlü bir androjen olmasını sağlar. Gebeliğin 16-18. günlerinde dişi farelerin 250 μ g DHT ile prenatal tedavisi, dişi yavrularında üreme anomalilerine yol açmıştır¹²³⁻¹²⁶.

2.4.2.2. Testosteron

Testosteron sıklıkla PKOS sıçan modellerinde kullanılsa da¹²⁷⁻¹³⁰, nadiren farelerde de uygulanmaktadır. Farelerde testosteronun sadece neonatal olarak uygulandığı modeller tanımlanmıştır. Dişi farelerin yaşamlarının ilk üç gününde 100 μ g testosteron veya testosteron propionat uygulaması, anovülasyona ve polifoliküler ovaryumlara yol açar¹³¹.

2.4.2.3. Dehidroepiandrosteron (DHEA)

DHEA, esasen adrenal kaynaklı bir androjendir ve PKOS'lu kadınlarda artış gösterir¹³². Dolayısıyla DHEA farklı kemirgen modellerinde PKOS'u indüklemek için kullanılmaktadır. DHEA, sıçanlarda PKOS'u uyarmak için ilk kez Roy ve ark. tarafından kullanılmıştır¹³³. Yaklaşık 22 günlük prepubertal sıçanlar genellikle 20-27 günler arasında günlük olarak DHEA (0,2 ml SY içerisinde çözülmüş 6 mg/100 g vücut ağırlığında) enjeksiyonu yapılmaktadır. Uygulama sonrasında sıçanlar asiklik ve anovülatuar hale gelmektedir¹³⁴⁻¹³⁶. DHEA ile indüklenen sıçanlarda 0,45 ila 2,2 mm arasında değişen çaplarda çoklu foliküler kistlere sahip çeşitli şiddette kistik ovaryumlar gelişmektedir ve bunların granüloza hücre tabakaları dejenere olmaktadır. Ovaryum tunikasının kapsülü kalınlaşmamakta ve DHEA uygulanan sıçanların ovaryum ağırlığı anlamlı derecede artmaktadır¹³⁴⁻¹⁴⁰.

Farelerin prenatal DHEA androjenizasyonu rapor edilmemiştir; bunun sebebi belki de gebeliğin erken döneminde (7. güne kadar) prenatal DHEA tedavisinin embriyonik rezorpsiyona neden olmasıdır¹⁴¹. Düşük dozlarda DHEA'nın prenatal

uygulanması veya gebeliğin daha ileri aşamasında uygulanması embriyonik rezorpsiyonu koruyabilir ve PKOS'u indükleyebilir ancak henüz böyle bir çalışma uygulanmamıştır. Dolayısıyla çoğu çalışmada DHEA ile prepubertal uygulama yapılmıştır.

Tanımlanan çalışmalarda DHEA uygulaması pubertede başlatılmıştır. Motta ve arkadaşları 25 günlük farelere 20 gün boyunca günlük enjeksiyonlarla 6 mg/100g vücut ağırlığı dozda DHEA uygulamıştır¹⁴²⁻¹⁴⁴. Uygulama yapılan fareler infertildir ve ovaryumlarında her biri için ikiden fazla olmamasına rağmen daha fazla atretik folikül ve foliküler kistler vardır. Bu kistler ince bir teka tabakası ve kompakt bir granuloza hücre tabakasına sahiptir (Tablo 2-2). Bu az sayıda kist, özellikle poliovülatuar türlerde ince teka hücre tabakasıyla birlikte, PKOS'lu kadınlardaki foliküler fenotiple uyuşmamaktadır. Ovaryum foliküllerine benzer bir etki de yaklaşık 22 günlük immatür sıçanlara 7-21 gün arasında DHEA uygulamasından sonra görülmüştür. Sonuç olarak farelerin DHEA ile postnatal tedavisi başlıca metabolik fenotip olmak üzere bazı PKOS fenotiplerini indüklemiştir (Tablo 2-2). Ancak ovaryan fenotipi insan fenotipi ile birebir aynı değildir.

Tablo 2-2: Androjen uyarılı PKOS fare modelleri ve özellikleri¹¹³.

UYGULAMA	UYGULAMA ZAMANI	OVARYAN FENOTİP	HORMON SEVİYELERİ	METABOLİK FENOTİP
DHT	Prenatal	Bozulmuş östrus siklusu Azalmış KL Küçük antral folikül sayısında ↑ İnce GH tabakası Kalın TH tabakası	LH ↑ T ↑ GnRH aktivitesi ↑	Viseral adiposit boyutu ↑ Açlık glukoz seviyesi ↑ Glukoz intoleransı
DHT	Prepubertal	Devamlı anöstrus KL yokluğu Atretik folikül sayısında ↑ Kist benzeri yapılar İnce GH tabakası Kalın TH tabakası	Leptin ↑ Adiponeptin ↓	Vücut ağırlığı ↑ Adiposite ↑ Adiposit boyutu ↑ Glukoz intoleransı
T	Neonatal	Anovulasyon Polifoliküler ovaryumlar	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış
Testosteron propionat	Neonatal	Kist benzeri yapılar KL yokluğu	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış
DHEA	Pubertal	İnfertilite Antral folikül sayısında ↑	Tanımlanmamış	Vücut ağırlığı ↑ İnsülin ↑ Glukoz ↑
Östradiol	Neonatal	Kist benzeri yapılar KL yokluğu	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış

DHT: Dehidrotestosteron; T: Testosteron; DHEA:Dehidroepiandrosteron; DLH: Luteinleştirici hormon; GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon; ↑:Artış; ↓: Azalış.

2.4.2.4. Östrojenler:

5-7 günlük neonatal farelerde 20 µg östradiol ile günlük subkutan enjeksiyonlar PKOS modelini geliştirmek üzere uygulanmaktadır ¹⁴⁵. 100 günlük farelerin ovaryumlarının analizi bu kısa süreli östradiol tedavisinin foliküler kist oluşumuna ve KL'un tamamen yokluğuna yol açtığını göstermiştir ¹¹³. Ancak folikül ve kistlerin morfolojisi çalışılmamıştır.

2.5. MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN (mTOR)

PKOS, yaşam boyu devam eden, heterojenöz belirtiler ve semptomlar birleşimi olan bir endokrinopatidir ¹⁴⁶. Ancak moleküler patogenezi hala bilinmemektedir. PKOS ve OK'nde özellikle aktif olduğu görülen fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT/mTOR sinyal yolağının, PKOS ve ovaryum kanseri (OK) patogenezi ile yakın ilişkisi olduğu düşünülmektedir ⁶².

2.5.1. mTOR kompleksleri

mTOR, evrim sürecinde geni ve proteini nispeten korunmuş bir serin/treonin kinazdır ⁶². Fosfatidilinositol kinaz-ilişkili kinaz (PIKK) protein ailesine aittir ve hücre büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını aktif olarak düzenlediği, translasyon, ribozom biyogenezi, besin taşınması ve otofajide aktif rol oynadığı gösterilmiştir ⁶². Ayrıca mTOR aracılı sinyal yolağı, tip 2 diyabet ve bazı kanserler gibi bir dizi hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynar ⁶². Stres, besin yetersizliği ve büyüme faktörlerinin azalması sonucunda mTOR aktivitesi de azalır. Bu da, hücre proliferasyonu ¹⁴⁷ ve doku büyümesinde azalmaya ¹² ve otofajinin başlamasına yol açar ¹⁴⁸.

mTOR, makromoleküler bir proteindir ve farklı proteinlerle birleştiğinde iki farklı tipte kompleks oluşturur: rapamisine duyarlı mTORC1 ve rapamisine duyarsız mTORC2 ⁶². mTORC1, mTOR, Raptor, mLST8 ve PRAS40'dan oluşur ^{62,149}. Hücre büyümesi ve çoğalması, protein sentezi, metabolizma ve otofaji, RNA translasyonu ve besin metabolizmasını düzenleyerek mitokondriyal ve ribozomal biyogenezde kritik bir rol oynar ⁶². mTORC2, mTOR, Rictor, Sin1, PRR5/PRR5L (Protor 1/Protor 2) ve mLST8'den oluşur ve oynadığı başlıca roller hücre iskeleti organizasyonu, hücre sağkalımı ve polaritedir ¹⁵⁰⁻¹⁵⁹. 1991 yılında Heitman ve arkadaşları, mTORC1 ve mTORC2'nin mayadaki farklı genler tarafından kodlandığını göstermiştir. mTORC1,

5'TOP mRNA'larının translasyonu yoluyla protein sentezini ve ribozomal biyogenezi indükleyerek translasyonun başlatılmasını sağlar. mTORC2, serum ve glukokortikoid kaynaklı protein kinaz 1 (SGK1) ve AKT'nin seviyelerini düzenleyerek hücrel büyüme ve hayatta kalmaya aracılık eder ⁶². mTORC2, RhoA ve PKC- α 'yı düzenleyerek hücre iskeleti organizasyonu ve hücre polaritesini de düzenleyebilir ¹⁶⁰.

2.5.2. mTOR Komplekslerinin Upstream Regülatörleri

İki mTOR sinyal yolağı vardır: PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ve LKB1/AMPK/TSC/mTOR sinyal yolağı ⁶². Bunlardan ilki, fosforilasyon ile çalışır Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve insülin gibi büyüme faktörleri, hücre büyümesini düzenleyen süreç sırasında, hücre yüzeyinde bulunan reseptör tirozin kinazlar (RKT) ile birleşerek AKT'yi aktive eder ¹⁶¹. AKT, doğrudan veya dolaylı olarak, TSC1/TSC2 kompleksi aracılığıyla tüm sinyal yolağını harekete geçirebilir ¹⁶². TSC1/TSC2 kompleksinin negatif bir regülatör olması nedeniyle, PI3K/AKT/mTOR yolağının upstream molekülü ile birleşerek mTOR aktivasyonunu baskılayabilir. Bunun yanında AKT, fosforilasyon yoluyla TSC1/TSC2 kompleksini inhibe edebilir. TSC1/TSC2, mTORC1'in kritik bir upstream regülatörüdür. TSC1/TSC2, PI3K yolağını aktive etmek için büyüme faktörleri de dahil olmak üzere mTORC1 üzerinde etkili olan upstream akım sinyallerinin çoğunu iletir ¹⁵².

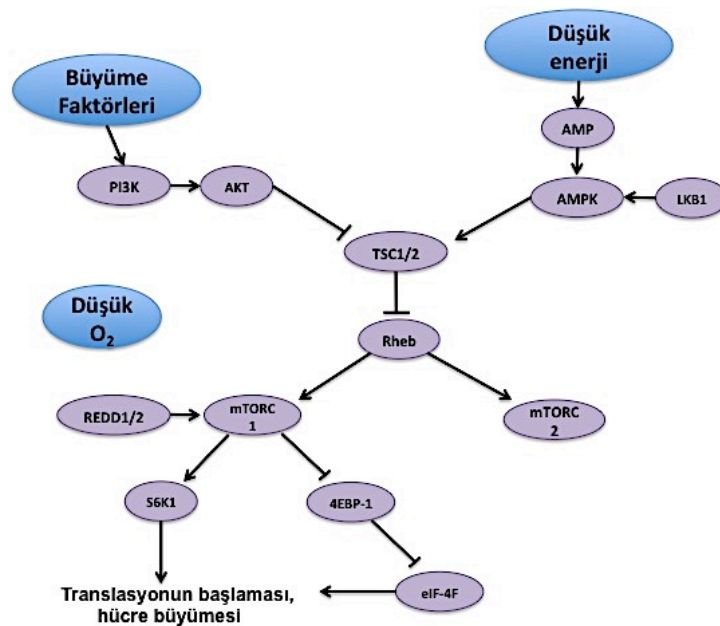
İkinci yolda, AMPK enerji sensörü gibi davranır ve AKT gibi doğrudan mTOR üzerine etki edebilir. AMPK, mTORC1'in allosterik inhibisyonunu uyaran raptoru fosforile edebilir ¹⁶³. Ek olarak, AMPK, GTP enzim aktivitesini arttırmak ve bir mTORC1 aktivatörü olan GTP-bağlayıcı protein Rheb'i baskılamak suretiyle TSC1/TSC2 kompleksini aktive edebilir ⁶². Ayrıca, glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β), TSC1/TSC2 kompleksini de aktive edebilir. Ayrıca, düşük oksijen ve enerji seviyesi gibi bazı faktörler, LKB1/SKT1-AMPK yolağı ile kontrol edilen TSC1/TSC2 kompleksi aracılığı ile mTORC1 üzerine etki edebilir ¹⁶⁴ ve enerji stres koşullarında mTORC1 aktivitesini baskılayabilir ¹⁶⁵.

mTORC2 aktivitesi ise birçok büyüme faktörü aracılığı ile artabilir, fakat upstream regülasyon mekanizmaları yeterince anlaşılammıştır ⁶². mTORC2'nin insülin ile ¹⁵² ve PI3K yolağı ile ¹⁶⁶ aktive edilebileceği gösterilmiştir. Ashworth ve arkadaşları ¹⁶⁷ PKB/AKT'nin tam aktivasyonunda, mTOR'un, fosforilasyonun iki aşaması ile önemli bir rol oynadığına işaret etmiştir. İlk olarak, proteinin Thr308'i PDK1 tarafından

fosforile edilir. İkinci aşamada Ser473 kalıntısı, mTORC2 ile fosforile edilir. Daha sonra, mTORC2, dolaylı olarak PKT/AKT'nin aktivasyonu yoluyla mTORC1 aktivitesini artırabilir. TSC1/TSC2 kompleksinin mTORC2'yi aktive edebildiği de gösterilmiştir. Ayrıca TSC1/TSC2 kompleksi mTORC1 yerine mTORC2 ile fiziksel olarak birleşebilir ¹⁶⁶ mTORC1'in Rictor'un fosforilasyonu ile mTORC2 aktivitesini baskılaması ¹⁶⁸ mTORC1 ve mTORC2 arasında işlevsel olarak bir bağlantı olduğunu gösterir ⁶².

2.5.3. mTOR komplekslerinin downstream regülatörleri

Aktive edilmiş mTOR sinyal yolağında iki downstream hedef vardır: 70s ribozomal protein S6 kinaz (S6K1) ve ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein 1 (4E-BP1) ⁶². S6K1, translasyon başlatmayı daha da ileriye götüren, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4B (eIF4B) ve ökaryotik başlatma faktörü 2 kinaz (eEF2K)'ı fosforiller ¹⁶⁹. S6K1 ayrıca mTORC1 ile fosforile edilebilir ve sonuç olarak translasyon başlatma aktivasyonuna neden olur. Ancak bazen, aynı zamanda, insülin reseptör substratı 1'in (IRS1) aktivitesini baskılayarak PI3K sinyalini azaltır ve fosforile edilmiş S6K1 yoluyla translasyonun başlatılmasında negatif bir rol oynar ¹⁷⁰. 4E-BP1 negatif bir regülatördür ve eIF4E translasyon başlatma faktörünü bağlar. 4E-BP1'in mTOR tarafından fosforilasyonu, eIF-4E'yi serbest bırakır ^{171,172}. Salınmış eIF-4E, eIF-4A, eIF-4G ve eIF-4B'ye bağlanarak eIF-4F kompleksini oluşturur ve translasyonun başlatılmasını teşvik eder ¹⁷³ (Şekil 2-21).



Şekil 2-21: mTOR sinyal yolağı ⁶².

2.5.4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu ve PKOS arasındaki ilişki

Zhang ve arkadaşları PKOS'lu hastalarda, kontrol bireylere kıyasla daha yüksek fosforile AKT (p-AKT) ifadesi olduğunu raporlamıştır ¹⁷⁴. PKOS hastaları, homeostaz model değerlendirme-insülin direnci (HOMA-IR) indeksine dayanarak, insülin direnci olan ve insülin direnci olmayan şeklinde gruplandırıldığında, insülin direnci grubunda p-AKT'nin insülin direnci olmayan gruba göre daha yüksek bir ifadeye sahip olduğu bulunmuştur ⁶². Roa ve arkadaşları, ergenlik başlangıcı ve LH salgılanmasının kontrolünde, mTOR'un önemli bir rol oynadığını belirtmiştir ¹⁸. Bununla birlikte, mTOR sinyal yolu rapamisin tarafından bastırıldığında, pubertede gonadotropik aksın inhibisyonuna, östradiol ve LH seviyelerini azaltmaya, vajinal açıklığı önemli ölçüde geciktirmeye ve uterus ve ovaryum atrofisine neden olur. mTOR, p70S6K kinaz ve 40S ribozomal protein S6'nın fosforillenmesi yoluyla translasyonun başlatılmasını teşvik eder ¹⁷⁵. Yaba ve Demir, mTOR ifadesinin PKOS'lu farelerde, kontrol ile karşılaştırıldığında arttığını ve mTORC1 ve mTORC2'nin PKOS gelişiminde önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir ¹⁹. Yaba ve Demir başka bir çalışmalarında ise mTOR'un, mitotik bir sağkalım kontrol noktası olarak çalışarak, folikül büyümesini in vivo olarak düzenleyebildiğine dikkat çekmişlerdir ¹⁷⁶. Ayrıca aynı çalışmada Rapamisin tarafından inhibe edilen mTOR aktivasyonunun, in vitro folikül büyümesini ve granüloza hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir ¹⁷⁶. Allemand ve arkadaşları, S6K ve mTOR'un yüksek fosforilasyonunun, insülin IRS1'in aktivasyonunu inhibe ettiğini ve bu durumun insülin direnci ile sonuçlandığını ortaya koymuştur ¹⁷⁷.

2.5.5. PKOS Tedavisinde mTOR İnhibitörleri

Enerji stresi, endoplazmik retikulum (ER) stresi, asit yoksunluğu ve hipoksi ile mTORC1 aktivitesinin baskılanabileceğini destekleyen araştırmalar vardır ^{151,152}.

Birinci jenerasyon mTOR inhibitörlerinin çeşitli tipteki tümörlerde tedavide etkili olduğu gösterilmiştir ⁶². Ayrıca, giderek artan sayıda çalışma klinik etki olup olmadığını araştırmak için ikinci nesil mTOR inhibitörleri olarak PI3K veya AKT'yi hedeflemeye çalışmaktadır ⁶².

Klinik uygulamada rapamisin ve türevleri, Everolimus, Temsirolimus ve Ridaforolimus genellikle ilk sırada kullanılan mTOR inhibitörleridir. Rapamisin LH

seviyesini azaltır ve bu nedenle PKOS hastalarını tedavi etmek için kullanılır¹⁸. Ovulasyonu uyarmak, PKOS hastalarının tedavisinde en temel yöntem olarak kabul edilir ve dolaylı olarak FSH seviyesini artırma yeteneğine sahip bir oral östrojen reseptörü olan klomifen sitrat (CC) tarafından gerçekleştirilebilir. CC, ilk tedaviden sonra ovulasyonu %80'e kadar geri döndürebilir, ancak gebelik oranı sadece %35 kadardır¹⁷⁸. Temsirolimus yeni bir oral mTOR inhibitörü tipidir ve oral ilaç tedavisinden sonra rapamisine hidrolize edilebilir. Düşük biyoyararlanımı olduğu için, Temsirolimus PKOS semptomunları için de kullanılabilir⁶². Bu terapötik veriler, LH veya FSH sekresyon seviyesini değiştirmenin PKOS'un semptomlarını hafifletmeye eğilimli olduğunu göstermiştir⁶². Bugüne kadar, Rapamisin, PKI-587¹⁷⁹, PI-103¹⁸⁰ ve diğer bazı küçük moleküllü inhibitörlerin türevleri geliştirilmiştir.

2.5.6. PKOS Tedavisinde PI3K İnhibitörleri

Shah ve ark'nın, pre-pubertal dişi sıçanlarda metformin ve quersetin tedavisi ile gerçekleştirdiği PKOS deneyinde, quersetin ile tedavi edildikten sonra PKOS grubundaki ovaryum ve uterus ağırlıkları, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma gösterirken, LH, testosteron ve insülin düzeyleri de dramatik şekilde iyileşmiştir¹⁸¹. Quersetinin ayrıca, PI3K aktivitesini de inhibe edebileceği gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışma, quersetin'in PKOS hastaları üzerinde PI3K sinyal yolağını inhibe ederek pozitif etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Sivalingam VN ve arkadaşları, etkili bir oral anti-hiperglisemik ilaç olan metforminin, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı ile etkileşerek PKOS'lu kadınlarda ovulasyonu desteklemek için tek başına veya CC ile kombine olarak kullanılabileceğini göstermiştir¹⁸². Zhao ve arkadaşları da ayrıca, LY-294002 (PI3K inhibitörü) ve BAY-117082'nin PKOS hastalarında WNT5 α ile indüklenen inflamasyonu açıkça önlediğini göstermiştir¹⁸³.

2.6. MİKRO RNA'LAR (miRNA)

Ambros ve arkadaşları tarafından 1993 yılında keşfedilen miRNA'lar endojen, küçük, kodlama yapmayan, tek zincirli RNA molekülleridir ve uzunlukları 22-24 nükleotit (nt) arasında değişir¹⁸⁴. Primer miRNA (pri-miRNA)'lar transkriptleri birkaç kilobaz uzunluğundadır ve nukleusta aşamalı işlemlerden geçerek 70 ila 90 nt uzunluğunda prekürsör miRNA (pre-miRNA) üretimine yol açar. Pre-miRNA'lar Dicer ile ileri işlemlerden geçerek çift zincirli mRNA dupleksini ve sonrasında olgun miRNA'ları oluşturur. Olgun miRNA'lar hedef mRNA'ların 3'-çevrilmemiş bölgesine

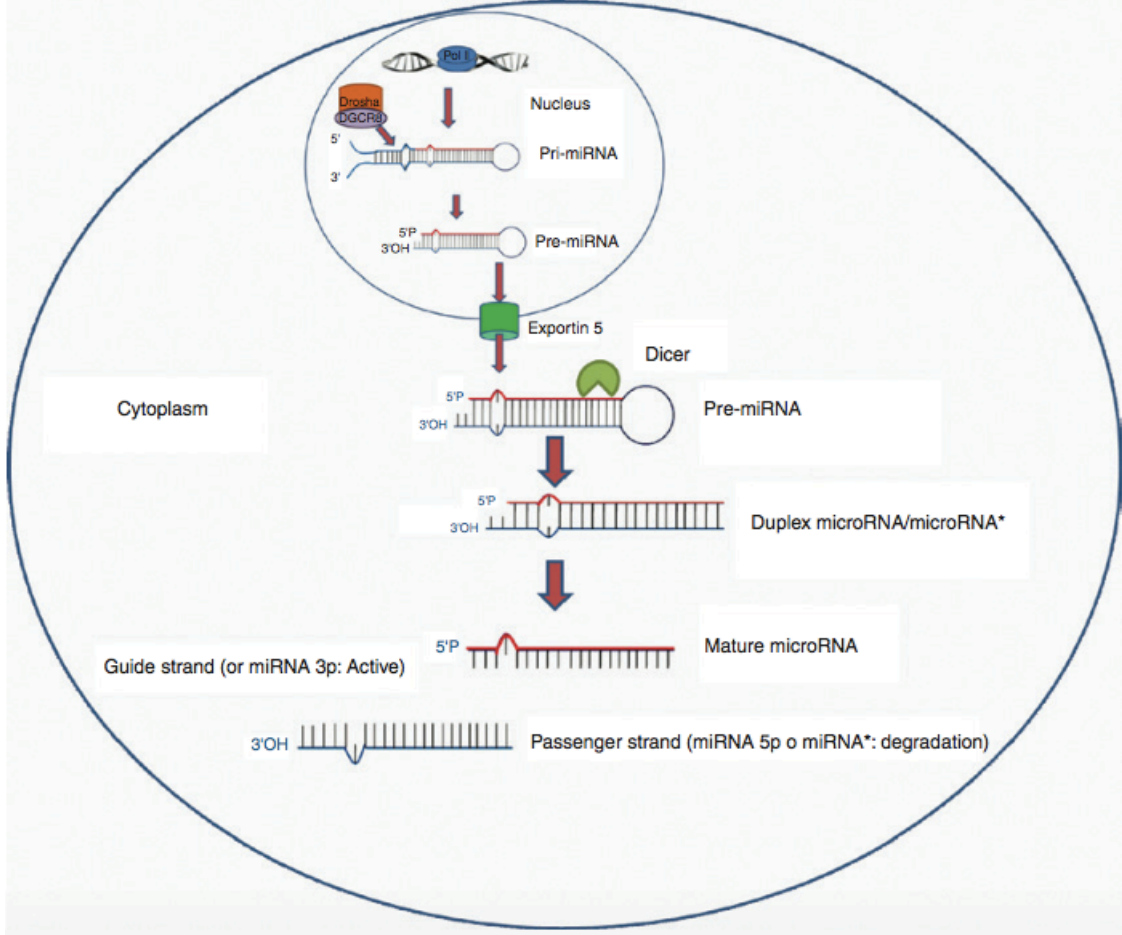
(3'-UTR) bağlanarak translasyonu düzenlemede önemli roller oynar¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Ekzozom ile kontrol edilen miRNA transferi hücreler arasındaki genetik alışverişin ana mekanizmasıdır¹⁸⁸. Kosaka ve ark. dolaşımdaki miRNA'ların, miRNA, mRNA ve proteinler gibi ekzozomlar ile salındığını ve sonrasında fonksiyonlarını yerine getirmek üzere alıcılara transfer edildiğini rapor etmiştir¹⁸⁹.

miRNA'lar hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozu ve hormon biyosentezi ve salınımı gibi çeşitli önemli hücresel fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesine dahil olur¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. İnsan ovaryumu doğumda, uzun süreli fertil süreçte hazırlanan yaklaşık 10.000 primordiyal folikül içerir. Folikülogenez ve steroidogenez, intraovaryan gen ekspresyonu, sinyal yolları ve endokrin ve parakrin faktörleri de dahil eden kompleks süreçlerdir¹⁹¹⁻¹⁹². PTEN/PI3K/Akt sinyal yolağı oositin proliferasyonuna, sağkalımına, göçüne ve metabolizmasına katkıda bulunur¹⁹³. Wingless tipte MMTV integrasyon bölgesi ailesi üyesi 4 (WNT4) granüloza fonksiyonlarının düzenlenmesinde antral folikül gelişimi için gerekmektedir¹⁹⁴. TGF- β süper ailesi üyeleri GDF9 ve kemik morfogenezik protein 15 (BMP15), folikül gelişiminde ana regülatörlerdir¹⁹⁵ ve miRNA'lar granüloza hücre proliferasyonu ve apoptozunda görev alırlar²¹.

2.6.1. miRNA'ların Biyogenezi ve Etki Mekanizmaları

Günümüzde hayvan genomlarında 1000'den fazla miRNA tanımlanmasına rağmen çok azının fonksiyonu aydınlatılmıştır¹⁹⁶. Tüm miRNA'lar işlemde geçer ve koordine bir dizi süreci takip eden kompleks bir biyogenezle olgunlaştırılır (Şekil 2-22). Başlangıçta miRNA genleri, bir veya daha fazla RNA polimeraz II yapısıyla uzun pri-miRNA'lar olarak transkripte edilir. Bu pri-miRNA'lar RNaz III Drosha komplekleri tarafından işlenerek uzun pre-miRNA'lara dönüştürülür. Saç tokası şeklinde yapıya sahip pre-miRNA'lar sonra eksportin 5 aracılığıyla sitozola nakledilir ve RNaz II Dicer tarafından ileri işlemlerden geçirilerek olgun miRNA'lar meydana getirilir. Sonuçta kılavuz zinciri olarak adlandırılan ve diğer zincirden daha yüksek seviye gösteren olgun tek zincirli miRNA'lar, RNA ile indüklenen susturucu (silencing) kompleksine girer (RISC)¹⁹⁷. Yolcu zinciri adı verilen ve adının sonuna yıldız (*) işareti alan diğer zincir parçalanır. Bazı vakalarda 5p ve 3p adı verilen her iki zincir de fonksiyoneldir ve yüksek seviyelerde saptanır¹⁹⁸. miRNA-RISC kompleksleri hatalı baz eşleşmesiyle hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanır¹⁹⁹⁻²⁰⁰. Bu miRNA-mRNA etkileşimi

translasyon başlangıcını baskılar veya hedef mRNA'nın endonukleolitik klivajını indükler^{187,199}. Hayvan miRNA'ları genellikle hedef genlerinin korunmuş çekirdek sekanslarından sadece 7-8 bazıyla kısmi homoloji gösterir ve translasyonel represyonu indükleyebilir²⁰¹.



Şekil 2-22: miRNA biyosentezi²⁰².

2.6.2. Ovaryumda miRNA Profilleri

miRNA ekspresyonu organa spesifiktir ve organ fonksiyonu ile özellikle de ovaryum ile yakından ilişkilidir. Ovaryumda eksprese edilen miRNA'lar memeli üremesinin düzenlenmesinde görev alırlar. miRNA ekspresyonu ve fonksiyonu farklı hücre türleriyle ilişkilidir. Biyoinformatik ve gen ontolojisi analizleri, ovaryumda ağırlıklı olarak eksprese edilen miRNA'ların hedef genlerinin hücre siklusu düzenlenmesi, hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozunda, endokrin sistem hastalıklarında ve ovaryan fonksiyonlarda görev aldığını göstermiştir²⁰³.

miRNA ekspresyon profilleri insan, fare, sığır, koyun, tavuk, balık domuz ve at

gibi çeşitli türlerde de tanımlanmıştır ^{196,197,204-209}. Timoneda ve ark. Domuz ovaryumlarında özellikle let-7a, miR-25 ve miR-106a'nın eksprese edildiğini bulmuştur ¹⁹⁸. Li ve ark. yetişkin domuzların hem ovaryum hem de testislerinde miR-21-5p, miR-143-3p ve let-7 ailesi üyelerinin en özgün miRNA'lar olduğunu ve bu miRNA'ların ovaryum ve testiküler gelişimde hücresel housekeeping roller oynadığını rapor etmişlerdir ¹⁹⁷. miR-378, miR-1, miR-206, miR-379, miR-127 ve miR-411 testisten çok ovaryumda down regüle edilmekte; buna karşın miR-10b, miR-26a, miR-21, miR-140 ve miR-101 testiste değil, ovaryumda upregüle edilmektedir ²¹⁰. Ayrıca, X kromozomunda bulunan ayrimsal olarak eksprese edilen miRNA'ların (X-bağlı miRNA'lar) çoğu testise kıyasla ovaryumda anlamlı derecede upregüle edilmektedir. Türlerden bağımsız olarak let-7 ailesi, miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-145 ve miR-199b ovaryumdaki en baskın miRNA popülasyonlarıdır ¹⁹⁹.

2.6.3. miRNA'lar ve Hormonlar

Kronik olarak androgenize sıçanlarda vücut ağırlığının arttığı, östrus siklusun bozulduğu, insülin duyarlılığının azaldığı ve ovaryan ağırlığının azaldığı gösterilmiştir. Bu fenotiplerin düzenleyici genlerin kodlanmayan miRNA'larının bozulmasıyla ilişkili olduğu da bulunmuştur ^{211,212}. Bazı miRNA'ların FSH'nin negatif kontrolünde foliküler gelişim sırasında eksprese olduğu ²¹³ ve FSH ile indüklenen sıçan granüloza hücrelerinin P₄ üretiminde görev alabileceği kaydedilmiştir ²¹⁴. Bazı aşamalı yapay nöral ağ analizleri, meme kanserinde tahmini miRNA işaretlerinin östrojen reseptör durumuyla ilişkili olduğunu göstermiştir ²¹⁵. Bu çalışmaların bulguları eksojen DHT tedavisiyle değiştirilen miRNA ekspresyonunun, foliküler hücrelerde östrojen reseptörlerini aktiveştirerek dolaylı steriodal etki göstermesi veya androjen metabolizmasının düzenlenmesi için androjen reseptör yolağında doğrudan etki göstermesi olasılığını arttırmıştır ²¹⁶.

2.6.4. miRNAlar ve PKOS

İnsan PKOS ovaryumlarında normale kıyasla ayrimsal gen ekspresyonu ortaya konmuştur ²¹⁷. PKOS'un genomik çalışmaları, hücre bölünmesi, apoptoz ve gen ekspresyonu ve metabolizma düzenlenmesi de dahil olmak üzere birçok fonksiyonel kategoriye tekabül eden genlerin değişmiş türlerini göstermiştir. Retinoik asit biyosentezi ve LH'a cevap veren genler de dahil olmak üzere steroidogenezde görev alan genler, genellikle PKOS'lu bireylerin teka hücrelerinde upregüle edilirken ²¹⁸, Wnt

sinyalleşmesi ve ovaryum folikülogeneziyle ilişkili genler downregüle edilmektedir ²¹⁹⁻²²⁰. Ovaryan apoptotik genler PKOS'da değişikliğe uğramasına rağmen bu değişimlerin net etkisi belirsizdir ²¹⁹. Posttranskripsiyonel gen düzenlenmesinde yeni gelişmeler, farklı memeli türlerinde miRNA'ların yüzlercesinin keşfini sağlamıştır. miRNA'nın farklı ekspresyon modelleri ve ovaryumda potansiyel hedeflerinin fazla miktarları, ovaryan fonksiyonun düzenlenmesinde önemlerini arz etmektedir. Günümüzde çok sayıda miRNA ovaryumda tespit edilmiş ²²¹⁻²²² ve foliküler gelişme sırasında gonadotropinler tarafından düzenlendiği bulunmuştur ^{223,224}. Güncel çalışmalar miRNA'ların insan granüloza hücrelerinde steriodogenez, hücre proliferasyonu ve apoptozunun düzenlenmesinde görev aldığını göstermiştir ^{225,226}.

Yardımcı üreme tedavisi gören kadınların granüloza/kümülüs hücrelerinde miR-23b, miR-542-3p, miR-211 ve miR-17-5p ayrımsal ekspresyonları, miRNA ekspresyonunun dişi infertilitesinde altta yatan etiyoloji olabileceğini akla getirmektedir ^{206,207}. Dahası miRNA'lar obezite, insülin direnci dahil olmak üzere metabolik sendromlar ²⁰⁸ ve sıklıkla PKOS ile ilişkili koşullarda rol oynadığını göstermiştir. miR-222 in situ lokalizasyonla teka hücrelerinde eksprese olduğu kanıtlanmış ve ekspresyonun androjenler tarafından baskılanarak ve p27/kip1 hedeflenerek hücre proliferasyonunu düzenlediği kaydedilmiştir. Ek olarak miR-222 fazla ekspresyonu, azalan ER α proteini ve ER α hedef genlerinin sinyalleşmesine ek olarak ekspresyonuyla da ilişkilendirilmiştir. miR-132 ve miR-320 polikistik ovaryuma sahip hastaların foliküler sıvılarında, normal kontrole kıyasla anlamlı derecede azalmış düzeylerde eksprese olmaktadır. Ek olarak PKOS hastalarında miR-132, miR-320, miR-520c-3p, miR-24 ve miR-222 östrojen konsantrasyonlarını düzenler ve miR-24, miR-193b, ve miR-483-5p PKOS hastalarında P₄ konsantrasyonunu düzenler. miR-93 PKOS'da fazla eksprese olur ve GLUT4 ve artan IR ile ilişkilidir ²²⁸. miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103 ve miRNA-155 metabolik süreçlerde önemli roller oynar ve PKOS hastalarında obezite ve dolaşımdaki androjen konsantrasyonlarından etkilenir ²³.

2.6.5. PKOS'ta Serum/Plazma miRNA Biyoişaretleyicileri

Serumda fazlaca bulunan miRNA'lar stabil ve nükleaz aktivitesine dirençli oldukları ve tespit edilmesi kolay olduğu için, PKOS'ta invaziv olmayan bir biyoişaretleyici olarak görev alabilir ²²⁹. miRNA'ların özellikle seruma nasıl geçtiği ve serumda bulunmalarının hastalığa özel olup olmadığı bilinmemektedir ve serumda

hücrel orijinlerini belirlemek zor olabilir. Günümüzde PKOS serumunda diğer çeşitli biyomarkerlar tanısal amaçlı kullanılmaktadır. Bunlar arasında LH, androjen konsantrasyonları ve FSH yer almaktadır ²³⁰. 12 sağlıklı kadın, 12 sağlıklı erkek ve 12 PKOS hastası ile yapılan bir çalışmada, miR-21, miR-27b, miR-103 ve miR-155 ekspresyonları PKOS'lu kadınlarda artış göstermiştir. Ayrıca serumdaki serbest testosteron düzeyleri ile miR-21, miR-27b ve miR-155 arasında pozitif bir ilişki olduğunu, bu miRNA'ların hormon metabolizmasına ve reproduktif hücrel süreçlere dahil olabileceğini göstermiştir ²³¹. miR-222, miR-16, miR-19a, miR-106b, miR-30c, miR-146a, miR-24, miR-186 ekspresyon düzeyleri PKOS hastalarının serumlarında artış gösterirken miR-320 ekspresyonunda düşüş görülmüştür ²¹⁰. Long ve ark.nın yaptığı ilginç bir gözlemden PKOS'lu kadınların ovaryan dokularında bulunan ve ayrımsal olarak ekspresyon edilen miRNA'ların çoğunun, kana salınmadığı ve dolayısıyla PKOS serumunda değişmediği görülmüştür ²³². Sonuç olarak farklı miRNA'ların dolaşımında bulunması tanısal olarak kullanışlı bir araç olabileceğini ve belki de PKOS tedavisi için kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. PKOS'lu hastaların miRNA profillerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması miRNA'ların patogeneze katkıda bulunabileceğini göstermektedir. miR-21, miR-27b ve miR-103 yukarıda da bahsedildiği gibi PKOS ile ve metabolik hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında obezite, T2D, düşük dereceli inflamasyon ve adipogenez bozukluğu da yer almaktadır.

Sonuç olarak PKOS patofizyolojisi jinekoloji, endokrinoloji ve diyabetoloji gibi alanları ilgilendirir. Kullanılan PKOS kriterlerine göre farklı fenotipler ortaya çıkmakta ve miRNA'ların çeşitli ağları kompleksiteye katkıda bulunmaktadır. Ancak değişen miRNA ekspresyon profilinin PKOS'un sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu henüz ayırt edilemese de, miRNAlar PKOS'lu hastaları normal menstruasyon geçiren kadınlardan ayırt etmek veya bu heterojen sendromun fenotiplerini belirlemek için kullanılabilir.

2.6.6. miRNA'lar ve Apoptoz

miRNAlar kanserli hücrelerde ve tümörlerde en çok ve güçlü şekilde upregüle edildiği için anti-apoptotik faktör olarak çokça araştırılmaktadır ²³³. miR-21'in gliyoblastomada anti-apoptotik faktör olduğu ve kemorezistansla çoklu rollere sahip olduğu gösterilmiştir ²³⁴. Meng ve ark. miRNA'ların insan kolanjiyokarsinoma hücrelerinde apoptozda ve antikanser ilaç direncinde görev aldığını kaydetmiştir ²³⁵.

Spesifik bir prekürsör ile transfekte edildikten sonra miR-21 ekspresyonunun artması, kontrol hücrelerinde ve gemsitabin ile tedavi edilen hücrelerde apoptotik indeksi anlamlı derecede düşürmüştür. Özellikle miR-21 ve anti-miR-21'in in vitroda PTEN-3'UTR içeren bir lusiferaz yapısını ve PTEN ekspresyon düzeylerini değiştirdiği ve PTEN'in miR-21 düzeyleriyle ters ilişkiye sahip olduğu gösterilmiştir²³⁵⁻²³⁷. miR-21'in fazla ekspresyonu, PTEN downregülasyonuna ve PI3-kinaz-Akt yolağı üzerinden daha aktif bir sinyalleşmeye yol açabileceği hipoteziyle uyumlu şekilde, apoptoza daha az yatkın kanser hücrelerinin oluşturulması ve miR-21 ekspresyonunun artması, PI3K/Akt/mTOR yolağının aktivasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca bu yolağı hedefleyen ilaçlar gemsitabin ile kombine edildiğinde pAkt düzeylerini azaltarak apoptozu güçlendirir²³⁸. Bu bulgular PI3K inhibitörlerinin gemsitabin ile tedavi gören hücrelere eklenmesinin, pAkt'i azalttığını ve apoptozu arttırdığını rapor eden önceki çalışmalarla uyumludur^{235,238,239}. Prostat kanser hücrelerinde miR-21 *knockdown* proliferatif ve invaziv potansiyeli ve kemo- ve radyosensitivite profillerini etkilemede veya PTEN ve tümör supresör PDCD4 ekspresyonunu değiştirmede yetersiz kalmıştır²⁴⁰.

PTEN, PI3K/Akt yolağının aktivasyonunu inhibe eden diğer önemli bir tümör supresör genidir. Dolayısıyla hücre apoptozunu kontrol ederek tümör hücrelerinin dirençli profillerine katkıda bulunabilir. Yukarıda bahsedildiği üzere çeşitli çalışmalar miR-21'in PTEN ekspresyonunu ve *downstream* kinazı olan Akt fosforilasyonunu düzenlediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir²³⁵⁻²³⁷. miR-21'in azalması in vitro ve in vivo gemsitabin ile indüklenen apoptozun güçlenmesi ile ve antitümör aktivitesinin güçlenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak PTEN üzerinden miR-21 düzenlenmesi birçok tümörde yaygın olmaktan çok hücreye spesifik özellik göstermektedir ve miR-21'in PTEN'i doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyebildiği hala belirsizdir²⁴¹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 27/05/2016 tarihli ve 2016/55 sayılı etik kurul onayı alınmış ve tüm çalışmalar etik kurul ilkelerine bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. DENEY PROSEDÜRÜ

Çalışmamızda 42 adet, 25 günlük, dişi, Balb/c fareler kullanıldı. Çalışmada kullanılacak deney hayvanları, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Abd'ndan temin edildi ve hayvanların bakımı İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Tüm hayvanlar, içerisinde %21 protein bulunan sıkıştırılmış pellet yemle ile serbest olarak beslendi ve içme suyu olarak, hergün 1 kez değiştirilmiş, taze şebeke suyu kullanıldı. 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık uygulanan sessiz bir odada, uygun kafeslerde barınma sağlandı. Kafesler muntazam olarak temizlendi. Deneyin ilk ve son günü tüm gruplardaki hayvanların ağırlıkları ölçüldü. 6 adet deney grubu oluşturuldu ve gruptaki deney hayvanları ayrı kafeslerde muhafaza edildi.

- 1. Grup (Kontrol Grubu) (n=6) :** 25 günlük farelere 20 gün boyunca hiçbir invazif işlem uygulanmadı.
- 2. Grup (PKOS Sham Grubu) (n=6) :** 25 günlük farelere 20 gün boyunca subkutan olarak 0,01 ml %95 etanol + 0,09 ml SY enjeksiyonu uygulandı (SY toksik olmayan doğal bir çözücüdür).
- 3. Grup (PKOS Grubu) (n=8):** 25 günlük farelere 20 gün boyunca 0,01 ml %95 etanol + 0,09 ml SY'nda çözülmüş 6mg/100g DHEA enjeksiyonu subkutan olarak uygulanarak PKOS modeli oluşturuldu.
- 4. Grup (İnhibisyon Grubu) (n=8):** 25 günlük farelere 20 gün süre ile hergün 0,1 ml, DMSO içerisinde çözülmüş 1 mg/100g KU-0063794 enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulandı ve mTOR sinyal yolağı inhibisyonu gerçekleştirildi.
- 5. Grup (PKOS +İnhibisyon Grubu) (n=8):** 25 günlük farelere 20 gün boyunca 0,01 ml %95 etanol + 0,09 ml SY'nda çözülmüş 6 mg/100g DHEA enjeksiyonu subkutan olarak ve 0,1 ml, DMSO içerisinde çözülmüş 1 mg/100g KU-0063794 enjeksiyonu

intraperitoneal olarak uygulandı ve böylece PKOS modeli oluşturulurken aynı zamanda mTOR sinyal yolağı inhibisyonu da gerçekleştirildi.

6. Grup (İnhibisyon Sham Grubu) (n=6): 25 günlük farelere 20 gün süre ile hergün 0,1 ml DMSO enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulandı.

20 günlük deneyin sonunda alınan vajinal smear örneklerine göre diöstrus fazında olan hayvanlar tartıldı. Ketamin (100 mg/kg; ip)-ksilazin (10 mg/kg; ip) anestezisi altında, intrakardiyak ponksiyon yöntemi ile kan örnekleri toplanan deney hayvanları sakrifiye edilerek sağ ve sol ovaryumları çıkartıldı.

3.1.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Ajanlar:

3.1.1.1. Dehidroepiandrosteron (DHEA) (Sigma Aldrich-D4000)

Adrenal bezin zona retikularis tabakasından salgılanan adrenal androjenlerden biridir⁵². Salgılanması, adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortikal androjen-uyarıcı hormon tarafından kontrol edilir. Pregnenolon, 17 α -hidroksilasyonu ile 17 α -hidroksipregnenolona, 17 α -hidroksipregnenolon da 19 karbonlu (C-19) DHEA'ya dönüşür. DHEA'da daha sonra bir adrenal sülfokinaz aracılığı ile DHEA sülfata dönüştürülür. Adrenal androjenler olan DHEA, DHEA sülfat ve androstenedion, minimal androjenik aktiviteye sahiptir. Bu nedenle etkilerini daha androjenik aktiviteye sahip testosteron ve dihidrotestosterona dönüşerek gösterirler.

3.1.1.2. Susam Yağı (Sigma Aldrich-S3547)

SY, toksik olmayan, doğal, bitkisel bir çözücüdür²⁴².

3.1.1.3. KU-0063794 (Selleckchem-S1226)

mTOR inhibitörü PP242 ile karşılaştırıldığında KU-0063794, PI3K'lar veya diğer 76 kinaza karşı mTOR'un inaktif olması için daha yüksek bir özgüllük sergiler. HEK-293 hücrelerinde, 30 nM KU-0063794, hidrofobik motifin (Thr³⁸⁹) fosforilasyonunu ve daha sonra T-loop kalıntısının (Thr²²⁹) fosforilasyonunu bloke ederek S6K1 aktivitesini hızla yok etmek için yeterlidir. 100-300 nM KU-0063794, S6K1 ve S6 proteininin amino-asit kaynaklı fosforilasyonunu tamamen inhibe eder. S6K1'e benzer şekilde, KU-0063794, mTORC1'de Ser²⁴⁸ ve mTORC2'de Ser²⁴⁸¹ fosforilasyonunu doz bağımlı ve zamana bağlı bir şekilde inhibe eder. Serum veya IGF1 uyarısı varlığında KU-0063794, Akt (Ser⁴⁷³ ve Thr³⁰⁸) aktivitesi ve

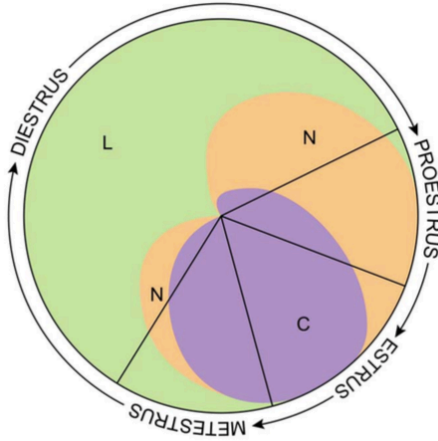
fosforilasyonunun yanı sıra, Akt substratları PRAS40 (Thr²⁴⁶), GSK3 α /GSK3 β (Ser²¹/Ser⁹) ve Foxo-1/3a (Thr²⁴/Thr³²)'nin fosforilasyonunun doz bağımlı inhibisyonunu uyandır. Rapamisin aksine KU-0063794, SGK1 aktivitesini ve Ser⁴²² fosforilasyonunu inhibe ederken forbol esterinin indüklediği ERK veya RSK fosforilasyonunu ve RSK aktivasyonunu inhibe etmez. Rapamisin ile karşılaştırıldığında, KU-0063794, Thr³⁷, Thr⁴⁶ ve Ser⁶⁵'de 4E-BP1'in tamamen defosforilasyonunu indüklemek için daha güçlü bir etki sergiler. KU-0063794, embriyonik fare fibroblastlarında, rapamisinden daha etkili bir şekilde, hücre büyümesini engeller ve hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olur ²⁴³. KU0063794 ayrıca, prelinik renal hücreli karsinom modelinde tümör büyümesini ve mTOR sinyalini inhibe etmiştir ²⁴⁴.

3.1.1.4. Dimetilsülfoksit (DMSO) (Bio Shop-DMS555)

DMSO, (CH₃)₂S formülüne sahip bir organosülfür bileşiğidir. Renksiz, kokusuz, berrak olan bu sıvı, hem polar, hem de apolar bileşikleri çözen, suyun yanısıra çok çeşitli organik çözücüler içinde karışabilen önemli bir polar aprotik çözücüdür. Nispeten yüksek bir erime noktasına sahiptir. Hücresel zarlara kolaylıkla nüfus eder ve bu özelliği sayesinde diğer maddelerin de difüzyonunu arttırabilir.

3.2. VAJİNAL SMEAR ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Farelerde, östrus döngüsü 4 aşamaya (proöstrus, östrus, metöstrus, ve diöstrus) ayrılır ve gebelik, yalancı gebelik veya anöstrus tarafından kesintiye uğramadığı sürece her 4 ila 5 günde bir tekrarlar ¹⁰⁴. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat ve diöstrus fazı 52-60 saat sürer ¹⁰⁴⁻¹⁰⁵. Fare östrus döngüsünde hormonal değişikliklere bağlı olarak meydana gelen değişiklikler, vajinal sitoloji, elektriksel direncin ölçülmesi, biyokimyasal idrar analizleri ve dış genital organların görsel olarak gözlemlenmesi gibi değişik metodlar ile belirlenebilir. Vajinal hücrelerin morfolojik olarak değerlendirilmesi, tüm evreleri tanımlamak için en doğru yöntem olarak kabul edilir. Östrus döngüsünün hangi evrede olduğunun tanımlanmasında, üç hücre tipinin oranı belirleyici olarak kullanılır: 1. Polimorfonükleer lökositler; 2. Kornifiye epitel hücreleri; 3. Nükleuslu epitel hücreleri ^{104,245-247}. (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Östrus periyodlarını tanımlama aracı. Bu araç, östrus döngüsünün 4 periyodu boyunca, değişiklik gösteren hücre türlerinin ve oranlarının şematik bir temsildir. Daire işaretindeki çizgiler, östrus fazının değiştiği alanları işaret etmektedir. Her bir kadranın (2 çizgi arası) boyutu, kabaca o periyodun uzunluğunu temsil eder. Döngünün tamamı 4-5 gün sürer. Bu grafiği kullanmak için, vajinal smear hücreleri incelenir ve her hücre tipinin göreceli sayısı belirlenir. Sonra, grafiğin üzerine hayali bir ok yerleştirilir. Yerleştirilen bu ok, smeared görülen hücre türleri ve oranları okun altında görününceye kadar saat yönünde hareket ettirilir. Okun hareketi sabitlenince, bulunduğu kadrandaki faz, östrus fazını işaret eder. L: Lökosit; N: Nükleuslu epitel hücresi; C: Kornifiye epitel hücresi ¹⁰⁴.

Proöstrus

- Pembe sitoplazmalı ve koyu mavi çekirdekli, aynı büyüklükte epitel hücrelerinin varlığı ile karakterizedir.
- Az sayıda keratinosit görülür ^{104,245,246}.
- Vajina açık hale gelir ve pembe renktedir (Şekil 3-2).
- Hipofizyal FSH ve LH seviyesi, proöstrus fazında artış gösterir ve östrus fazına doğru maksimum seviyelerine ulaşır.
- E₂ seviyesi de bu fazda yükselmeye başlayarak östrus fazında maksimum seviyesine ulaşır.
- P₄ hormon düzeyi, proöstrus fazında en düşük seviyesindedir.

Östrus

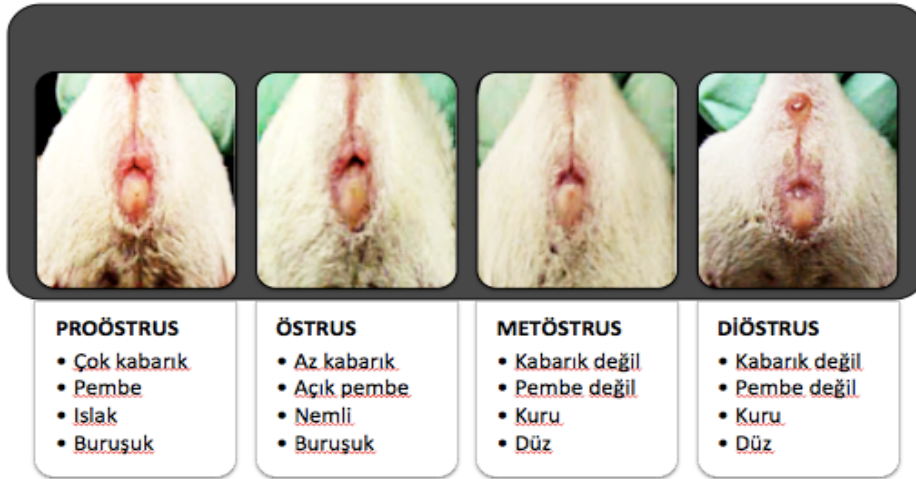
- Nükleussuz kornifiye skuamöz epitel hücreleri ile karakterizedir ve bu hücrelerin sayısı proöstrus fazındakinden 2 kat fazladır ^{104,245-247}.
- Hücre farklılaşması sırasında sentezlenen keratin nedeniyle büyük kornifiye hücreler PAP boyası ile turuncu renkte görünür.
- Östrus periyodu, pik yapan E₂'nin etkisi altındadır.
- Ovulasyon, proöstrus başından östrus sonuna kadar gerçekleşir. Oositler atılınca geride bir KL kalır.

Metöstrus

- Değişik oranlarda lenfositler, yaşlı kornifiye hücreler ve nükleuslu epitel hücreleri ile karakterizedir ^{104,245-247}.
- Metöstrustaki çekirdekli hücreler, koyu mavi boyanan çekirdeklerini çevreleyen soluk mavi bir hücre zarı ile sınırlanırlar.
- Metöstrusta ölü hücrelerin kalıntılarından dolayı vajinal dokular soluk ve kurudur (Şekil 3-2).
- Vajinal salgılar, smearin beyaz ve opak görünmesini sağlar.
- Polimorfonükleer lökositler, E₂ salgısındaki azalma nedeniyle vajinal kanala geçer ve yoğun olarak diğer hücrelerin etrafında toplanırlar. Lenfositlerin bu kümelenmesi, kemokinlerden kaynaklanır. Kemokinler, luteal regresyon sonucu eksprese edilirler ^{104,245-247}.
- Lökositlerin bolluğu, smeare genel bir koyu mavi renk verir.

Diöstrus

- Çoğunlukla lökositlerden oluşur.
- Az sayıda nükleuslu epitel hücreleri görülür ^{104,245-247}.
- Diöstrus KL büyümesi ile ilişkilidir.
- Diöstrus östrojenik uyarıdan yoksundur, yüksek P₄ etkisi altındadır.
- Üreme dokularında dejeneratif değişiklikler görülür.
- Vajina mavimsi-mor renktedir (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Balb/c farelerin östrus fazlarına göre dış genital organlarının görünümü ¹⁰⁴.

Deneyin son 10 günü, bütün gruptaki deney hayvanlarının herbirinden, her sabah saat 10:00'da, siklus tayini için vajinal smear örnekleri alındı. Bu işlem için hayvanlar sırt bölgelerinden tutulup karınları yukarı bakacak şekilde konumlandırıldı ve kuyrukları sabitlendi. İçinde yaklaşık 50 µl fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl çözeltisi) bulunan ince uçlu Pastör pipeti, deney hayvanının vajinasına yerleştirilerek birkaç kez pipetaj yapıldı. İşlem sonunda vajinadan alınan örnekler, temiz bir lam üzerine yayılarak havada kurutulduktan sonra, %96 etanol içerisinde fikse edildi. Daha sonra metilen mavisi ile boyanan vajinal smear örnekleri, ışık mikroskopunda incelendi ve hayvanların östrus sikluslarının evreleri belirlendi ^{104,245-247}. Elde edilecek sonuçların, farklı östrus fazlarında göstereceği değişikliklerin önüne geçmek adına, bütün gruptaki hayvanlar, diöstrus fazında sakrifiye edildi.

3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Hayvanlardan deney sonunda intrakardiyak ponksiyon yöntemi ile toplanan kan örnekleri, serum tüplerine alınarak 1500 rpm'de 15 dk. santrifüj (Sigma 2-16 K) edildi ve serumları ayrıldı. Toplanan serum örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi ve bu örneklerden daha sonra ELISA yöntemi ile E₂ ve P₄ hormon tayinleri yapıldı.

3.3.1. Serum E₂ Seviyesi Tayini:

Serumdaki E₂ seviyesini belirlemek için Fine Test'in EU0390 katalog numaralı ELISA kiti kullanılmıştır.

ELISA Prosedürü:

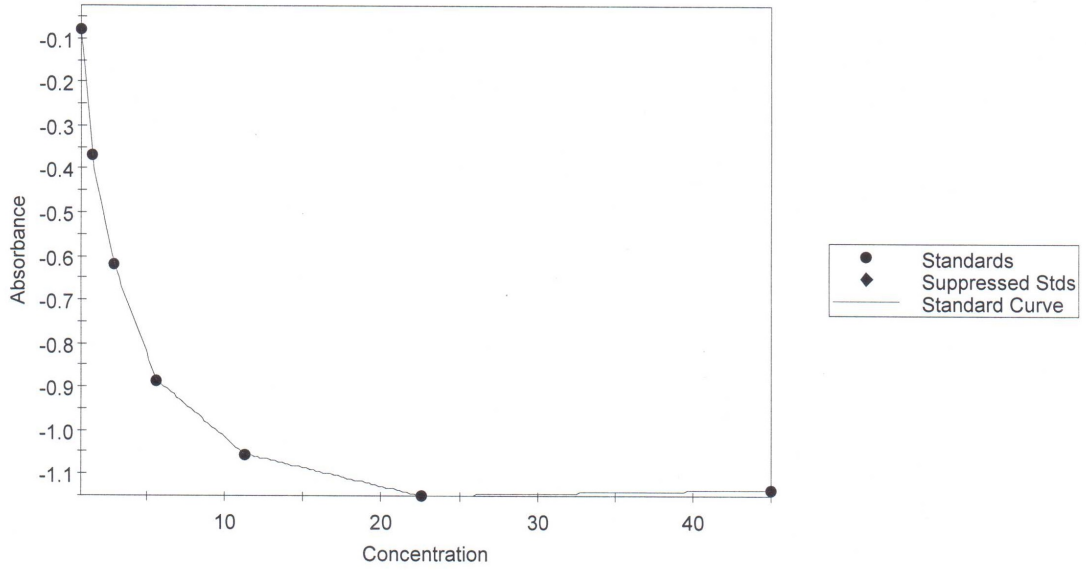
Reaktiflerin hazırlanması

- **E₂ standardı:** 45 ng/ml E₂ standart solüsyonu oda ısısına getirildi. 1'den 6'ya kadar numaralandırılmış altı ependorf tüp hazırlandı. Her tübe 0,3 ml standart dilüent konuldu. 1. tüpten 0,3 ml dilüent alındı ve yerine 0,3 ml 45 ng/ml'lik E₂ standart solüsyonundan eklendi. Tüp vortekslendi ve 1. tüpten 0,3 ml alınarak 2. tübe eklendi ve vortekslendi. 2. tüpten 0,3 ml alınarak 3. tübe eklendi ve vortekslendi. Bu işlem 6. tübe gelene kadar tekrarlandı.

Not: 1.tüpten 6. tübe kadar E₂ konsantrasyonları sırasıyla 22,5; 11,25; 5,625; 2,813; 1,406 ve 0,703 ng/ml olmalıydı ve bizim konsantrasyonlarımız sırasıyla 22,5; 11,544; 7,395; 4,203; 1,672 ve 0,792 ng/ml olarak bulundu.

- **Yıkama solüsyonu:** Deneye başlamadan önce 30 ml konsantre yıkama solüsyonu, 750 ml distile su ile sulandırıldı ve +4 °C'de muhafaza edildi. Kullanmadan önce oda ısısına getirildi.
- **Biotinli Primer Antikor:** İhtiyacımız olan total antikor miktarı hesaplandı (kuyucuk başına 0,05 ml) ve biotinli antikor, antikor diluent solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırıldı.
- **HRP-Streptavidin Konjugatı (SABC):** Konjugat oda ısısına getirildi. İhtiyacımız olan total SABC miktarı hesaplandı (kuyucuk başına 0,1 ml) ve SABC, SABC diluent solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırıldı.
- **Deney Prosedürü**
 1. Deney düzeni tablosu hazırlandı ve deney kağıdına işaretlendi
 2. NSB ve Bo kuyucuklarına 50 µl standart dilüent koyuldu (deney tamponu veya doku kültürü medyumu) .
 3. Standart 1-7 işaretlenen kuyucuklara koyuldu.
 4. Her bir serum örneğinden 50 µl işaretlenen kuyucuklara koyuldu.
 5. Bütün kuyucuklara 50 µl antikor çalışma solüsyonu koyuldu.
 6. Kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplandı ve 45 dk. 37 °C'de inkübe edildi.

7. Sürenin sonunda her kuyucuk aspire edilerek yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
8. Bütün kuyucuklara 100 µl SABC koyuldu. Kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplandı ve 30 dk. 37 °C'de inkübe edildi.
9. Sürenin sonunda her kuyucuk aspire edilerek yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
10. Her kuyucuğa 90 µl TMB substrat eklendi ve kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplanarak ve 10-20 dk. 37 °C'de, karanlıkta inkübe edildi.
11. Deney süresi sonunda her kuyucuğa 50 µl reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi ve kuyucuklar boşaltıldı.
12. Boş kuyucuklar 450 nm optik dansitede okutuldu



Şekil 3-3: ELISA testinde E₂ bağlanmasını gösteren standart eğri grafiği.

3.3.2. Serum P₄ Seviyesi Tayini:

Serumdaki P₄ seviyesini belirlemek için Fine Test'in EM1281 katalog numaralı ELISA kiti kullanılmıştır.

ELISA Prosedürü:

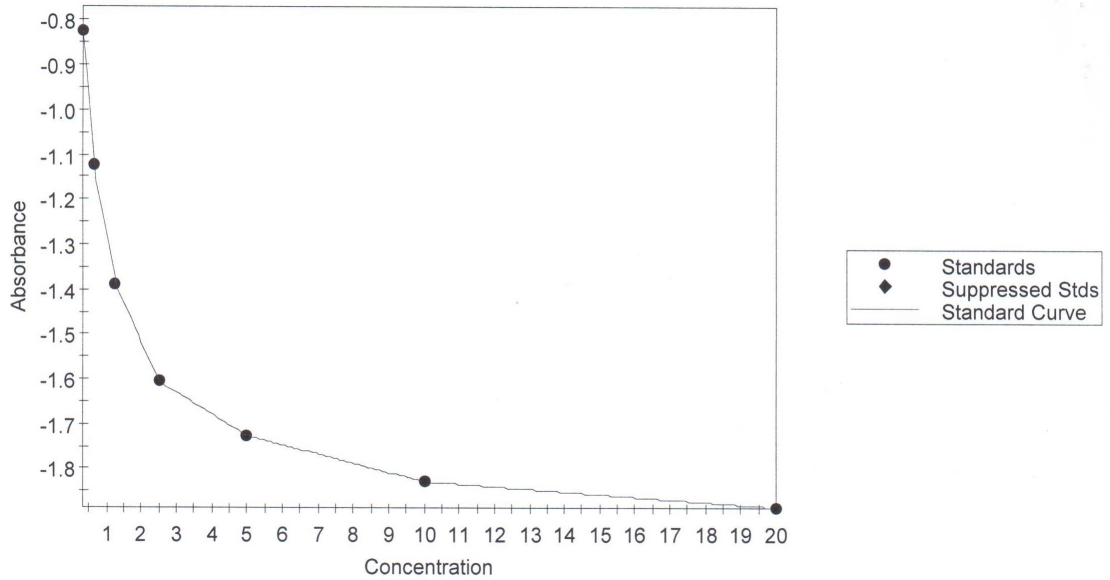
Reaktiflerin hazırlanması

- **P standardı:** Standart dilüentten 1 ml alınarak standart tüpe konuldu ve 10 dk oda ısısına getirildi. 1'den 6'ya kadar numaralandırılmış altı ependorf tüp hazırlandı. Her tübe 0,3 ml standart dilüent konuldu. 1. tüpten 0,3 ml dilüent alındı ve yerine 0,3 ml 20 ng/ml'lik P standart solüsyonundan eklendi. Tüp vortekslendi ve 1. tüpten 0,3 ml alınarak 2. tübe eklendi ve vortekslendi. 2. tüpten 0,3 ml alınarak 3. tübe eklendi ve vortekslendi. Bu işlem 6. tübe gelene kadar tekrarlandı.

Not: 1.tüpten 6. tübe kadar P konsantrasyonları sırasıyla 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 ve 0,313 ng/ml olmalıydı ve bizim konsantrasyonlarımız sırasıyla 10,524; 5,262; 2,533; 1,265; 0,646 ve 0,386 ng/ml olarak bulundu.

- **Yıkama solüsyonu:** Deneye başlamadan önce 30 ml konsantre yıkama solüsyonu, 750 ml distile su ile sulandırıldı ve +4 °C'de muhafaza edildi. Kullanmadan önce oda ısısına getirildi.
- **Biotinli Primer Antikor:** İhtiyacımız olan total antikor miktarı hesaplandı (kuyucuk başına 0,05 ml) ve biotinli antikor, antikor diluent solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırıldı.
- **HRP-Streptavidin Konjugatı (SABC):** Konjugat oda ısısına getirildi. İhtiyacımız olan total SABC miktarı hesaplandı (kuyucuk başına 0,1 ml) ve SABC, SABC diluent solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırıldı.
- **Deney Prosedürü**
 1. Deney düzeni tablosu hazırlandı ve deney kağıdına işaretlendi
 2. NSB ve Bo kuyucuklarına 50 µl standart dilüent koyuldu (deney tamponu veya doku kültürü medyumunu) .
 3. Standart 1-7 işaretlenen kuyucuklara koyuldu.
 4. Her bir serum örneğinden 50 µl işaretlenen kuyucuklara koyuldu.

5. Bütün kuyucuklara 50 µl antikor çalışma solüsyonu koyuldu.
6. Kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplandı ve 45 dk. 37 °C'de inkübe edildi.
7. Sürenin sonunda her kuyucuk aspire edilerek yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
8. Bütün kuyucuklara 100 µl SABC koyuldu. Kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplandı ve 30 dk. 37 °C'de inkübe edildi.
9. Sürenin sonunda her kuyucuk aspire edilerek yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
10. Her kuyucuğa 90 µl TMB substrat eklendi ve kuyucukların üzeri yapışkan koruyucu ile kaplanarak ve 10-20 dk. 37 °C'de, karanlıkta inkübe edildi.
11. Deney süresi sonunda her kuyucuğa 50 µl reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi ve kuyucuklar boşaltıldı.
12. Boş kuyucuklar 450 nm optik dansitede okutuldu.



Şekil 3-4: ELISA testinde P bağlanmasını gösteren standart eğri grafiği.

3.4. IŞIK MİKROSKOBİK YÖNTEMLER:

Hayvanların ovaryumlarından biri ışık mikroskopik incelemeler için %4'lük tamponlanmış nötral formaldehit (Atabay Kimya) ile 24 saat fikse edildikten sonra, herbirinde 24 saat bekletilmek üzere sırasıyla %70, %90, %96 ve %100'lük yükselen etil alkol serilerinden (Merck) geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulandı. Dokular şeffaflaştırma işlemi için 3x5 dk toluenden (*Riedel-de Haën*) geçirildikten sonra infiltrasyon işlemi için 56 °C'lik etüv içerisinde, yumuşak parafin (46-48 °C) ve sert parafin (56-58 °C)'de 45'er dk. bekletildi. Doku takibi tamamlanan ovaryumlar, sert parafin içerisine gömüldü ve kalıpların oda ısısında sertleşmesi beklendi. Parafin blok haline getirilen doku örneklerinden kızaklı mikrotom (Leica SM 2000) aracılığı ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve pozitif şarjlı lamalar (Thermo Scientific) üzerine yapıştırıldı. Deparafinizasyon ve hidratasyon işlemlerinden sonra örneklere, ışık mikroskopik incelemeler için H&E ve Masson'un trikrom boyası uygulandı. Ovaryumlardaki toplam folikül sayılarının hesaplanması için, her 30. kesitte bir (yaklaşık 150 µm) folikül sayımı gerçekleştirildi²⁴². Örnekler üzerinde Olympus DP-72 kamera ataçmanlı Olympus BX-61 ışık mikroskopu ile genel morfolojik inceleme yapıldı ve 150 µm'de bir alınan kesitlerin tamamı değerlendirilerek toplam folikül sayıları hesaplandı. Ovaryumdaki foliküllerde ayrıca primordial foliküller, primer foliküller, sekonder foliküller, Graaf foliküller, atretik foliküller ve kistik foliküller ile KL yapıları morfometrik olarak değerlendirildi.

3.4.1. H&E Boyama Prosedürü:

1- Deparafinizasyon (Ksilol)	2 saat
2- Hidratasyon (İnen etanol serisi- %100, %96, %90, %70 etanol)	5'er dk
3- Distile su	Çalkalama
4- Hematoksilen	15 dk
5- Akarsu	Yıkama
6- Farklılaştırma (%1'lik asit-alkol çözeltisi)	Çalkalama
7- Morartma (akarsu)	10 dk
8- Mavileştirme (%1'lik amonyak)	1 dk
9- Akarsu	Yıkama

10-Eozin	1-3 dk
11- Akarsu	Yıkama
12- Dehidratasyon (Yükselen etanol serisi-%70, %90, %96, %100, etanol)	5'er dk
13-Şeffaflaştırma (Ksilol)	1 saat
14- Kapama (Entellan)	

%1'lik asit-alkolün hazırlanışı:

% 70'lik etil alkol	99 cc
Hidroklorik asit (HCl)	1 cc

%1'lik amonyakın hazırlanışı:

Distile su	99 cc
Amonyak	1 cc

3.4.2. Masson'un Trikrom Boyası Boyama Prosedürü:

1- Deparafinizasyon (Ksilol)	2 saat
2- Hidratasyon (İnen etanol serisi- %100, %96, %90, %70 etanol)	5'er dk
3- Distile su	Çalkalama
4- Weigert'in demirli hematoksileni	2 dk
5- Morartma (Akarsu)	10 dk
6- Fuksinli Ponceau	15 sn
7- Akarsu	Yıkama
8- %1'lik asetik asit	1 dk
9- Farklılaştırma (%5'lik Fosfowolframik asit)	15 dk
10- %1'lik asetik asit	1 dk
11- Işık yeşili	1-3 dk

12- Akarsu	Yıkama
13- %1'lik asetik asit	1 dk
14- Dehidratasyon (Yükselen etanol serisi-%70, %90, %96, %100, etanol)	5'er dk
15-Şeffaflaştırma (Ksilol)	1 saat
16- Kapama (Entellan)	

Weigert'in Demirli Hematoksileninin hazırlanması

Çözelti A:

Hematoksilen	1 g
%96 alkol	100 cc

Çözelti B:

% 30' luk Per chlorür de ferroficinil	4cc
HCl	1 cc
Distile su	95 cc

A ve B solüsyonlarından 1-1 oranında karıştırılır ve taze olarak kullanılır.

Fuksinli Ponceau Boyasının Hazırlanması

%1 Ponceau xylidine	198 cc
Asetik asit	2 cc
%1 Asit fuksin	99 cc
Asetik asit	1 cc

Fosfowolframik Asit Solüsyonunun Hazırlanması

Fosfowolframik asit	5 g
Distile su	100 cc

Işık Yeşili Boyasının Hazırlanması

Işık yeşili	0,2 g
Asetik asit	0,2 cc
Distile su	100 cc

3.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER:

Doku örneklerinde, hücre ve doku antijenlerini göstermek amacı ile işaretlenmiş monoklonal ve poliklonal antikolar kullanarak Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama işlemi uygulandı.

İmmünohistokimyasal incelemeler için parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere mTOR, P-mTOR (Serin-2448), P-mTOR (Serin-2481), PCNA ve Cas-3 primer antikoları uygulandı. Elde edilen H-SCORE verileri, One-Way ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.5.1. İmmünohistokimya Prosedürü

1. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 saat toluende bekletildi.
2. Dokular hidrasyon amacıyla sırasıyla %100-%96-%90-%70'lik inen alkol serilerinden geçirildikten sonra 3x5 dk fosfat tamponu ile yıkandı.
3. Antijenik epitoplara açığa çıkarılması amacıyla mikrodalga fırının orta ayarında 3x5 dk. sitrat tamponu ile antijen geri-kazandırma işlemi yapıldı.
4. Kesitler oda ısısına soğutuldu.
5. Kesitler fosfat tamponu ile 3x5 dk yıkandı ve dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini durdurmak için %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisinde 10 dk bekletildi.
6. Fosfat tamponu ile 3x5 dk yıkanan kesitler, boyama haznesine dizildikten sonra, 5 dk. UV blokta (İnvitrogen) bekletildi (özgün olmayan bağlanmayı engellemek ve istenmeyen zemin boyanmasını önlemek için).
7. UV bloktan sonra yıkama yapılmadan uygun dilüsyon oranlarında [mTOR-1:100, P-mTOR (Serin-2448)-1:100, P-mTOR (Serin-2481)- 1:100, PCNA-1:100 ve Cas-3-1:100) sulandırılan primer antikor damlatıldı ve kesitler +4 °C'de 1 gece bekletildi.
8. İnkübasyon süresi tamamlanan kesitler 4 kere fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra fazla sıvı kurulandı ve sekonder antikor (İnvitrogen) damlatılarak 30 dk. beklendi.

9. Kesitler 4 kere fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra fazla sıvı kurulandı ve streptavidin-peroksidazda (Invitrogen) 30 dk. bekletildi.
10. Kesitler 4 kere fosfat tambonu ile yıkandıktan sonra fazla sıvı kurulandı ve 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (ScyTek: ACH500) damlatılarak mikroskop altında renkli reaksiyon oluşana kadar takip edildi.
11. Reaksiyon veren kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu.
12. Nükleus boyası olarak Mayer Hematoksilen kullanıldı (30 sn).
13. Fosfat tamponu ile morartma işlemi yapılan kesitler distile sudan geçirildikten sonra dehidratasyon işlemi için 2x5 dk %96 alkol, 2x5 dk %100 alkol, 30 dk toluenden geçirilerek entellan ile kapatıldı

3.5.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme:

Kesitlere, her primer antikör için, prosedürde belirtildiği gibi immünohistokimyasal boyama uygulandı. Olympus BX 61 marka ışık mikroskopunda x40 büyütmede her bir doku örneğinde rastgele seçilen beş bölgede histokimyasal skorlama (H-SCORE) yöntemi ile yarı-kantitatif değerlendirme yapıldı. Örneklere immün reaktivitelerine göre iki farklı kör kişi tarafından 0-300 arasında değerler verildi ve bu değerlendirmeye göre istatistiksel olarak analiz yapıldı.

3.5.3. Kullanılan Primer Antikörler:

m-TOR primer antikörü: Invitrogen'in tavşanda insan, fare ve sıçana karşı üretilmiş mTOR, monoklonal antikörü (Kat.No: 14-2190-82), 1:100 oranında antikör dilüent ile sulandırılarak belirtildiği gibi işaretleme yapıldı. Bu 289-kDa'luk serin/treonin kinaz, büyüme faktörlerine, enerjiye, besin maddelerine ve strese cevaben PI3K/Akt sinyal yolu aracılığı ile Ser2448'in fosforilasyonu ile aktive olur. mTOR, ökaryotlarda oldukça iyi korunmuştur ve hem immün sisteme ait (örn.T, B, nk, dendritik hücreler, mast hücreleri ve nötrofiller) hem de immün sisteme ait olmayan dokularda (örn. kalp) asıl olarak ifade edilir. mTOR, rapamisin ve fosforilasyon hedeflerine farklı hassasiyetlere sahip olan iki farklı komplekse sahiptir: mTORC1 ve mTORC2. Rapamisin, mTORC1 ve mTORC2'nin ayrışmasına neden olan FKBP12'ye bağlanarak mTOR aktivitesini inhibe eder. mTOR, hücre metabolizması, hayatta kalma, dendritik hücre olgunlaşması ve aktivasyonu ve protein sentezinde kritik bir rol oynamaktadır. Mtor'un deregülasyonu çeşitli kanser türleri ile ilişkilidir. Çalışmalar

ayrıca Foxp3 ekspresyonu ve düzenleyici T hücre farklılaşmasında mTOR'un rol oynadığını ileri sürmektedir.

P-mTOR (Serin-2448) (Santa Cruz. Sc-293133) ve P-mTOR (Serin-2481) (Santa Cruz. Sc-293132) primer antikor: PIK-ilişkili kinazlar Atm, DNA- PK_{CS} ve mTOR'dur. Atm geni, serebellar dejenerasyon ve gözlerin konjonktivasında dilate kan damarlarının görünümü ile karakterize, otozomal resesif bir bozukluk olan ataksi telanjiektazi (AT)'de mutasyona uğrar. AT hücreleri, iyonize radyasyona karşı aşırı duyarlıdır, DNA sentezinin inhibisyonuna aracılık etmede bozulur ve p53 indüksiyonunda gecikmeler gösterir. DNA-PK, DNA-PK_{CS} adında büyük bir altbirim ve Ku olarak bilinen iki küçük altbirimden oluşan heterotrimerik bir DNA bağlama enzimidir. DNA-PK kaybı, DSB onarımında ve V(D)J rekombinasyonunda kusura neden olur. mTOR, serin yönünde otoposforile olabilir ve rapamisin/FKBP'ye bağlanabilir. mTOR aynı zamanda S6 kinazın yukarı yönlü bir düzenleyicisidir ve p27 ve p21 ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. mTOR, translasyonel baskıcı koşullar altında Ser²⁴⁸¹'e otoposforile olur. Phosphorylation of mTOR at Ser 2448 is mediated by p70S6 kinase. mTOR'un Ser²⁴⁴⁸'e fosforilasyonu, p70S6 kinaz tarafından düzenlenir.

Caspase-3 (Cas-3) primer antikor: Millipore'un tavşanda insan, fare ve sıçana karşı üretilmiş kaspaz-3 poliklonal antikor (AB3623), 1:100 oranında antikor dilüent ile sulandırılarak belirtildiği gibi işaretleme yapıldı. Kaspaz-3 proteini bir sistein-aspartik asit proteaz ailesi üyesidir ve memeli hücrelerinde apoptozun anahtar düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır²⁴⁸. CASP3 geni tarafından kodlanır. Kaspazların birbirini ardına aktivasyonu, hücre apoptozunun meydana gelmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Hücrede inaktif proenzimler olarak yer alan kaspazlar, korunmuş aspartik kalıntılarda proteolitik süreçten geçerek büyük ve küçük alt birimleri oluştururlar ve bu birimler dimerleşerek aktif enzimi meydana getirir. Bu protein, kaspaz 6 ve 7'yi aktive ederken, kendisi de kaspaz 8, 9 ve 10 tarafından aktive edilmektedir. Cas-3 apoptotik hücrede hem ekstrinsik (ölüm reseptörleri yolu) hem de intrinsik (mitokondriyal yol) yollar tarafından aktive edilir. Kaspaz-3'ün zimojen yapıda olması gereklidir çünkü eğer regüle edilmezse kaspaz aktivitesi hücreleri rastgele öldürebilir. Etektör bir kaspaz olan zimojen kaspaz-3, apoptotik sinyalden sonra bir başlatıcı kaspaz tarafından kesilmediği sürece inaktiftir. Ekstrinsik aktivasyon apoptotik yolağın belirleyici özelliği olan ve kaspaz-3'ün dominant bir rol oynadığı

kaspaz kaskadını tetikler. İntrensik aktivasyonda mitokondrideki sitokrom c, kaspaz-9, Apaf-1 ve ATP ile birlikte prokaspaz-3 aktivasyonunda rol alır.

Proliferating Cell Nuclear Protein (PCNA) (Neo Markers-MS-106-P0):

PCNA ekspresyonu, geç G1 fazında çekirdekte başlar, DNA sentezinin başlangıcından hemen önce, S-fazı sırasında maksimum seviyeye ulaşır ve G2 ve M fazları sırasında azalır. Seviyesi doğrudan çoğalan hücre oranları ve DNA sentezi ile ilişkilidir. PCNA/siklin, hücre çoğalmasının başlatılmasında, DNA polimeraz-delta proteininin yardımcısı gibi hareket ederek başlıca rol oynayabilir.

3.6. RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction):

Hayvanların ışık mikroskopik değerlendirmeler için kullanılmayan ovaryumlarının yarısı RT-PCR analizi için kullanıldı. Dokudan total RNA izolasyonu yapıldı ve gen amplifikasyonu için mir-21 primeri kullanıldı. Kontrol olarak U6 snRNA geni kullanıldı.

3.6.1. Total RNA İzolasyonu:

1. Bütün gruptaki hayvanlardan alınan taze ovaryum dokularından AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı.
2. Öncelikle 10-20 µm kalınlığında kesilen dokuların fiziksel parçalanması için sonikasyon metodu kullanıldı.
3. Sonikatör ile fiziksel olarak parçalanan örneklerden RNA izolasyonu yapmak amacı ile kite ait protokol izlenerek, izolasyon kiti içindeki çözeltiler kullanıldı.
4. Her bir örnek üzerine; 320 µl RLT tampon çözeltisi eklendi ve ardından da vortekslenerek 1120 µl %96'lık etanol içerisinde çözüldü.
5. Elde edilen çözeltinin 700 µl'si 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy MinElute spin kolonuna aktarıldı ve 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi.
6. Toplama tüpüne akan sıvı atılıp tüp tekrar kullanılarak, çözeltinin tamamı santrifüj edilene kadar işlemler tekrarlandı.
7. Örneklerin tamamı kullanıldıktan sonra; spin kolonun üzerine 350 µl FRN tampon çözeltisi eklenerek, 8000 x g'de 15 saniye boyunca santrifüj edildi ve toplama tüpüne akan sıvı atıldı.

8. Her bir örnek için 70 µl RDD tampon çözeltisine 10 µl DNase I stok çözeltisi eklenerek, DNase I inkübasyon karışımı hazırlandı.
9. Bir RNeasy MinElute spin kolonunun üzerine 80 µl DNase I inkübasyon karışımı eklenerek, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrasında spin kolonun üzerine 500 µl FRN tampon çözeltisi eklendi ve 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi. Toplama tüpüne akan ve RNA içeren sıvı örnekler sonraki adımlarda kullanılmak üzere muhafaza edildi.
11. RNeasy MinElute spin kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Bir önceki adımda saklanan örnekler spin kolona eklendi ve 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi.
12. Toplama tüpüne akan sıvı atıldıktan sonra, kolona 500 µl RPE tampon çözeltisi eklendi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
13. 500 µl RPE tampon çözeltisi kullanılarak aynı işlem tekrarlandı. Toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
14. RNeasy MinElute spin kolonları yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Kolonların tamamen kuruyabilmesi için; kapakları açık bir şekilde 10000 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüpü, akan sıvı ile birlikte atıldı.
15. Kolonlar yeni 1.5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Her bir örneğin olduğu kolonu membranına direkt olarak 25 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
16. Son olarak bütün örnekler 10000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra, izole edilen total RNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

3.6.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Örneklerin RNA konsantrasyonları, Qubit RNA HS Assay kiti (Invitrogen, Q32852) kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlendi.

1. Qubit RNA reaktifi, Qubit RNA Tamponu içerisinde 1:200 oranında sulandırılarak Qubit Çalışma Solüsyonu hazırlandı. Her bir standart ve örnek için 200 µl Qubit Çalışma Solüsyonu hazırlandı.

2. Her bir standart ve örnek Qubit Çalışma Solüsyonu içerisinde aşağıda belirtilen şekilde sulandırılarak 0,5 ml'lik Qubit Assay tüpü (Invitrogen, Q32856) içerisine kondu.
3. Standartlar ve örnekler 2-3 saniye vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

Hacim	Standartlar	Örnekler
Qubit Çalışma Solüsyonu	190 µl	199 µl
Standartlar	10 µl	-
Örnekler	-	1 µl
Final Hacim	200 µl	200 µl

4. İnkübasyon sonrası standartlar ve örneklere ait tüpler Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) cihazına yerleştirilerek ölçüldü.
5. **Normalizasyon:** RNA örnekleri, her bir RNA örneğinden eşit miktarda (6,7 ng) olacak şekilde sulandırıldı.

3.6.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kiti (Applied Biosystems, 4366596) ve miR-21 ve U6 snRNA'ya spesifik olarak dizayn edilmiş TaqMan MicroRNA Assays primerleri kullanılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Ters transkripsiyon (RT) reaksiyon karışımı, buz üzerine yerleştirilen 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
TaqMan MicroRNA Assays primer	6,00 µl
dNTP karışımı (100 mM)	0,30 µl
MultiScribe ters transkriptaz enzimi (50 U/µl)	3,00 µl
10X ters transkripsiyon tamponu	1,50 µl
RNaz inhibitörü (20 U/µl)	0,19 µl
dH ₂ O	1,01 µl
TOPLAM	12 µl

2. Tüpün içerisine konulan karışım tüpün 6 kez baş aşağı edilmesiyle dikkatlice karıştırıldı.
3. Tüp kısaca santrifüjlenerek tüm karışımın tüpün dibine çökmesi sağlandı.
4. 12 µl RT reaksiyon karışımı, RT reaksiyonunun gerçekleştirileceği 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içerisine konuldu.
5. RT reaksiyon karışımı konan her bir mikrosantrifüj tüpüne sulandırılmış RNA örneğinden 3 µl konuldu.
6. Tüpün içerisine konulan karışım tüpün 6 kez baş aşağı edilmesiyle dikkatlice karıştırıldıktan sonra tüp kısaca santrifüjlenerek tüm karışımın tüpün dibine çökmesi sağlandı.
7. Tüpler buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
8. RT reaksiyonu aşağıdaki ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Süre	Sıcaklık
30 dakika	16°C
30 dakika	42°C
5 dakika	85°C
∞	4°C

9. Reaksiyon sonrası tüpler -20°C'de saklandı.

3.6.4. cDNA'ların sulandırılması

cDNA'lar, mRNA ekspresyon analizi öncesi 5 katı kadar sulandırıldı.

3.6.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

mRNA ekspresyon analizi TaqMan Universal Master Mix II, with UNG kiti (Applied Biosystems, 4440042) ve TaqMan MicroRNA Assays problemleri kullanılarak LightCycler 480 (Roche) cihazında gerçekleştirildi. miR-21 miRNA ekspresyonunun doğru bir şekilde belirlenebilmesi için U6 snRNA geni kullanılarak 2. normalizasyon işlemi yapıldı. qRT-PCR deneyleri, her bir cDNA örneği ikişer kez çalışılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi:

1. PCR reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
TaqMan Universal Master Mix II (2X)	5 µl
TaqMan MicroRNA Assays probe (20X)	0,5 µl
TOPLAM	5,5 µl

2. PCR reaksiyon karışımı mikropipet yardımıyla karıştırıldı.
3. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 5,5 µl PCR reaksiyon karışımından konuldu.
4. Her bir kuyudaki PCR reaksiyonu karışımı üzerine 4,5 µl sulandırılmış cDNA kalıbı eklendi.
5. 96 kuyulu plakanın üzeri kaplama yapışkanı ile kapatıldı.
6. 96 kuyulu plaka kısaca santrifüjlendikten sonra LightCycler 480 cihazına konuldu ve aşağıdaki ısı döngüleri kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi.

	UNG inkübasyonu	Polimeraz aktivasyonu	PCR (40 döngü) Denatürasyon	Bağlanma/uzama
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60
Zaman (dakika:saniye)	2:00	10:00	00:15	1:00

3.6.6. qRT-PCR Deneylerinin Analizi

Örneklerin miR-21 ekspresyon seviyesini belirlemek üzere qRT-PCR deneylerinden elde edilen Ct değerleri $\Delta CT = 2^{(referans\ Ct'si - hedef\ gen\ Ct'si)}$ formülüne göre hesaplandı. Hesaplamalar Microsoft Office Excel 2016 programında yapıldı.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER:

Çalışmadan elde edilen bütün veriler One-Way ANOVA testi ile uygun istatistiksel metodlar kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılıma uygunluk, Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında normal dağılıma sahip olan değişkenler için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için ise Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey, Dunnett ve Dunn testleri uygulandı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

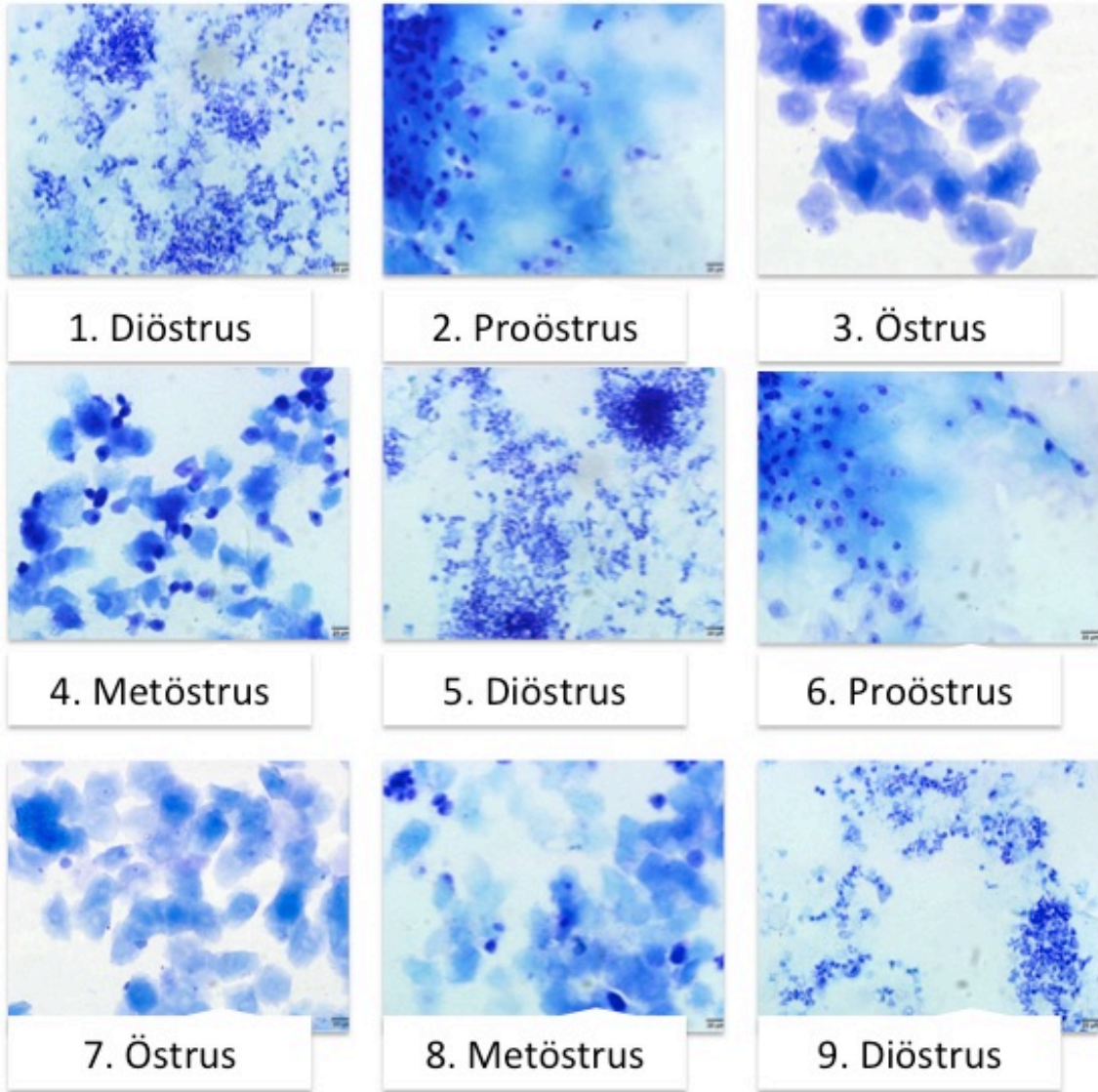
4.1. VAJİNAL SMEAR BULGULARI

Deney gruplarındaki hayvanlardan, deneyin son 10 günü hazırlanan vajinal smear preparatları incelendi. Elde edilecek sonuçların, östrus fazlarına göre farklılık göstermemesi için bütün gruplardaki hayvanlar, diöstrus fazında sakrifiye edildi. Bütün hayvanlarda, son diöstrus fazından önceki 9 gün değerlendirmeye alındı.

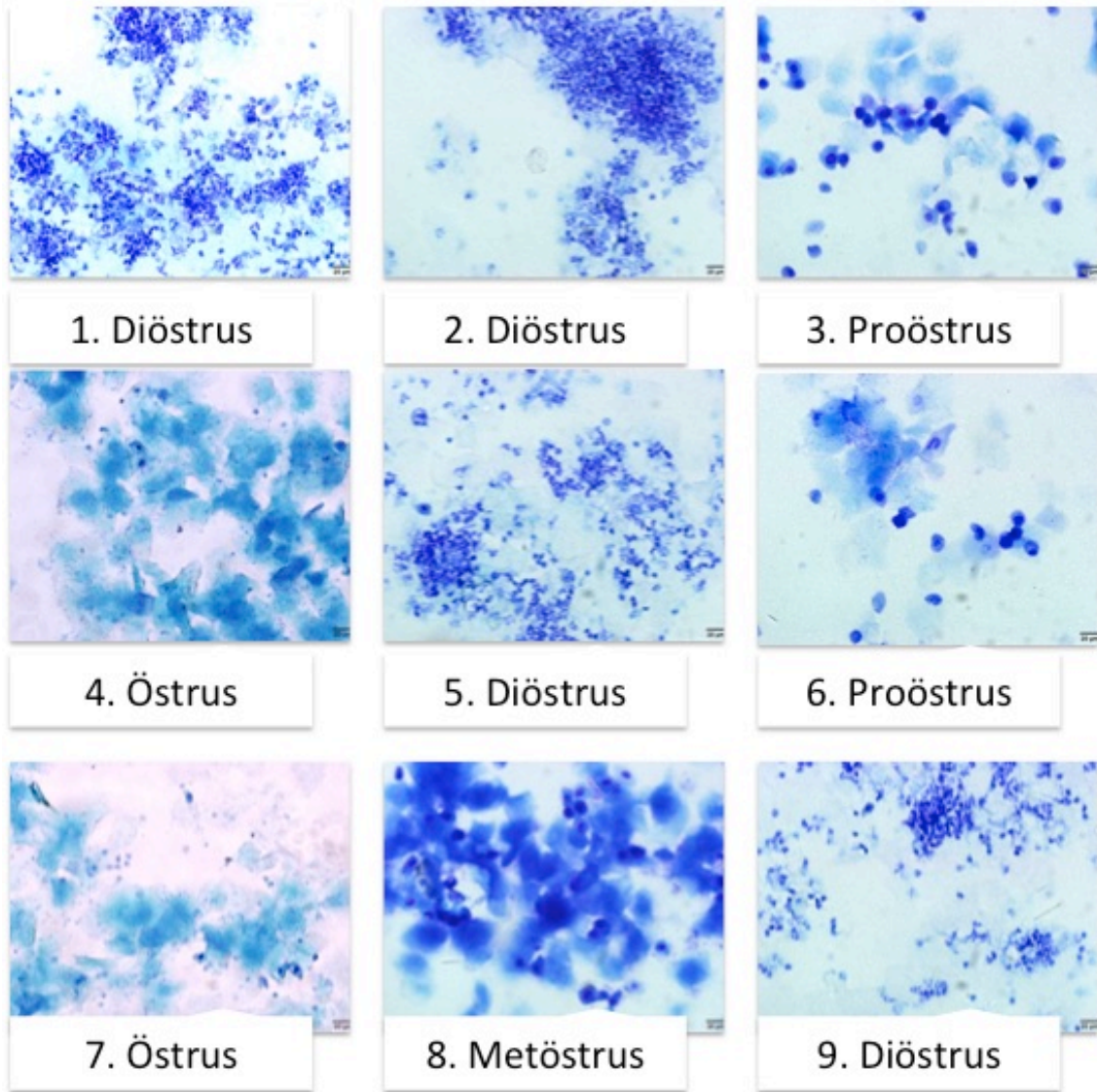
Yapılan mikroskopik değerlendirme sonucunda gruplar arasında düzensizlikler olduğu görüldü. Farelerde bir östrus siklusu 4-5 gün sürmektedir. Kontrol ve Sham (SY ve DMSO) gruplarındaki hayvanların normal östrus siklusları sergilediği ve genellikle 9 günlük gözlem zarfında 2 düzenli östrus siklusu geçirdiği gözlemlendi (Şekil 4-1, Şekil 4-2, Şekil 4-3).

PKOS ve PKOS+İNH gruplarındaki deney hayvanlarının vajinal smear yaymaları incelendiği zaman, hayvanların her iki grupta da östrus sikluslarının uzadığı ve tek bir siklusun bile tamamlanamadığı görüldü (Şekil 4-4, Şekil 4-5).

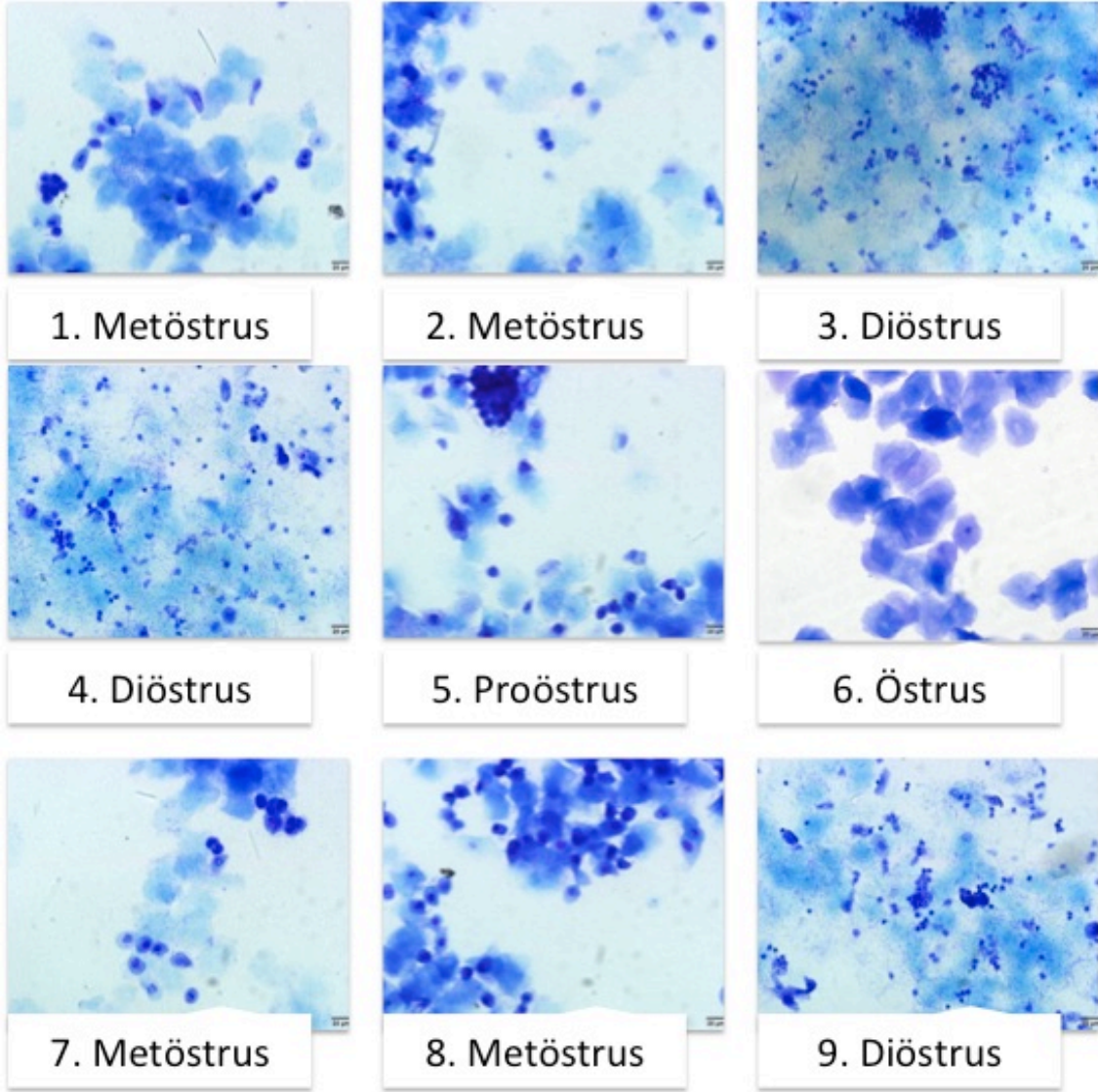
Son olarak İNH grubundaki deney hayvanlarının vajinal smear yaymaları incelendiği zaman, hayvanların düzensiz östrus siklusları sergilediği, 9 günlük inceleme süresince 2 siklus tamamlamış olmalarına rağmen hiç östrus fazına girmedikleri gözlemlendi.



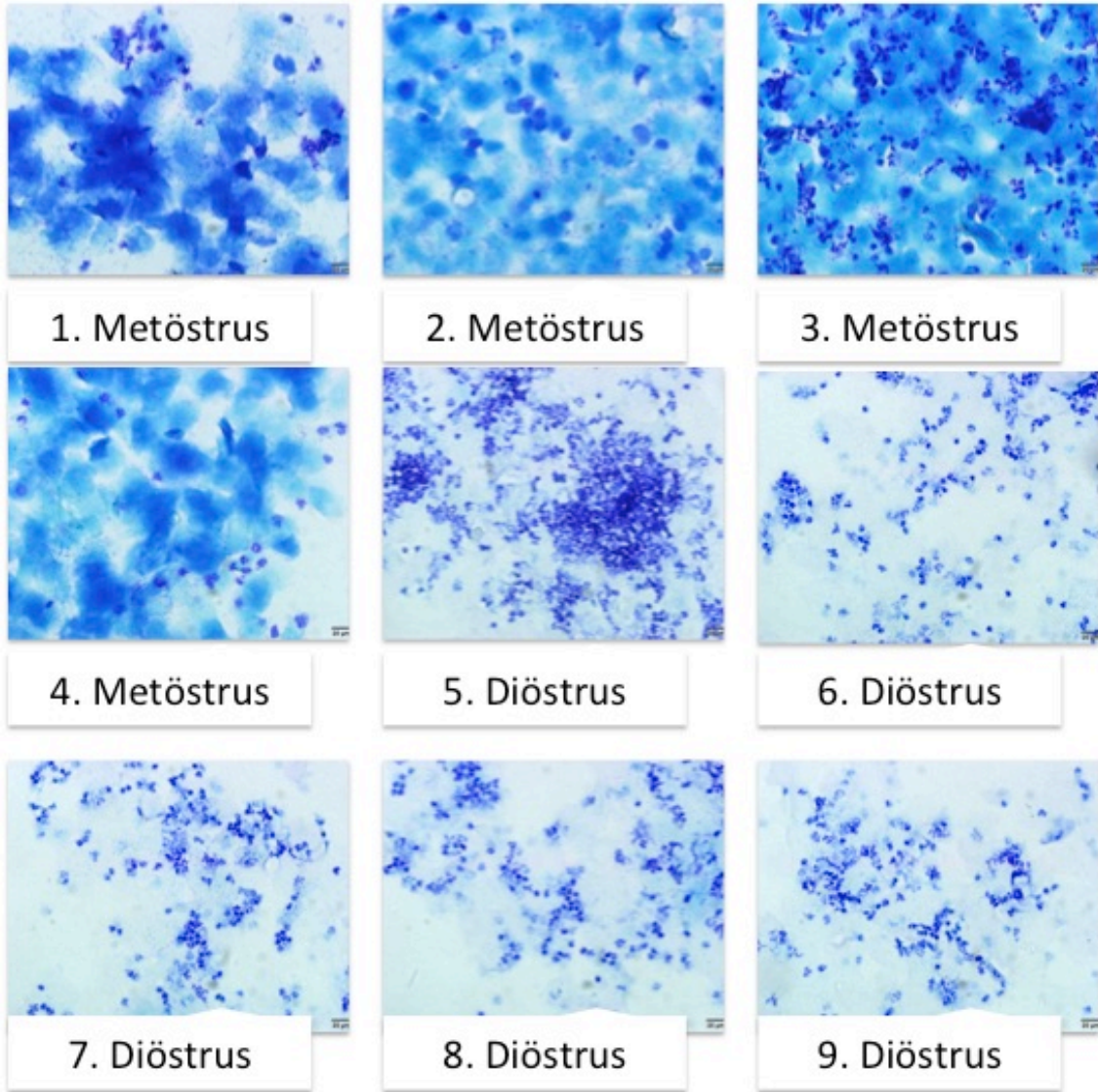
Şekil 4-1: Kontrol grubuna ait vajinal smear preparatları. Kontrol grubundaki deney hayvanları, normal östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 2 tam siklusu tamamlamışlardır (Büyütme x40).



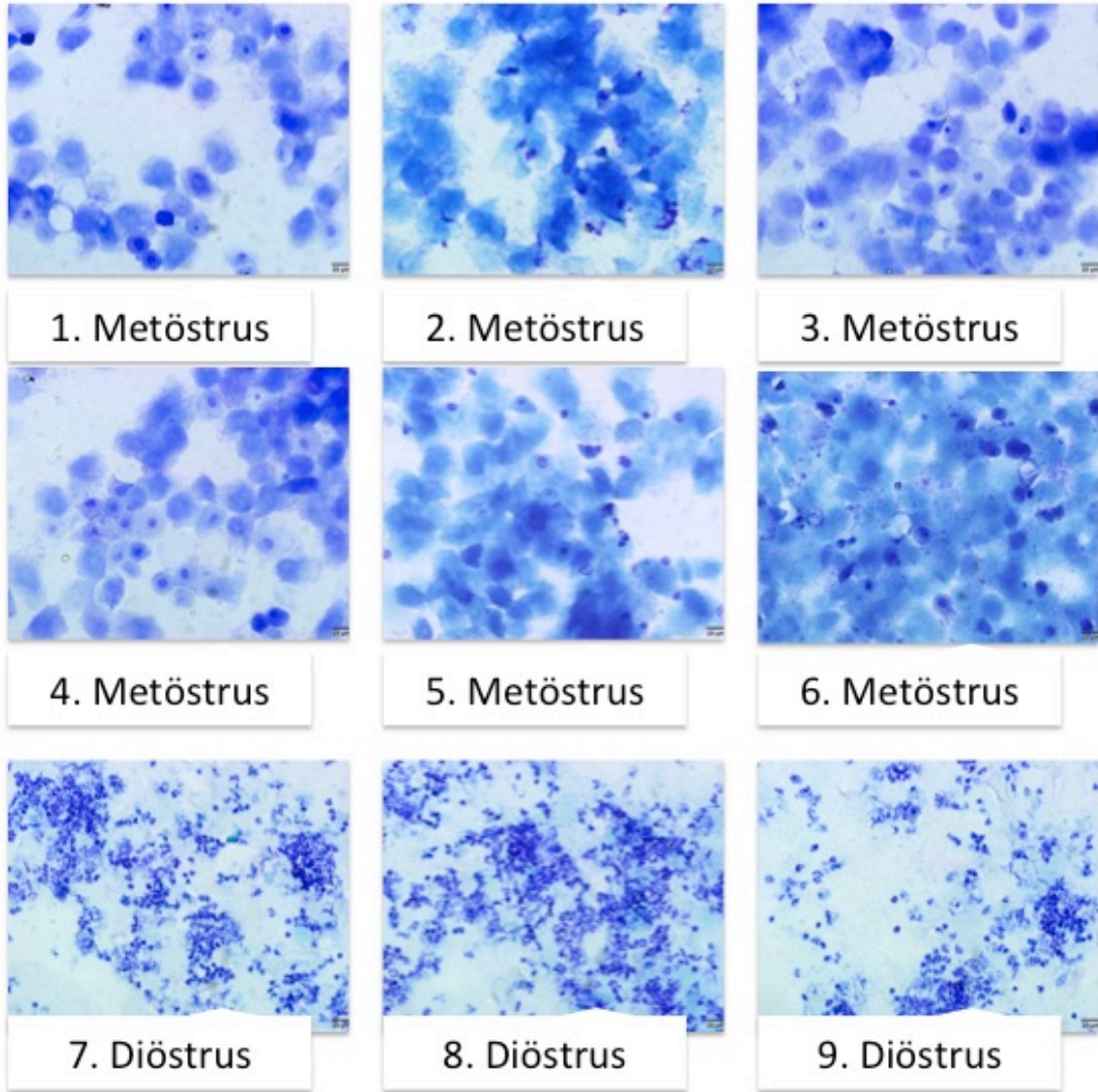
Şekil 4-2: PKOS-Sham (SY) grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile SY enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, normal östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 2 tam siklusu tamamlamışlardır (Büyütme x40).



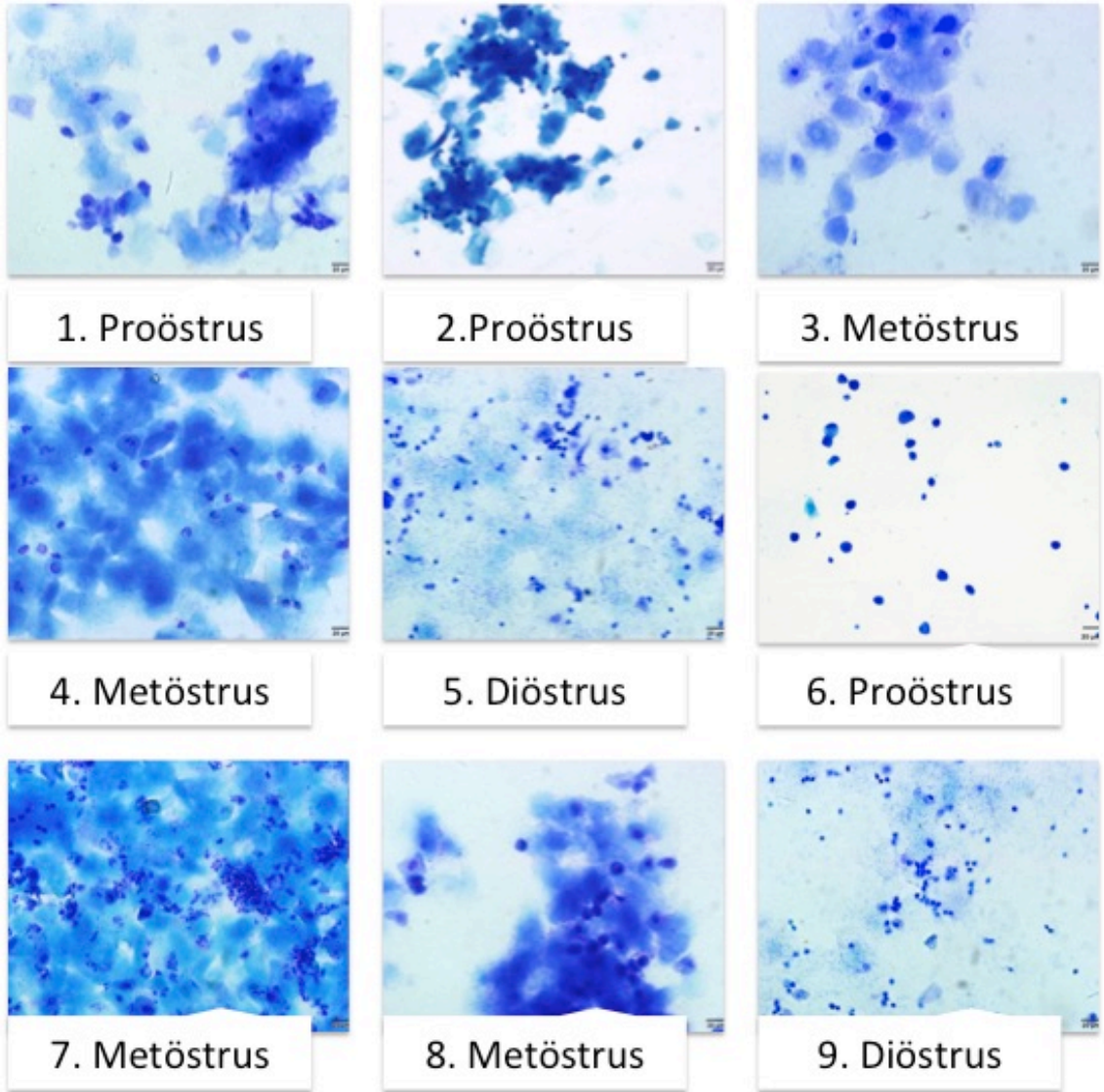
Şekil 4-3: İnhibisyon-Sham (DMSO) grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile DMSO enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, bir miktar uzamayla birlikte normal östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 1 tam, bir de yarım siklusu tamamlamışlardır (Büyütme x40).



Şekil 4-4: PKOS grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile DHEA enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, uzamış östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 1 tam siklusunu bile tamamlayamamışlardır (Büyütme x40).



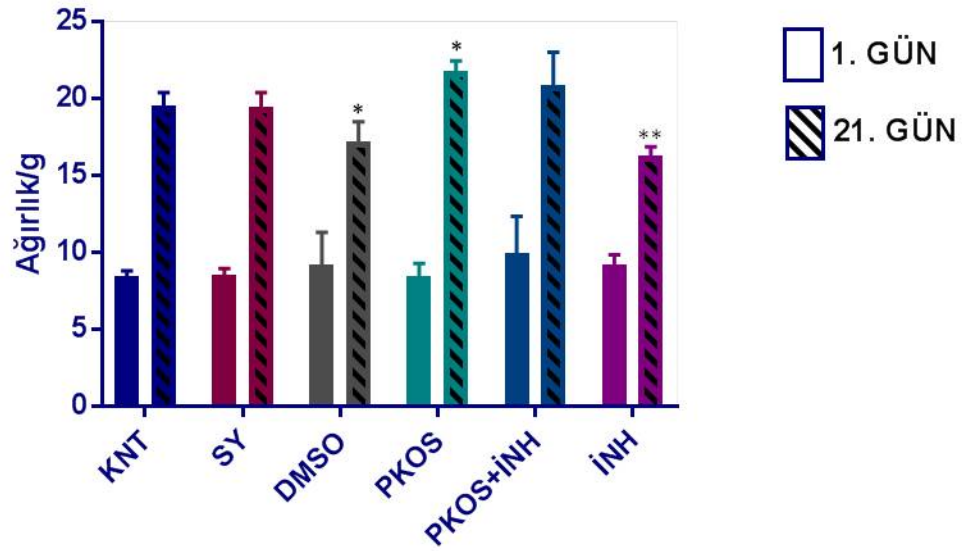
Şekil 4-5: PKOS+İnhibisyon grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile DHEA ve KU-0063794 enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, uzamış östrus siklusu sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 1 tam siklusu bile tamamlayamamışlardır (Büyütme x40).



Şekil 4-6: İnhibisyon grubuna ait vajinal smear preparatları. 20 gün süre ile KU-0063794 enjeksiyonu yapılan deney hayvanları, düzensiz östrus siklusları sergilemiş ve 9 günlük inceleme süresince 2 siklus tamamlamış ancak hiç östrus fazına girmemiştir (Büyütme x40).

4.2. VÜCUT AĞIRLIĞI ÖLÇÜMLERİ

Deneyin ilk ve son günü deney hayvanlarının ağırlıkları ölçüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede 1. gün ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 4-7, Tablo 4-1). 21. gün ağırlıkları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO ve İNH gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma görülmüşken, PKOS grubundaki hayvanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış saptandı (Şekil 4-7, Tablo 4-1). SY ve PKOS+İNH grubundaki hayvanların 21. gün vücut ağırlıkları ise kontrol grubundaki hayvanlar ile benzerlik gösterdi (Şekil 4-7, Tablo 4-1).



Şekil 4-7: Deneyin ilk ve son günü (1. ve 21. günü) deney hayvanlarının ağırlıklarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,5$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-1: Deneyin ilk ve son günü (1. ve 21. günü) deney hayvanlarının ağırlıklarını istatistiksel olarak gösteren tablo.

ORT±SD	KNT	SY	DMSO	PKOS	PKOS+İNH	İNH
1. GÜN	8,5±0,4	8,5±0,4	8,5±2,1	8,25±0,7	8,5±2,4	9±0,6
21. GÜN	19,5±0,9	19,42±1	17,17±1,3*	21,75±0,7*	20,83±2,2	16,25±0,6**

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,5$; ** $p \leq 0,001$.

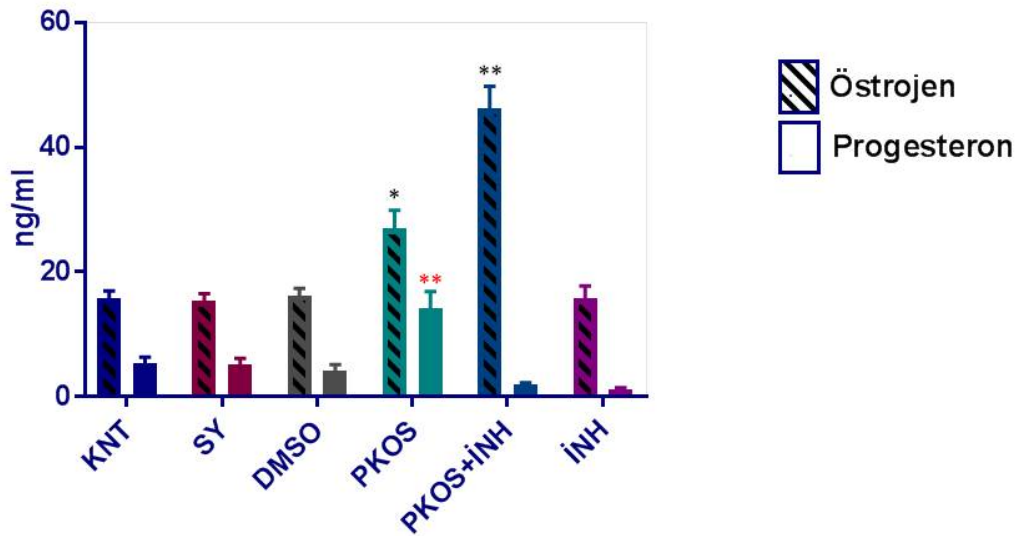
4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.3.1. Serum Östrojen (E₂) Seviyesi

Deneyin son günü deney hayvanlarından alınan serum örneklerinde ELISA yöntemi ile E₂ seviyeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar One-Way ANOVA yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PKOS ($p \leq 0,05$) ve PKOS+İNH ($p \leq 0,001$) gruplarındaki E₂ seviyeleri istatistiksel olarak artış gösterdi (Şekil 4-8, Tablo 4-2). Sham grupları (SY ve DMSO) ve İNH gruplarındaki E₂ seviyeleri ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık sergilemedi ($p \geq 0,05$) (Şekil 4-8, Tablo 4-2).

4.3.2. Serum P₄ Seviyesi

Deneyin son günü deney hayvanlarından alınan serum örneklerinde ELISA yöntemi ile P₄ seviyeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar One-Way ANOVA yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece PKOS ($p \leq 0,001$) grubundaki serum P₄ seviyeleri istatistiksel olarak artış gösterdi (Şekil 4-8, Tablo 4-2). Diğer deney gruplarındaki P₄ seviyeleri ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık sergilemedi ($p \geq 0,05$) (Şekil 4-8, Tablo 4-2).



Şekil 4-8: Deney gruplarındaki hayvanların, 21. gündeki serum E₂ ve P₄ hormon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-2: Deney gruplarındaki hayvanların, 21. gündeki serum E₂ ve P₄ hormon seviyelerini istatistiksel olarak gösteren tablo.

ORT±SD	KNT	SY	DMSO	PKOS	PKOS+İNH	İNH
E ₂	15,8±2,6	15,3±2,7	16,2±2,6	26,9±6,5*	46,1±8**	15,79±4,4
P	5,3±2	5,2±2	4±2,2	14,2±5,4**	2±0,4	1,1±0,6

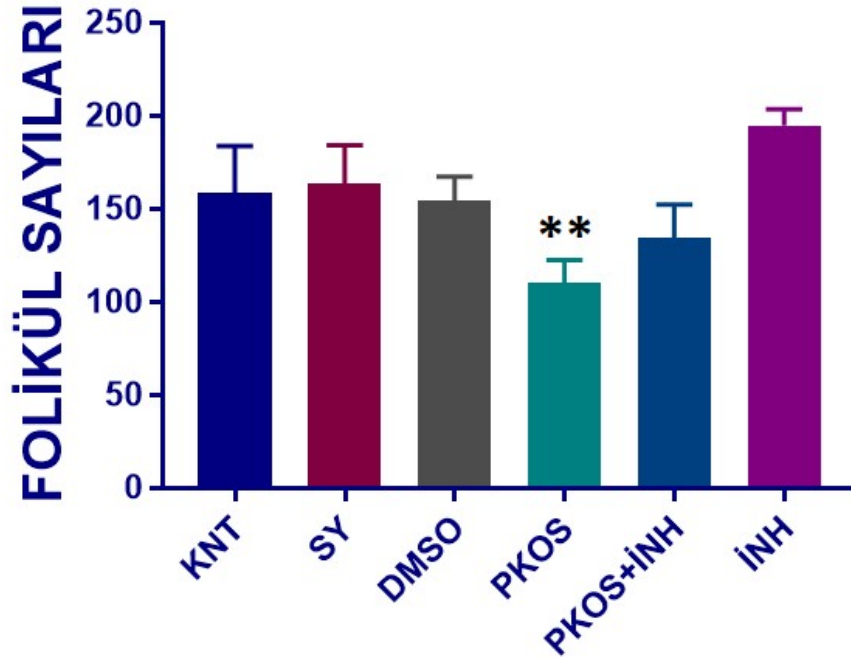
Kontrol ile karşılaştırıldığında: * p≤0,05; **p ≤ 0,001.

4.4. MORFOLOJİK BULGULAR

4.4.1. Morfometrik Bulgular

Deney gruplarından elde edilen ovaryum preparatları H&E boyası ile boyandıktan sonra, ovaryumlardaki toplam folikül sayılarının hesaplanması için, her 30. kesitte bir (yaklaşık 150 µm) folikül sayımı gerçekleştirildi²⁴². Kesitlerin tamamından elde edilen folikül sayımları değerlendirilerek toplam folikül sayıları hesaplandı. Ovaryan foliküllerdeki inceleme, primordial foliküller, primer foliküller, sekonder foliküller, Graaf foliküller, atretik foliküller ve kistik foliküller olmak üzere gerçekleştirildi. KL yapıları da ayrıca morfometrik olarak incelendi. Elde edilen veriler, istatistiksel olarak değerlendirildi.

Gruplar arasında yapılan toplam folikül sayımları incelendiğinde, PKOS grubundaki toplam folikül sayısı, diğer bütün gruplardaki toplam folikül sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı (p≤0,001). Bunun yanında İNH grubundaki toplam folikül sayısı da, kontrol ve SY grubundan p≤0,05, DMSO, PKOS ve PKOS+İNH gruplarından ise p≤0,001 oranında bir artış sergiliyordu (Şekil 4-9, Tablo 4-3).



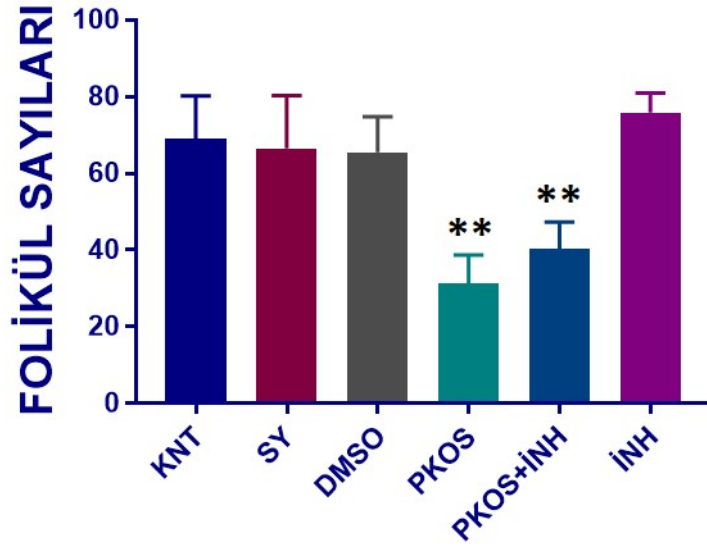
Şekil 4-9: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan toplam folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-3: Toplam folikül sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	158,8	163,5	-4,667	0,6667	YOK	0,9968
KNT-DMSO	158,8	154,5	4,333	0,6191	YOK	0,9978
KNT-PKOS	158,8	110,2	48,67	6,953	VAR***	0,0004
KNT-PKOS+İNH	158,8	134,7	24,17	3,453	YOK	0,1745
KNT-İNH	158,8	194,8	-36	5,143	VAR*	0,0119
SY-DMSO	163,5	154,5	9	1,286	YOK	0,9411
SY-PKOS	163,5	110,2	53,33	7,62	VAR***	0,0001
SY-PKOS+İNH	163,5	134,7	28,83	4,119	YOK	0,0667
SY-İNH	163,5	194,8	-31,33	4,476	VAR*	0,0376
DMSO-PKOS	154,5	110,2	44,33	6,334	VAR**	0,0013
DMSO-PKOS+İNH	154,5	134,7	19,83	2,834	YOK	0,3640
DMSO-İNH	154,5	194,8	-40,33	5,762	VAR**	0,0038
PKOS-PKOS+İNH	110,2	134,7	-24,5	3,5	YOK	0,1638
PKOS-İNH	110,2	194,8	-84,67	12,1	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	134,7	194,8	-60,17	8,596	VAR****	$\leq 0,0001$

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Gruplar arasındaki primordial folikül sayılarına bakıldığında PKOS grubundaki primordial folikül sayıları, PKOS+İNH grubundakilerden hariç; PKOS+İNH grubundaki primordial folikül sayıları da PKOS grubundakilerden hariç diğer bütün gruplardaki primordial folikül sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı ($p \leq 0,001$), (Şekil 4-10, Tablo 4-4).



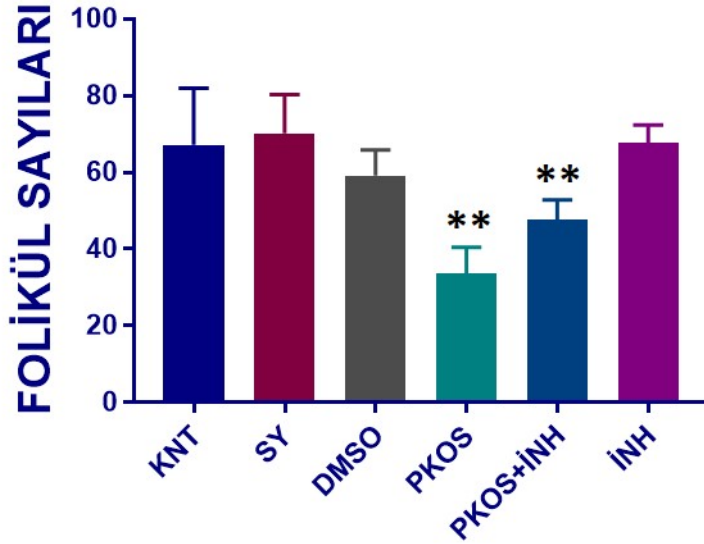
Şekil 4-10: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan primordial folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-4: Primordial folikül sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	69	66,5	2,5	0,6508	YOK	0,9972
KNT-DMSO	69	65,5	3,5	0,9111	YOK	0,9865
KNT-PKOS	69	31,33	37,67	9,805	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	69	40,33	28,67	7,462	VAR***	0,0001
KNT-İNH	69	75,83	-6,833	1,779	YOK	0,8048
SY-DMSO	66,5	65,5	1	0,2603	YOK	$\geq 0,9999$
SY-PKOS	66,5	31,33	35,17	9,154	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	66,5	40,33	26,17	6,811	VAR***	0,0005
SY-İNH	66,5	75,83	-9,333	2,43	YOK	0,5312
DMSO-PKOS	65,5	31,33	34,17	8,894	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	65,5	40,33	25,17	6,551	VAR***	0,0009
DMSO-İNH	65,5	75,83	-10,33	2,69	YOK	0,4205
PKOS-PKOS+İNH	31,33	40,33	-9	2,343	YOK	0,5695
PKOS-İNH	31,33	75,83	-44,5	11,58	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	40,33	75,83	-35,5	9,241	VAR****	$\leq 0,0001$

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Primer folikül sayıları değerlendirildiğinde, PKOS grubundaki primer folikül sayıları, PKOS+İNH grubu hariç diğer bütün gruplardaki primer folikül sayılarına göre anlamlı bir azalma sergilerken; PKOS+İNH grubundaki primer folikül sayıları da PKOS ve DMSO grupları hariç diğer bütün gruplardaki primer folikül sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı ($p \leq 0,001$), (Şekil 4-11, Tablo 4-5).



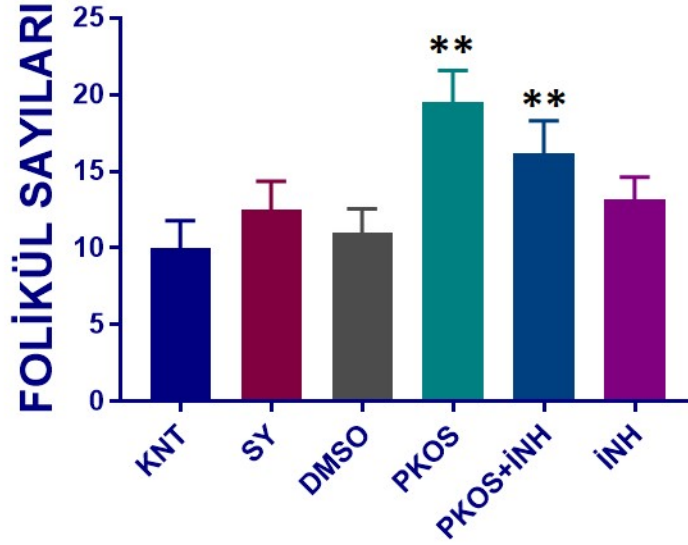
Şekil 4-11: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan primer folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-5: Primer folikül sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	67,17	70,17	-3	0,8388	YOK	0,9907
KNT-DMSO	67,17	59,17	8	2,237	YOK	0,6163
KNT-PKOS	67,17	33,67	33,5	9,367	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	67,17	47,67	19,5	5,452	VAR**	0,0068
KNT-İNH	67,17	67,67	-0,5	0,1398	YOK	$\geq 0,9999$
SY-DMSO	70,17	59,17	11	3,076	YOK	0,2788
SY-PKOS	70,17	33,67	36,5	10,21	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	70,17	47,67	22,5	6,291	VAR**	0,0014
SY-İNH	70,17	67,67	2,5	0,699	YOK	0,9960
DMSO-PKOS	59,17	33,67	25,5	7,13	VAR***	0,0003
DMSO-PKOS+İNH	59,17	47,67	11,5	3,215	YOK	0,2360
DMSO-İNH	59,17	67,67	-8,5	2,377	YOK	0,5545
PKOS-PKOS+İNH	33,67	47,67	-14	3,914	YOK	0,0911
PKOS-İNH	33,67	67,67	-34	9,506	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İN	47,67	67,67	-20	5,592	VAR**	$\leq 0,0053$

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Sekonder folikül sayıları gruplar arasında değerlendirildiğinde, PKOS grubundaki sekonder folikül sayısı, kontrol, SY, DMSO ve İNH gruplarından $p \leq 0,001$ anlamlılık derecesi ile, PKOS+İNH grubundan ise $p \leq 0,05$ anlamlılık derecesi ile bir artış göstermişken; PKOS+İNH grubundaki sekonder folikül sayıları da, PKOS grubu hariç diğer bütün gruplardaki sekonder folikül sayılarından istatistiksel olarak anlamlı dercede artmıştı ($p \leq 0,001$), (Şekil 4-12, Tablo 4-6).



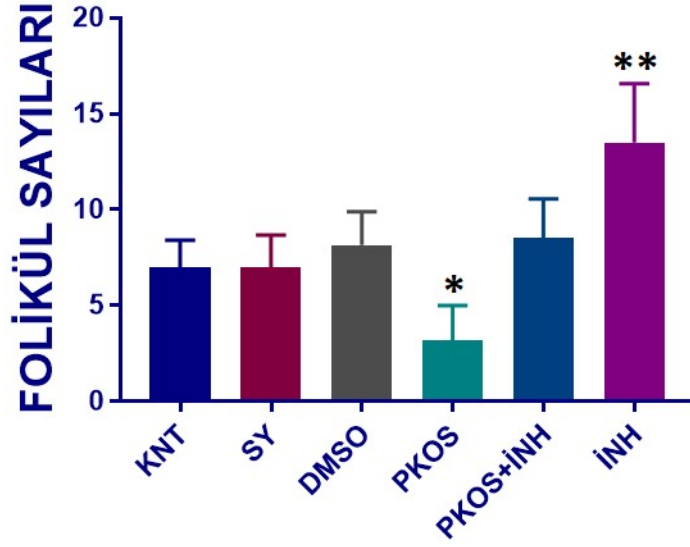
Şekil 4-12: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan sekonder folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-6: Sekonder folikül sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	10	12,5	-2,5	3,343	YOK	0,2012
KNT-DMSO	10	11	-1	1,337	YOK	0,9311
KNT-PKOS	10	19,5	-9,5	12,7	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	10	16,17	-6,167	8,246	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	10	13,17	-3,167	4,234	YOK	0,0556
SY-DMSO	12,5	11	1,5	2,006	YOK	0,7160
SY-PKOS	12,5	19,5	-7	9,36	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	12,5	16,17	-3,667	4,903	VAR*	0,0182
SY-İNH	12,5	13,17	-0,6667	0,8915	YOK	0,9878
DMSO-PKOS	11	19,5	-8,5	11,37	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	11	16,17	-5,167	6,909	VAR***	0,0004
DMSO-İNH	11	13,17	-2,167	2,897	YOK	0,3402
PKOS-PKOS+İNH	19,5	16,17	3,333	4,457	VAR*	0,0388
PKOS-İNH	19,5	13,17	6,333	8,469	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	16,17	13,17	3	4,012	YOK	0,0787

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Gruplar arasındaki Graaf foliküller değerlendirildiğinde, PKOS grubundaki Graaf folikül sayıları kontrol ve SY gruplarından $p \leq 0,05$, DMSO, PKOS+İNH ve İNH gruplarından ise $p \leq 0,001$ oranında azalmıştı. İNH grubundaki Graaf folikül sayıları ise bütün gruplardan $p \leq 0,001$ anlamlılık derecesi ile istatistiksel olarak bir artış sergilemekteydi (Şekil 4-13, Tablo 4-7).



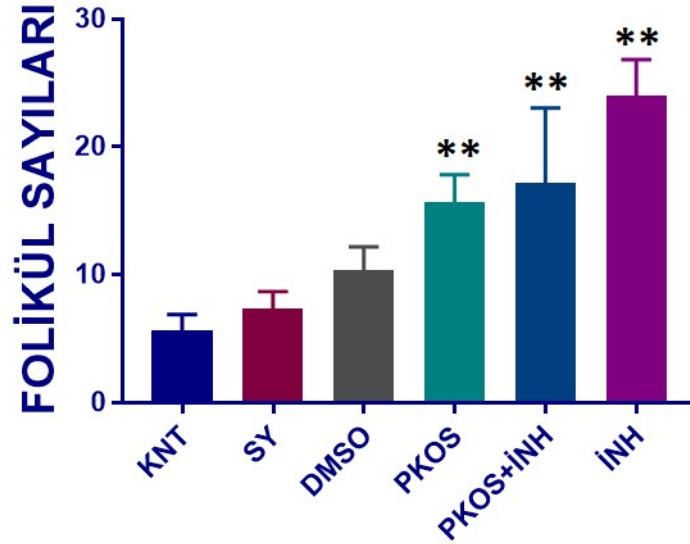
Şekil 4-13: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan Graaf folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-7: Graaf folikül sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	7	7	0	0	YOK	$\geq 0,9999$
KNT-DMSO	7	8,167	-1,167	1,402	YOK	0,9171
KNT-PKOS	7	3,167	3,833	4,606	VAR*	0,0303
KNT-PKOS+İNH	7	8,5	-1,5	1,802	YOK	0,7962
KNT-İNH	7	13,5	-6,5	7,81	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-DMSO	7	8,167	1,167	1,402	YOK	0,9171
SY-PKOS	7	3,167	3,833	4,606	VAR*	0,0303
SY-PKOS+İNH	7	8,5	-1,5	1,802	YOK	0,7962
SY-İNH	7	13,5	-6,5	7,81	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS	8,167	3,167	5	6,008	VAR**	0,0024
DMSO-PKOS+İNH	8,167	8,5	-0,3333	0,4005	YOK	0,9997
DMSO-İNH	8,167	13,5	-5,333	6,409	VAR**	0,0011
PKOS-PKOS+İNH	3,167	8,5	-5,333	6,409	VAR**	0,0011
PKOS-İNH	3,167	13,5	-10,33	12,42	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İN	8,5	13,5	-5	6,008	VAR**	0,0024

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Atretik folikül sayıları gruplar arasında değerlendirmeye tabi tutulduğunda, PKOS, PKOS+İNH ve İNH grubundaki atretik folikül sayıları kontrol, grubuna göre anlamlı bir artış sergilemekteydi ($p \leq 0,001$); (Şekil 4-14, Tablo 4-8).



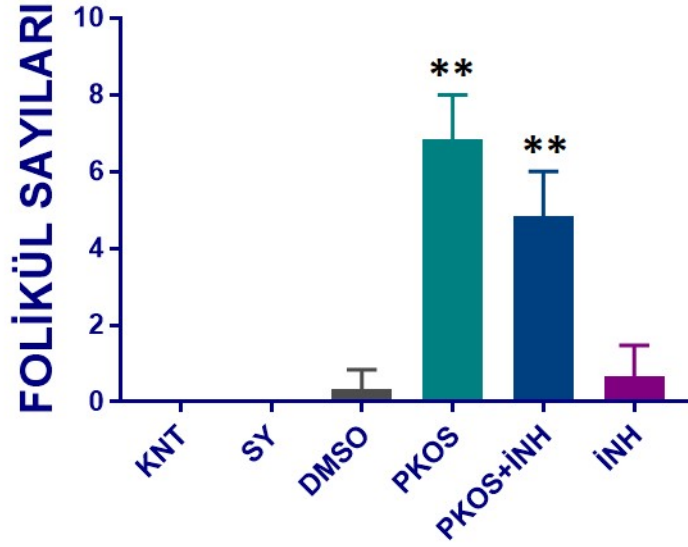
Şekil 4-14: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan atretik folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-8: Atretik folikül sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	5,667	7,333	-1,667	1,36	YOK	0,9263
KNT-DMSO	5,667	10,33	-4,667	3,809	YOK	0,1063
KNT-PKOS	5,667	15,67	-10	8,162	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	5,667	17,17	-11,5	9,387	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	5,667	24	-18,33	14,96	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-DMSO	7,333	10,33	-3	2,449	YOK	0,5228
SY-PKOS	7,333	15,67	-8,333	6,802	VAR***	0,0005
SY-PKOS+İNH	7,333	17,17	-9,833	8,026	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-İNH	7,333	24	-16,67	13,6	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS	10,33	15,67	-5,333	4,353	VAR*	0,0460
DMSO-PKOS+İNH	10,33	17,17	-6,833	5,578	VAR**	0,0054
DMSO-İNH	10,33	24	-13,67	11,16	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS-PKOS+İNH	15,67	17,17	-1,5	1,224	YOK	0,9517
PKOS-İNH	15,67	24	-8,333	6,802	VAR***	0,0005
PKOS+İNH-İN	17,17	24	-6,833	5,578	VAR**	0,0054

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Kistik folikül sayıları, PKOS ve PKOS+İNH gruplarında, diğer bütün gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış sergilemekteydi ($p \leq 0,001$); ancak PKOS+İNH grubundaki kistik folikül sayısında, PKOS grubuna kıyasla bir düşüş söz konusuydu ($p \leq 0,001$) (Şekil 4-15, Tablo 4-9).



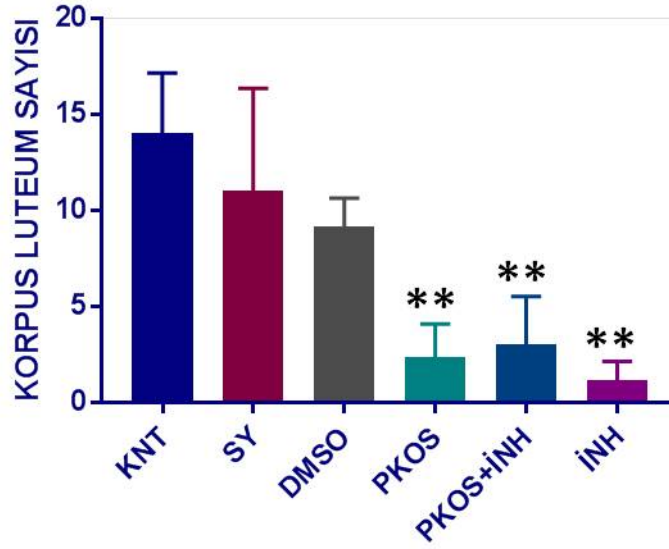
Şekil 4-15: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan kistik folikül sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-9: Kistik folikül sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	0	0	0	0	YOK	$\geq 0,9999$
KNT-DMSO	0	0,3333	-0,3333	1,044	YOK	0,9754
KNT-PKOS	0	6,833	-6,833	21,41	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	0	4,833	-4,833	15,14	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	0	0,6667	-0,6667	2,089	YOK	0,6808
SY-DMSO	0	0,3333	-0,3333	1,044	YOK	0,9754
SY-PKOS	0	6,833	-6,833	21,41	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	0	4,833	-4,833	15,14	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-İNH	0	0,6667	-0,6667	2,089	YOK	0,6808
DMSO-PKOS	0,3333	6,833	-6,5	20,37	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	0,3333	4,833	-4,5	14,1	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-İNH	0,3333	0,6667	-0,3333	1,044	YOK	0,9754
PKOS-PKOS+İNH	6,833	4,833	2	6,267	VAR**	0,0015
PKOS-İNH	6,833	0,6667	6,167	19,32	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	4,833	0,6667	4,167	13,06	VAR****	$\leq 0,0001$

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Son olarak deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarında bulunan KL sayıları karşılaştırıldığında, PKOS, PKOS+İNH ve İNH grubundaki KL sayıları, kontrol, SY ve DMSO gruplarına göre anlamlı derecede bir azalmıştı ($p \leq 0,001$); (Şekil 4-16 Tablo 4-10).



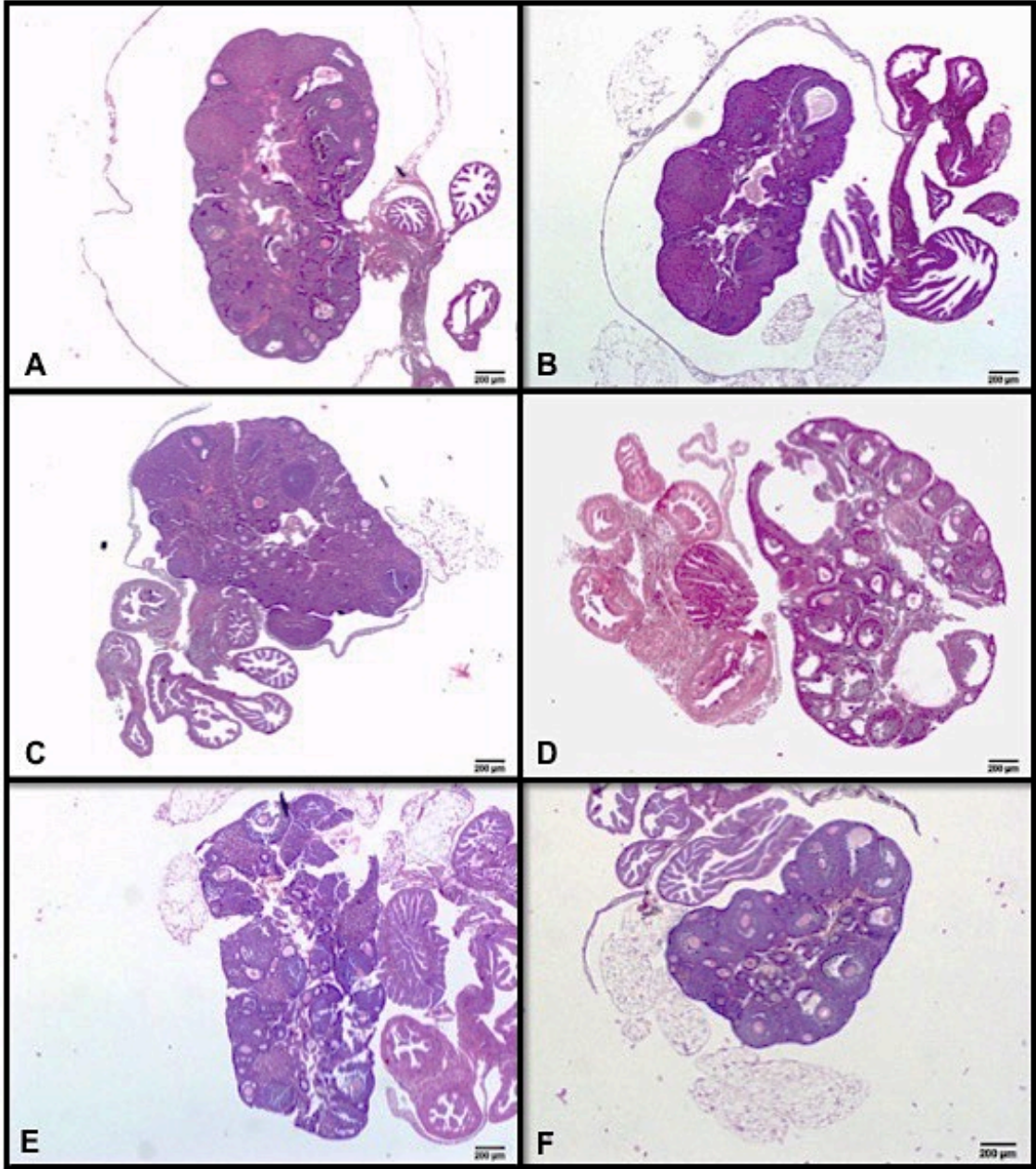
Şekil 4-16: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarında bulunan KL sayılarını gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-10: KL sayımı için TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	14	11	3	2,511	YOK	0,4958
KNT-DMSO	14	9,167	4,833	4,045	YOK	0,0748
KNT-PKOS	14	2,333	11,67	9,764	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	14	3	11	9,206	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	14	1,167	12,83	10,74	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-DMSO	11	9,167	1,833	1,534	YOK	0,8835
SY-PKOS	11	2,333	8,667	7,253	VAR***	0,0002
SY-PKOS+İNH	11	3	8	6,695	VAR***	0,0006
SY-İNH	11	1,167	9,833	8,229	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS	9,167	2,333	6,833	5,719	VAR**	0,0042
DMSO-PKOS+İNH	9,167	3	6,167	5,161	VAR*	0,0116
DMSO-İNH	9,167	1,167	8	6,695	VAR***	0,0006
PKOS-PKOS+İNH	2,333	3	-0,6667	0,5579	YOK	0,9986
PKOS-İNH	2,333	1,167	1,167	0,9764	YOK	0,9817
PKOS+İNH-İN	3	1,167	1,833	1,534	YOK	0,8835

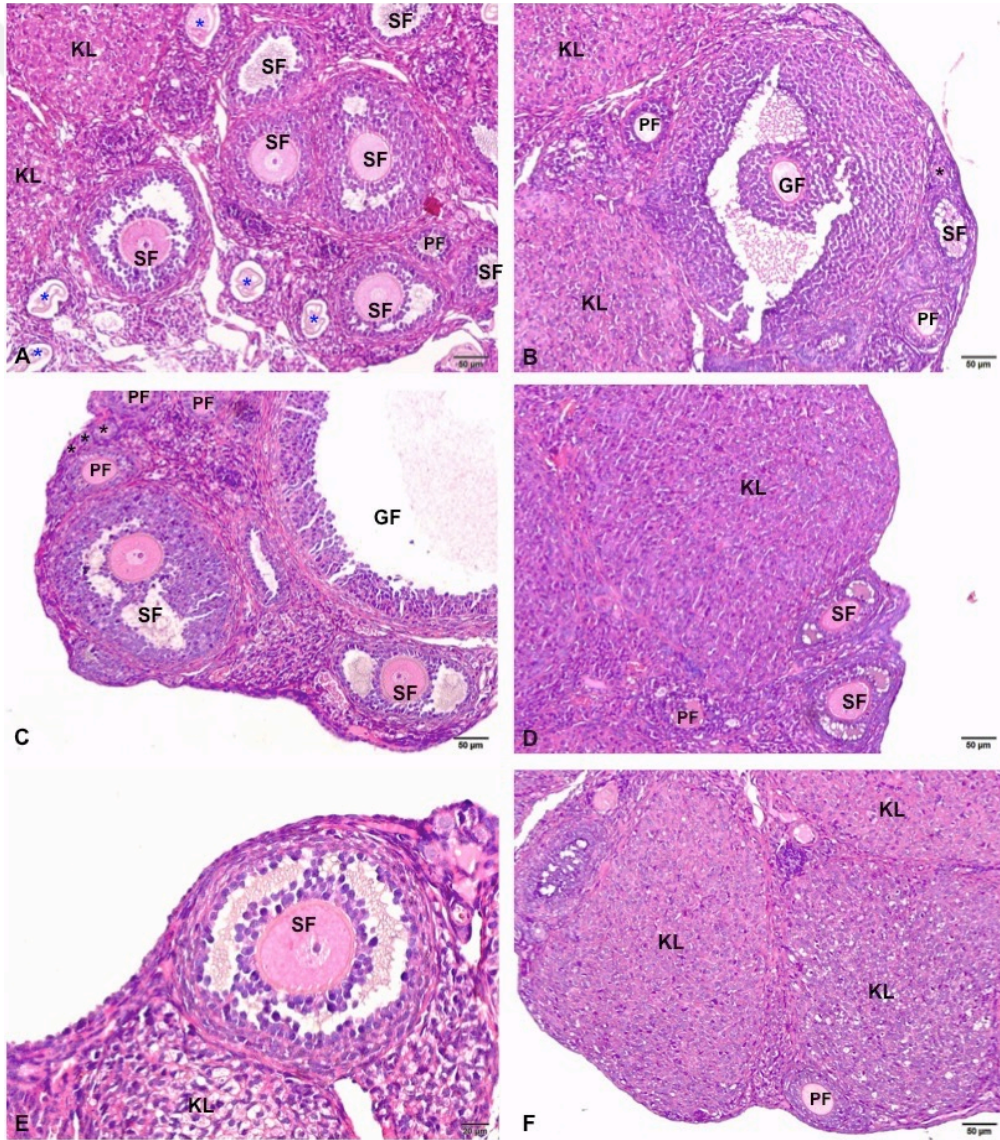
4.4.2. Histolojik Değerlendirme

Bütün gruplara ait over dokularından, H&E ve Masson'un trikrom boyası kullanılarak hazırlanan preparatlar, Olympus DP-72 kamera ataçmanlı Olympus BX-61 ışık mikroskobu ile çeşitli büyütmelerde incelendi. Gruplara ait ovaryumların genel yapısı Şekil 4-17'da görülmektedir.

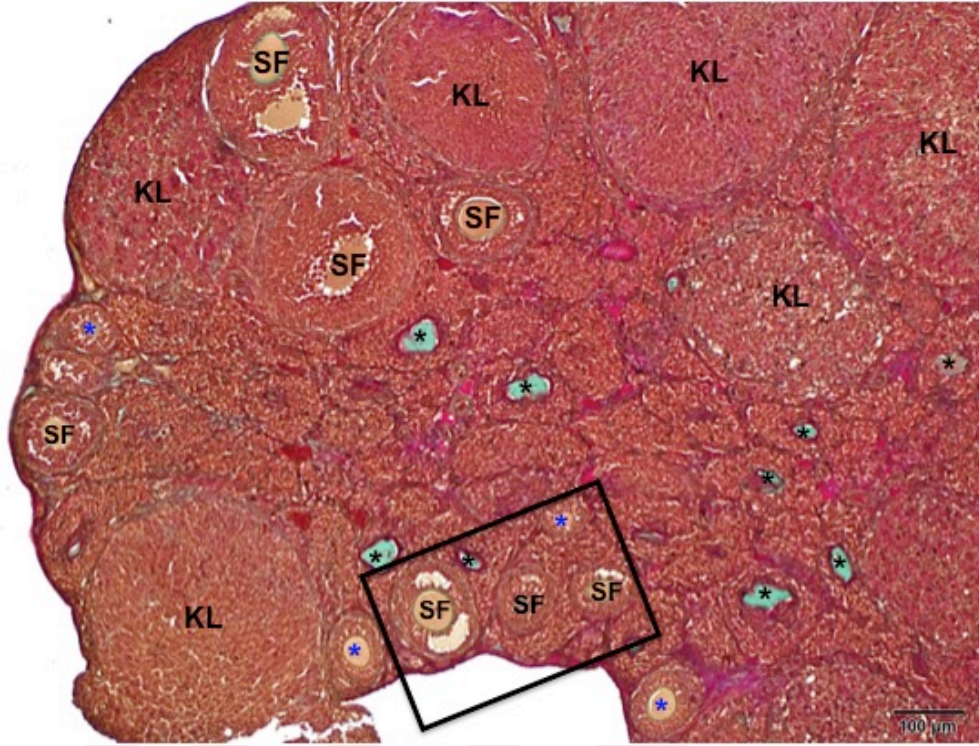


Şekil 4-17: Gruplardaki deney hayvanlarının genel over morfolojilerini gösteren resim. A. Kontrol grubu; B. SY grubu; C. DMSO grubu; D. PKOS grubu; E. PKOS+İnhibisyon grubu; F. İnhibisyon grubu. (H&E, x4).

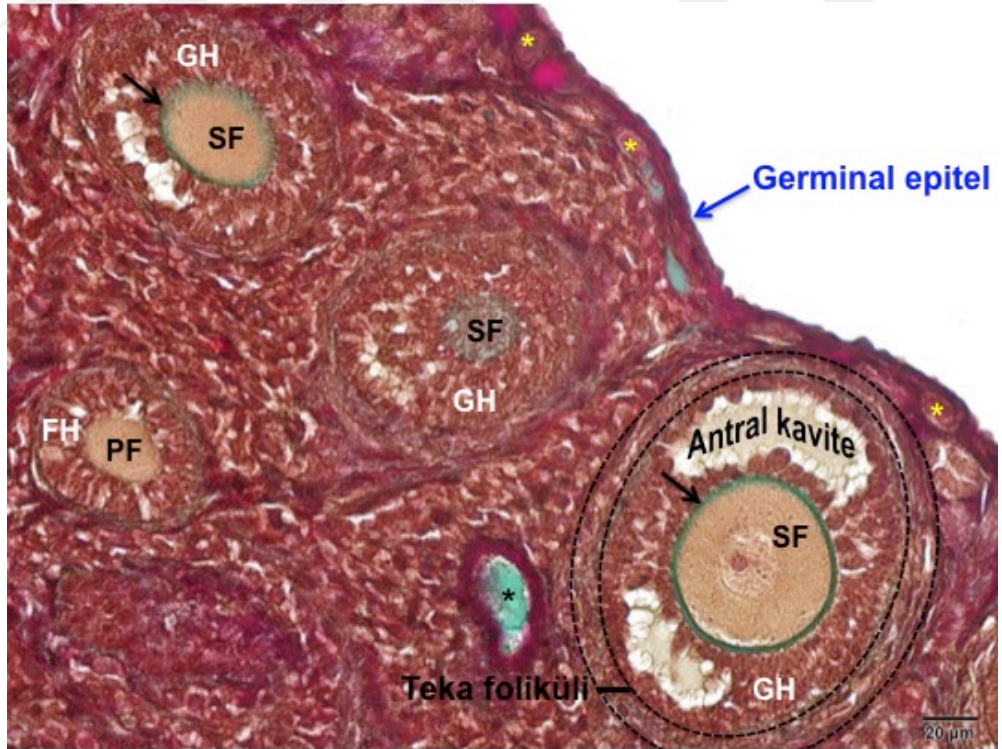
Kontrol grubundaki hayvanların ovaryumları histolojik olarak incelendiğinde, gelişimin farklı evrelerinde, çok sayıda normal görünümlü ovaryan folikül içeren düzgün ovaryum yapısı izlendi (Şekil 4-18, 4-19). Foliküllerde bulunan oositler ve oositi çevreleyen ZP'lar düzgün görünümlüydü (Şekil 4-20, 4-21). GH'leri birbirlerine yakın konumlaydu ve herhangi bir dejenerasyon sergilemiyordu (Şekil 4-20, 4-21). TH'leri de foliküllerin etrafında, düzgün sirküler seyirli hücreler olarak görüldü (Şekil 4-20, 4-21). Ovaryumlarda ayrıca çok sayıda KL'un bulunması, ovulasyonda herhangi bir düzensizliğin olmadığını kanıtladı (Şekil 4-19). Ovaryumu çevreleyen germinal epitel düzgün görünümlüydü (Şekil 4-20, 4-21, 4-22). Teka tabakasında ve medullada bulunan kan damarları ve ovaryum stroması normal görünümlüydü (Şekil 4-19, 4-20).



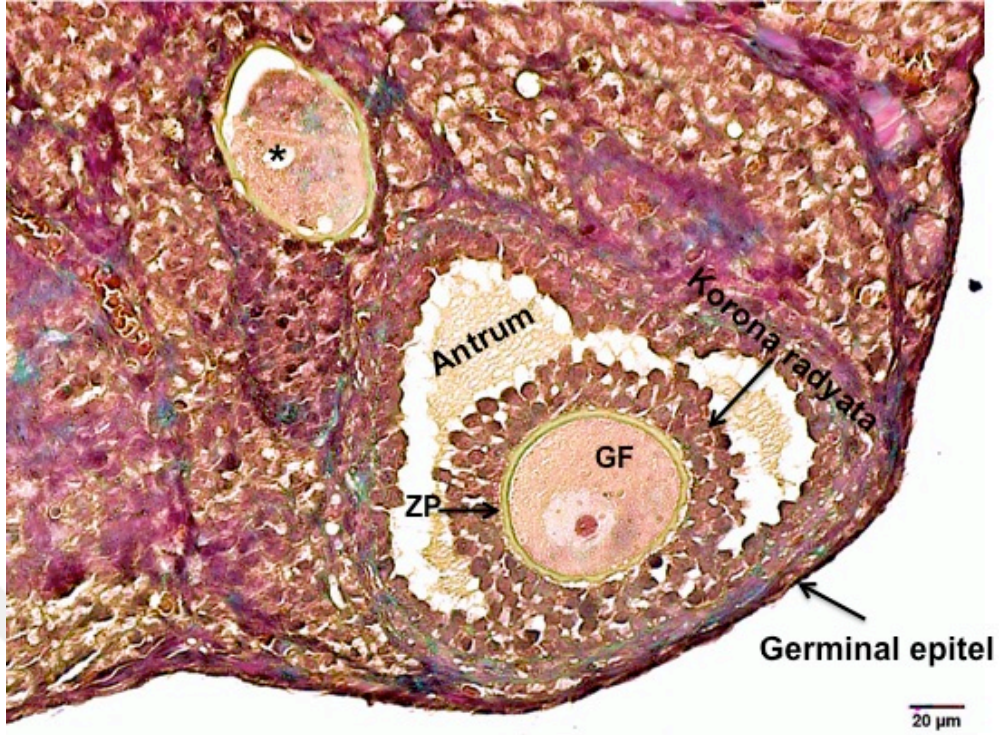
Şekil 4-18: Kontrol grubuna ait ovaryumlardan kesitler. Siyah yıldız: Primordiyal folikül; PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; GF: Graaf folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum. (H&E; A,B,C,D,F x20; E x40)



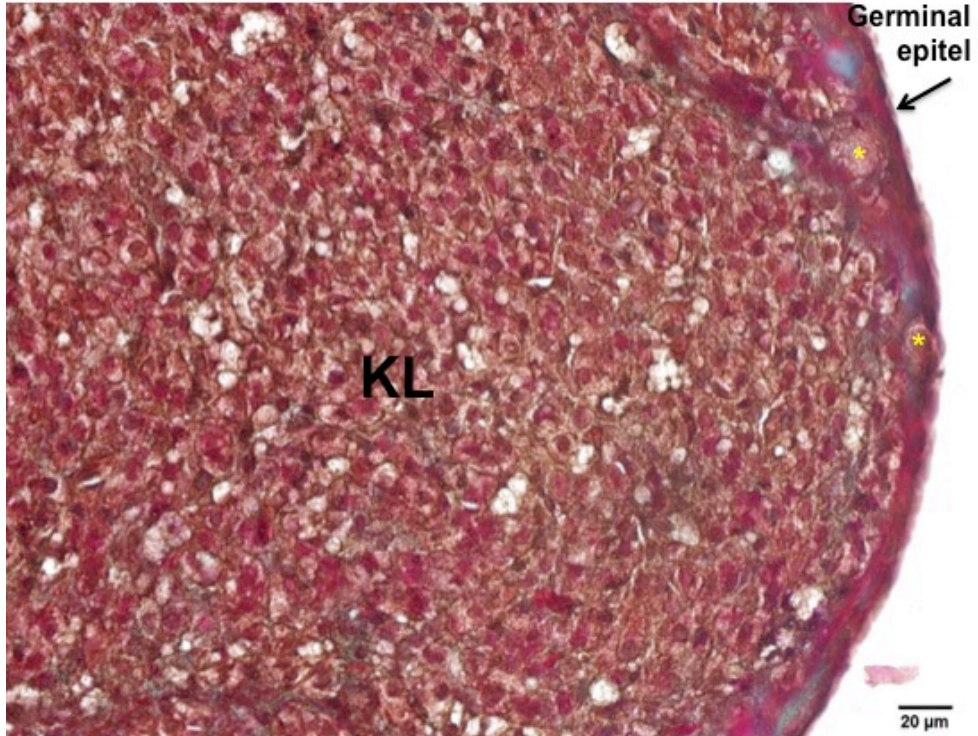
Şekil 4-19: Kontrol grubuna ait ovaryum yapısını gösteren resim. KL: Korpus luteum; SF: Sekonder folikül; Mavi yıldız: Primer folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; Siyah dikdörtgen: Şekil 4-13'de büyütülen alan. (Masson'un trikrom boyası, x10).



Şekil 4-20: Şekil 4-12'de siyah çerçeve içindeki alanı gösteren resim. Sarı yıldız: Primordial folikül; PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; FH: Folikül hücreleri; GH: Granuloza hücreleri, Siyah ok: ZP (Masson'un trikrom boyası, x40).

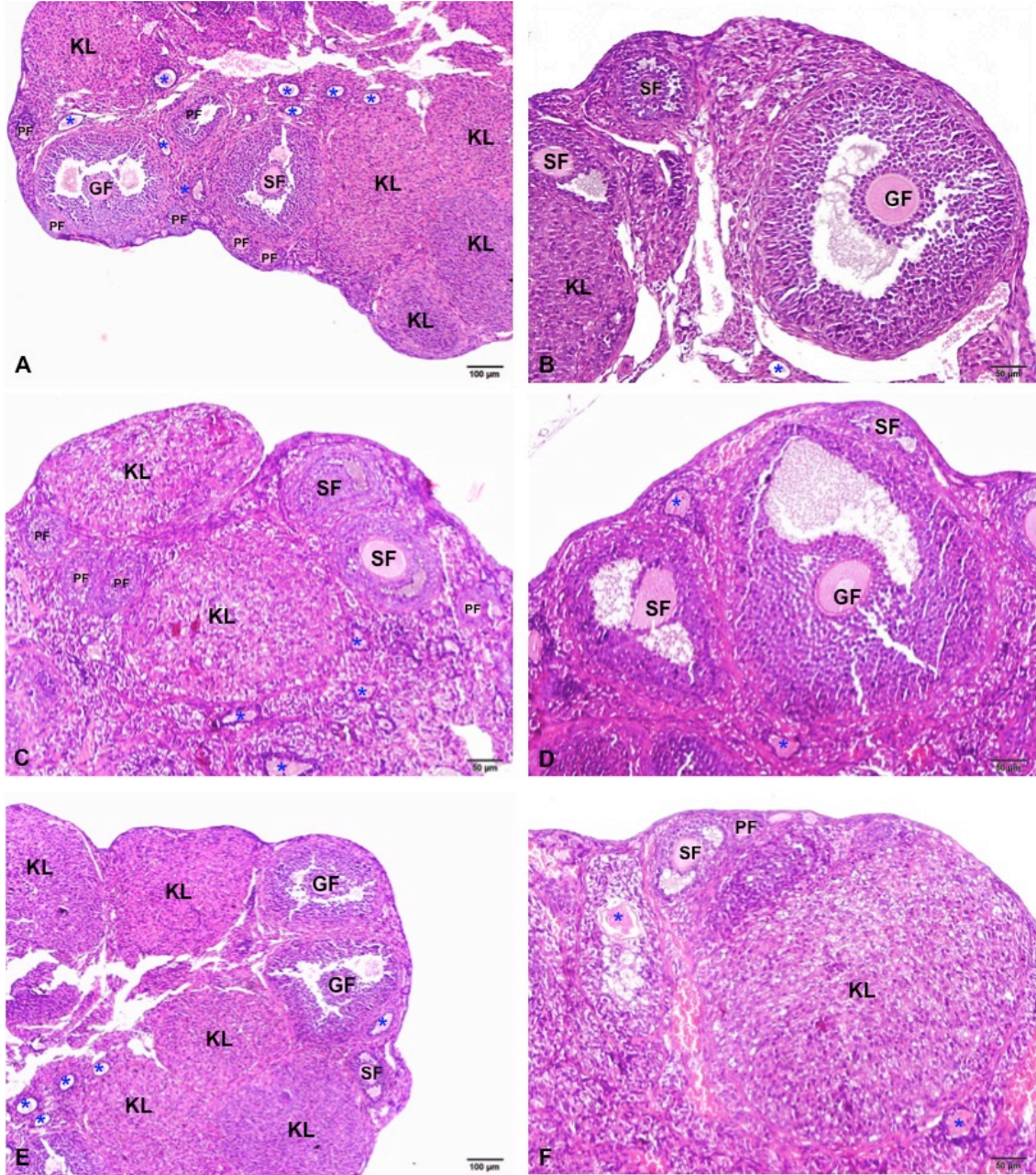


Şekil 4-21: Kontrol grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. GF: Graaf folikül; Siyah yıldız (*): Atretik folikül. (Masson'un trikrom boyası, x40).

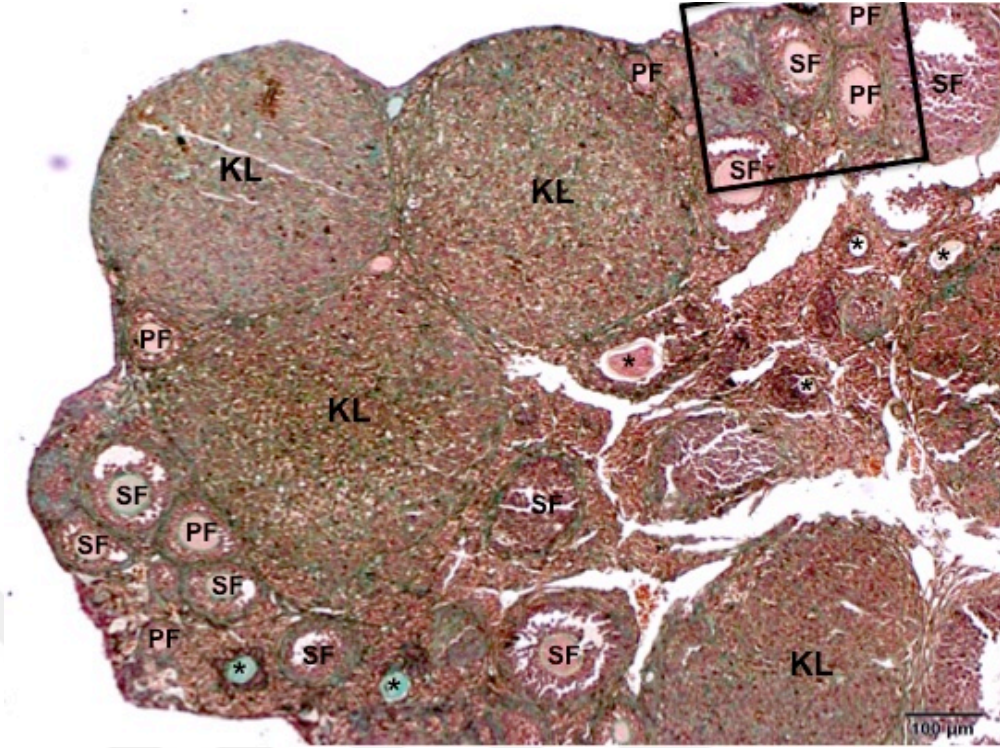


Şekil 4-22: Kontrol grubuna ait bir KL'un yapısını gösteren resim. KL: Korpus luteum. (Masson'un trikrom boyası, x40).

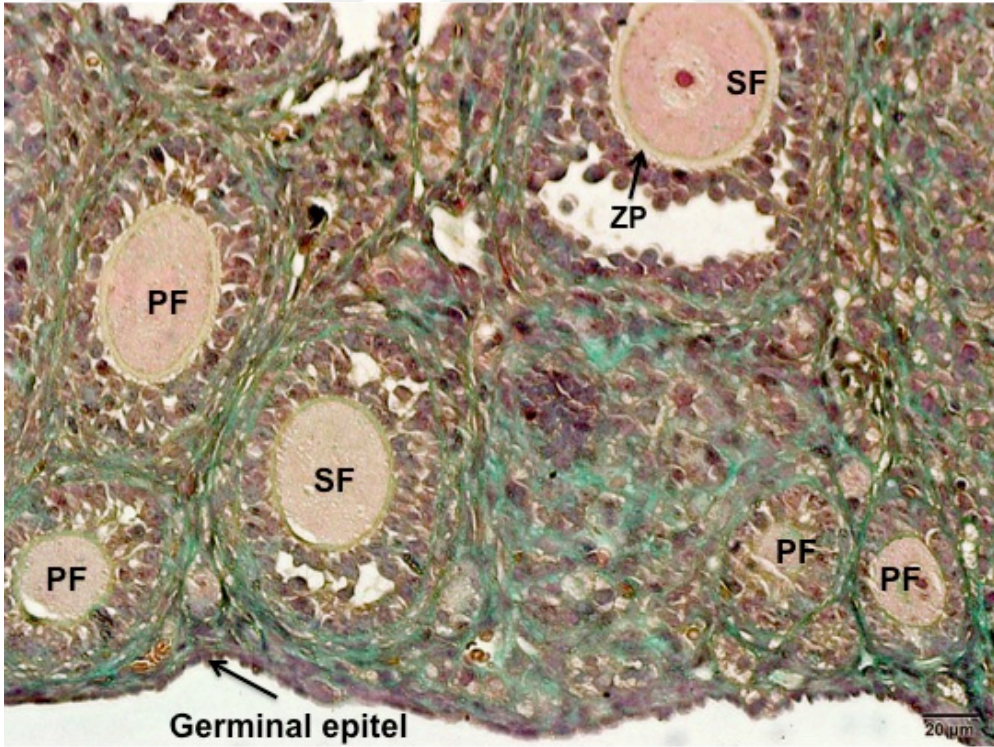
SY grubundaki hayvanların ovaryumları da, histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubu ile benzer bir morfoloji sergiledi. (Şekil 4-23). Ovaryumlar, herhangi bir dejenerasyon sergilemiyordu (Şekil 4-24, Şekil 4-25, Şekil 4-26, Şekil 4-27). Ovaryumlarda bulunan çok sayıda KL, bu grupta da ovulasyonda herhangi bir düzensizliğin olmadığını göstermekteydi (Şekil 4-23, Şekil 4-24).



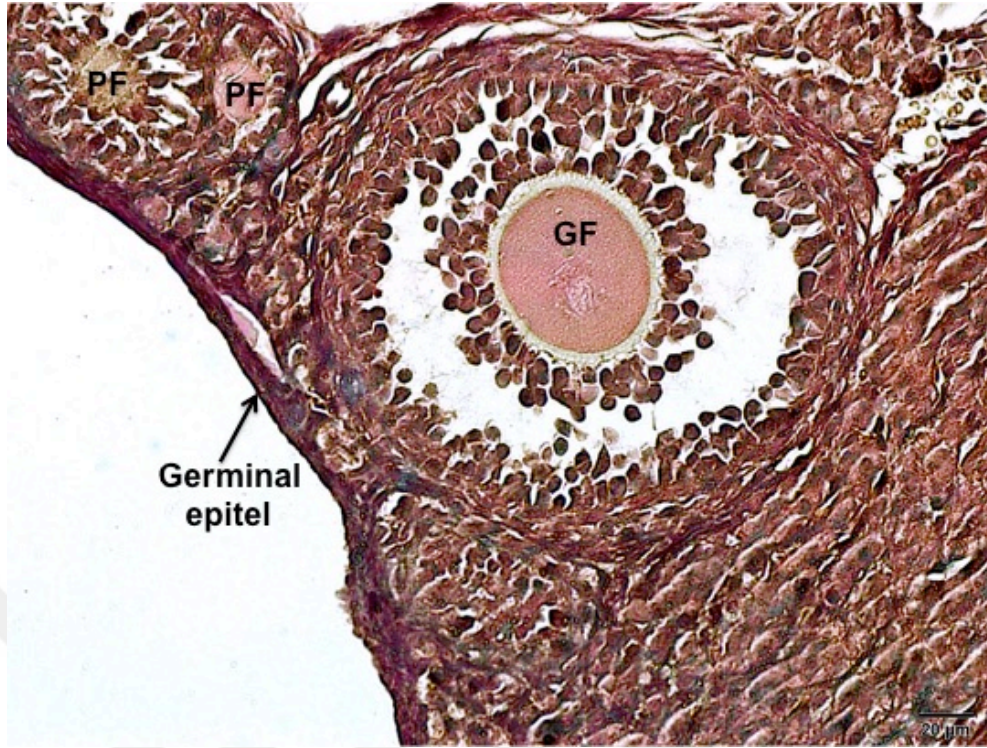
Şekil 4-23: SY grubuna ait ovaryumlardan kesitler. PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; GF: Graaf folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum. (H&E; A,C,E x10, B,D,F x20).



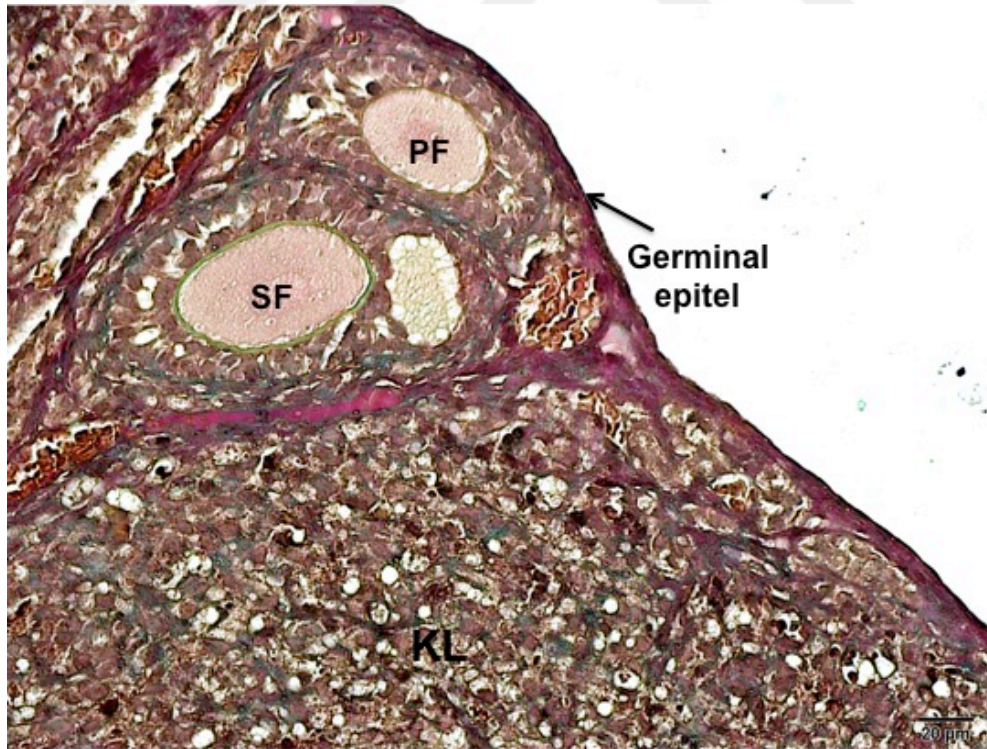
Şekil 4-24: SY grubuna ait ovaryum yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum; Siyah dikdörtgen: Şekil 4-18'de büyütülen alan. (Masson'un trikrom boyası, x10).



Şekil 4-25: Şekil 4-17'de siyah çerçeve içindeki alanı gösteren resim. PF: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; ZP: Zona pellusida (Masson'un trikrom boyası, x40).

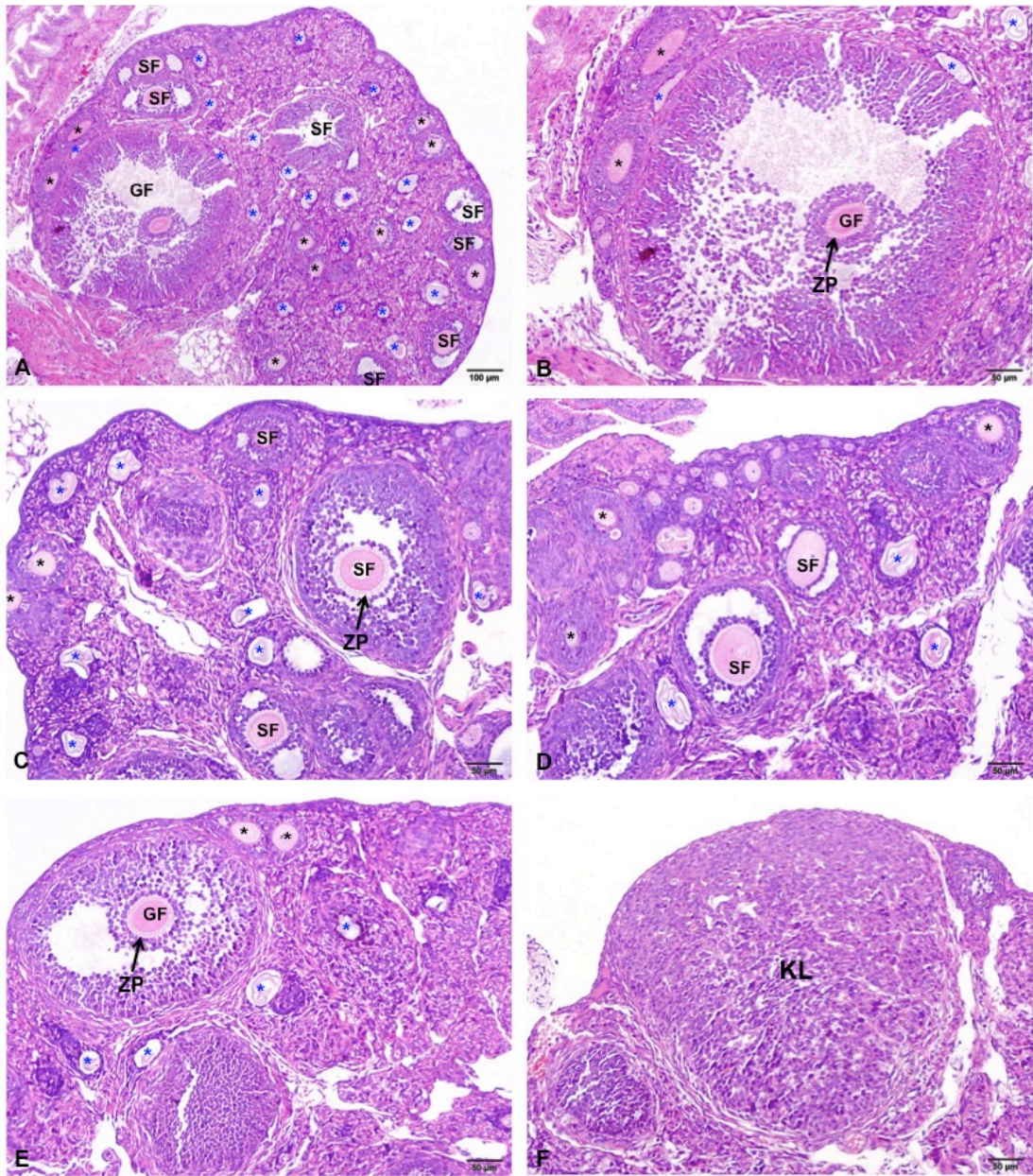


Şekil 4-26: SY grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. GF: Graaf folikül; (PF): Primer folikül. (Masson'un trikrom boyası, x40).

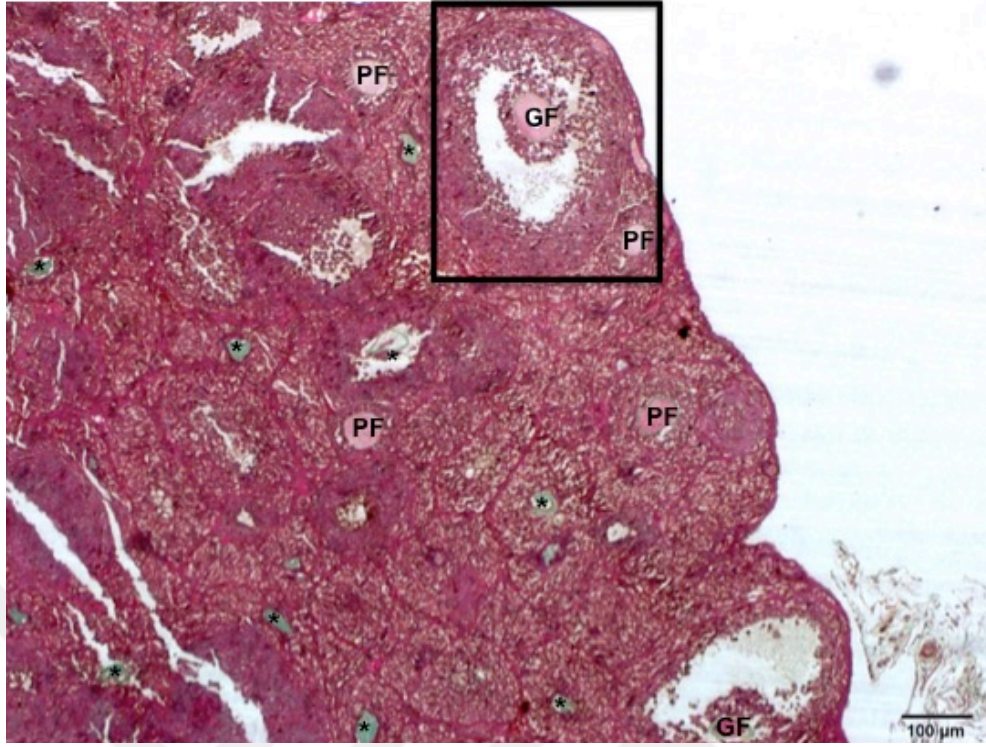


Şekil 4-27: SY grubuna ait bir KL'un yapısını gösteren resim. (PF): Primer folikül; (SF): Sekonder folikül; (KL): Korpus luteum. (Masson'un trikrom boyası, x40).

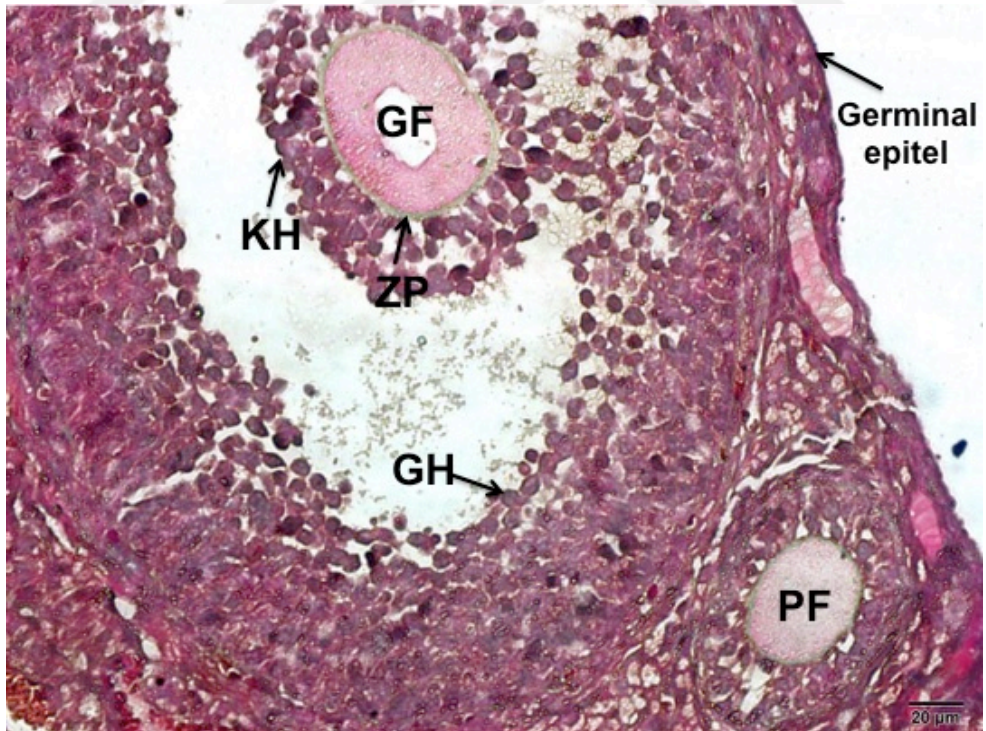
DMSO grubundaki hayvanların ovaryumları histolojik olarak incelendiğinde, genellikle normal bir görünüm sergiliyordu (Şekil 4-28). Gelişimin farklı evrelerinde, çok sayıda normal görünümlü ovaryan folikül izlendi (Şekil 4-28, 4-29). Ancak sekonder ve Graaf foliküllerde bulunan ZP’larda hafif dejenerasyonlar görüldü (Şekil 4-28 B,C,E, 4-30, 4-31, 4-32). GH’leri ve TH’leri normal görünümlüydü (Şekil 4-30, 4-31, 4-32). Ovaryumlarda KL’un bulunması, ovulasyonda herhangi bir düzensizliğin olmadığını kanıtladı (Şekil 4-28,F). Ovaryumu çevreleyen germinal epitel düzgün görünümlüydü (Şekil 4-30). Ovaryum stroması normalden daha ödematöz görünüyordu (Şekil 4-31).



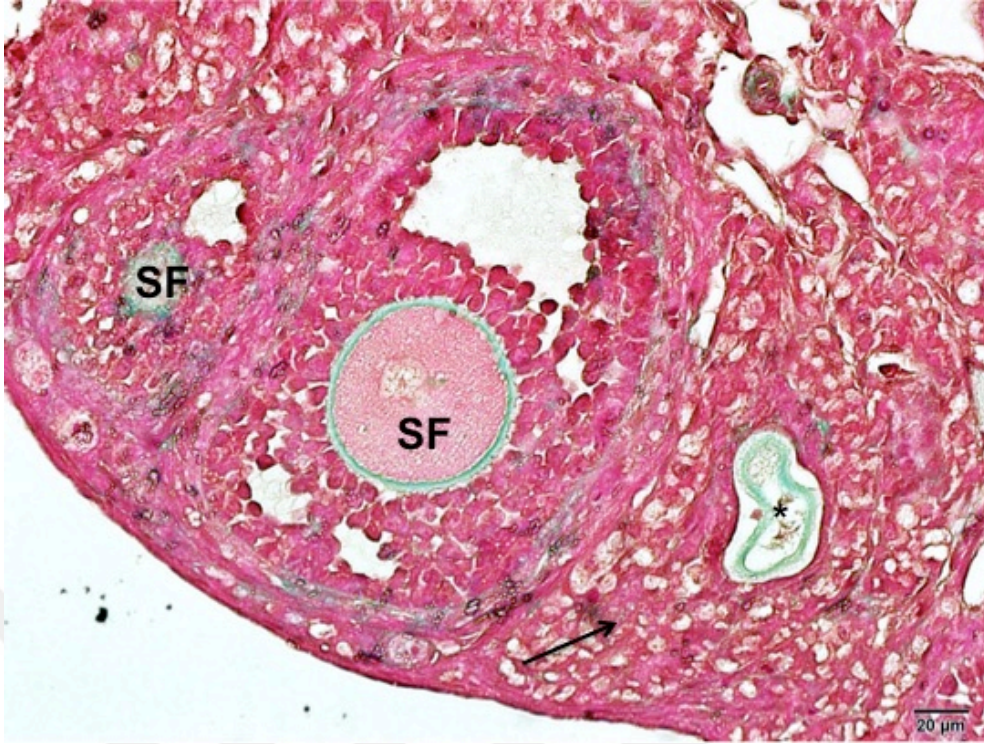
Şekil 4-28: DMSO grubuna ait ovaryum kesitleri. Siyah yıldız: Primer folikül; SF: Sekonder folikül; GF: Graaf folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum; ZP: Zona pellusida. (H&E; A,x10; B,C,D,E x20; Fx40).



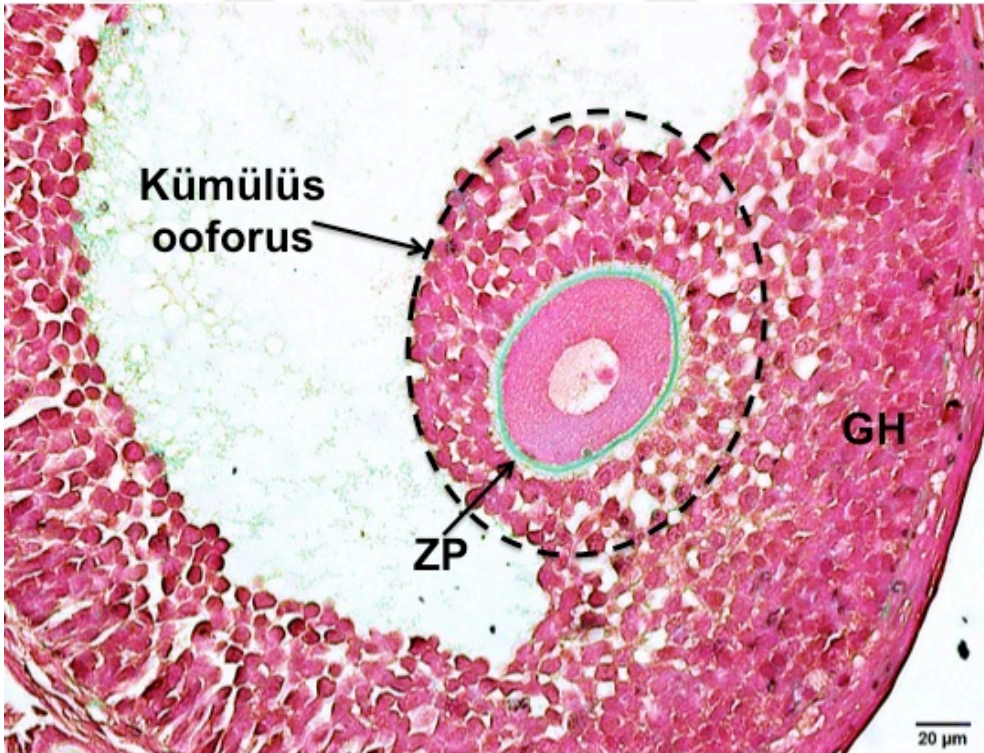
Şekil 4-29: DMSO grubuna ait ovaryum yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; GF: Graaf folikül; Siyah yıldız: Atritik folikül; Siyah dikdörtgen: Şekil 4-23'de büyütülen alan. (Masson'un trikrom boyası, x10).



Şekil 4-30: DMSO grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; GF: Graaf folikül; KH: Kümüls hücreleri; GH: Granuloza hücreleri; ZP: Zona pellusida (Masson'un trikrom boyası, x40).



Şekil 4-31: DMSO grubuna ait Sekonder foliküllerin yapısını gösteren resim. SF: Sekonder folikül; Siyah yıldız: Atretik folikül; Siyah ok: Ödematöz stroma. (Masson'un trikrom boyası, x40).

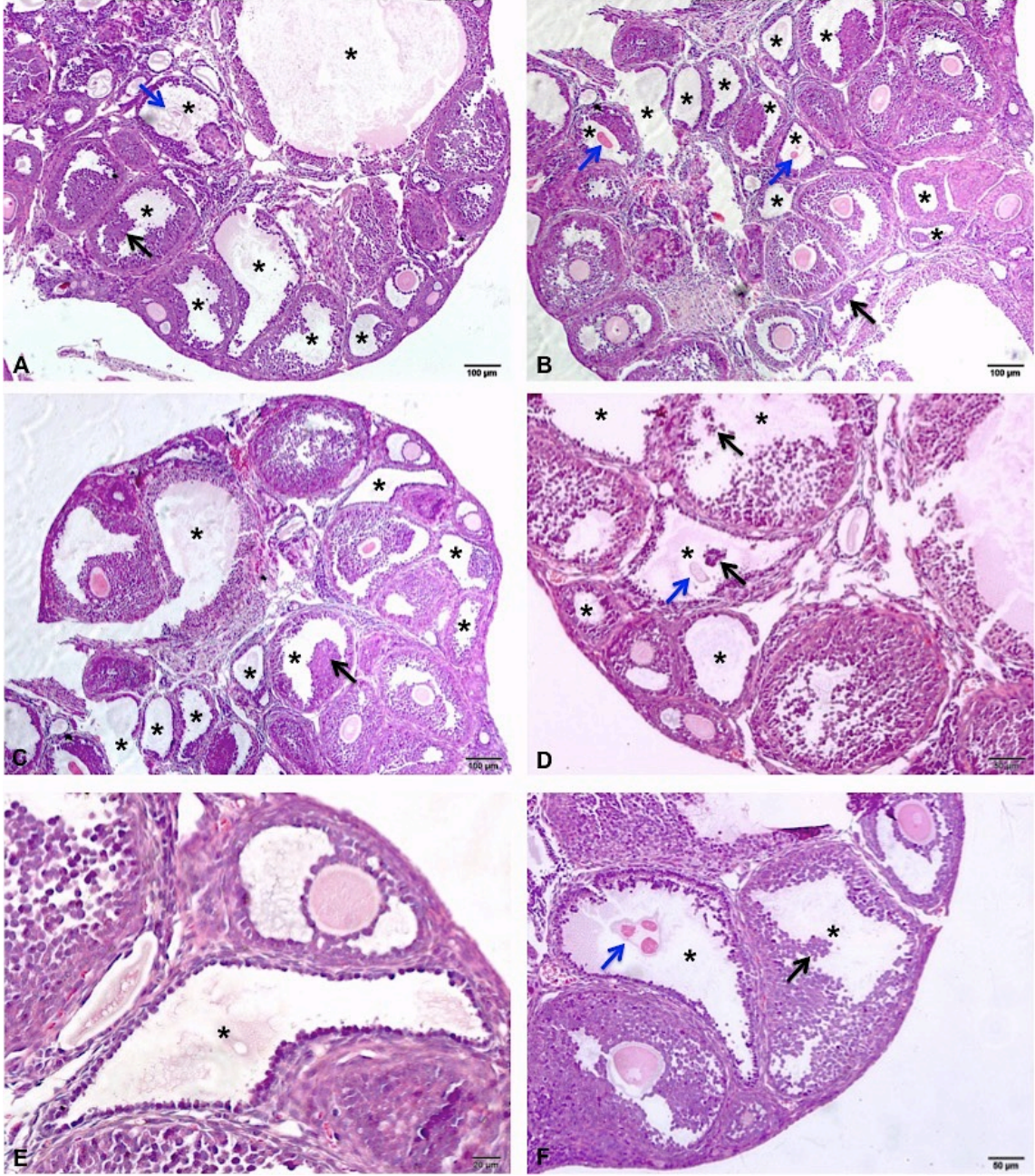


Şekil 4-32: DMSO grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. GH: Granuloza hücreleri; ZP: Zona pellusida (Masson'un trikrom boyası, x40).

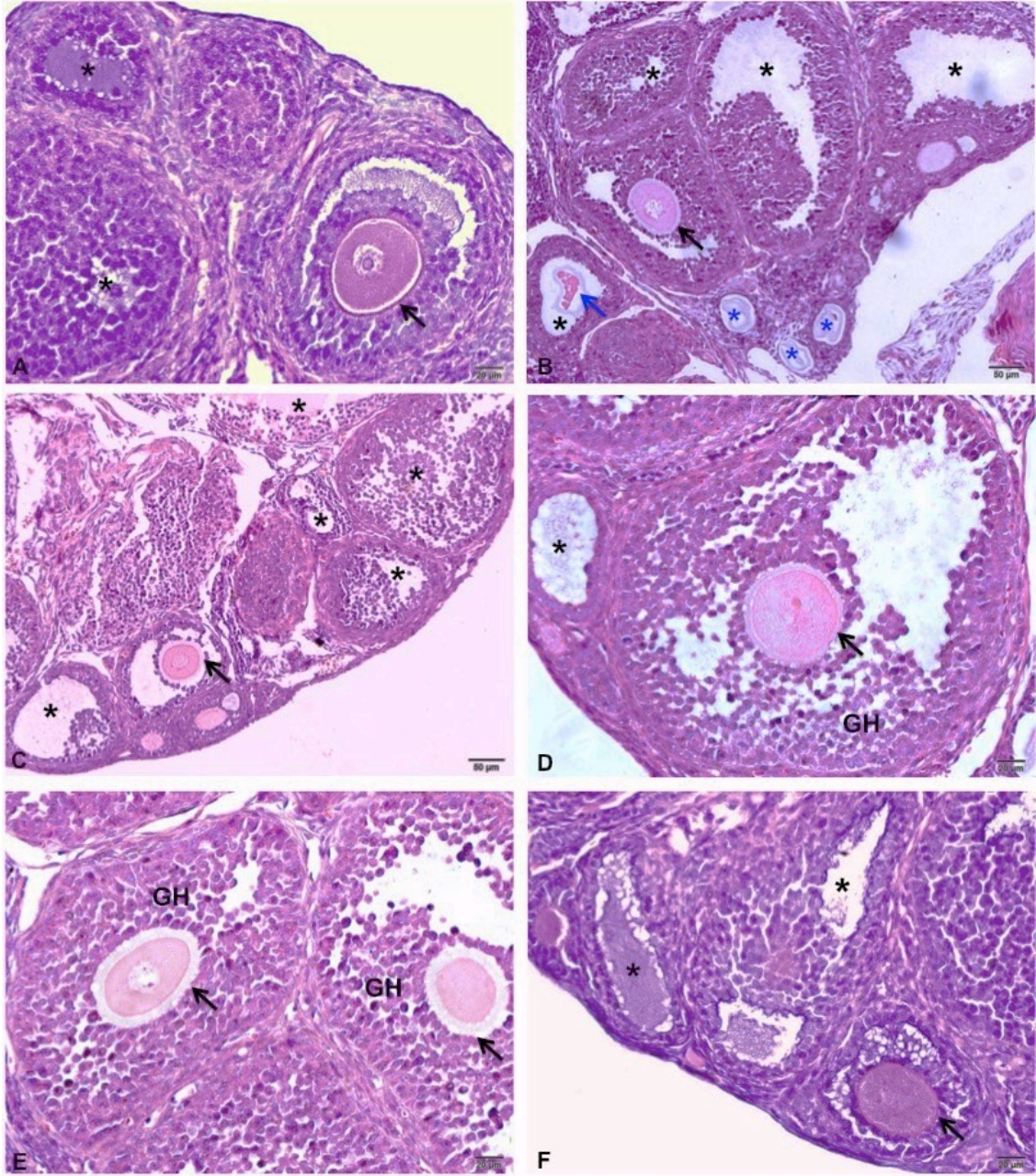
PKOS grubundaki hayvanların ovaryumları histolojik olarak incelendiğinde, gelişimin farklı evrelerindeki ovaryan foliküllerin yanısıra çok sayıda içi sıvı dolu kistik folikül yapısı gözlemlendi (Şekil 4-33, 4-34, 4-36). Ovaryan foliküllerde bulunan primer oositler ve oositi çevreleyen ZP'lar oldukça dejeneratifti (Şekil 4-34, 4-37, 4-38, 4-40B). Oositler genellikle ZP'dan ayrılmış ve ZP'lar düzgün yapılarını kaybederek gevşek ve yer yer dilate bir yapı sergilemekteydi (Şekil 4-34, 4-37, 4-38, 4-39B).

GH'leri genellikle birbirlerinden ayrılmış ve aralarında boşluklar oluşmuştu (Şekil 4-34D,E, Şekil 4-37, 4-38, 4-39). Ayrıca çoğu GH'si apoptotik olduğu düşüncesi veren piknotik nukleuslara sahipti (Şekil 4-38). Gelişimini tamamlayamayan atreziye uğrayan folikül sayısı, kontrol grubuna göre oldukça fazlaydı. Gelişimini tamamlayamayan bu foliküllerin bir kısmı ise, 1-2 sıra GH'si ile çevrelenmiş, içi sıvı dolu ve genellikle oositlerini kaybeden kistik folikülleri oluşturuyordu (Şekil 4-33, 4-36). Bazı kistik foliküllerin içinde dejeneratif oositler görüldü (Şekil 4-33D,F, Şekil 37). Ayrıca yine bazı kistik foliküllerde lümeneye dökülmüş GH'leri dikkat çekti (Şekil 4-33D,F; Şekil 4-37).

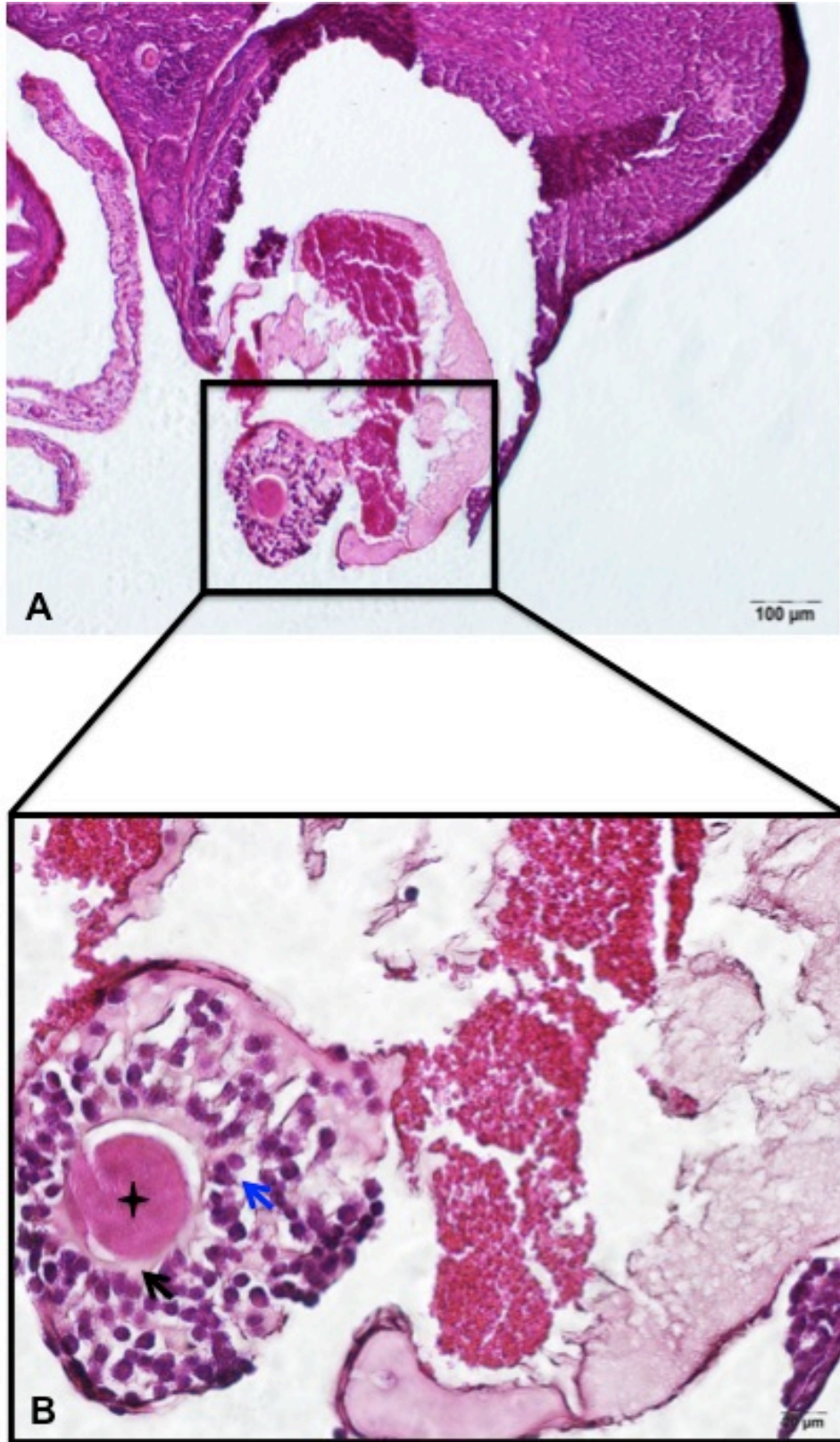
Ovaryumlarda ya tek tük KL görülmesi ya da hiç görülmemesi, bu gruptaki hayvanlarda anovulasyon ya da oligoovulasyon olduğunun göstergesi olarak kabul edildi (Şekil 4-39). Ayrıca ovule edilen oositler de son derece dejeneratifti (Şekil 4-35). Ovaryum stroması hiperplazik ve ödematöz bir yapı sergiliyordu (Şekil 4-34C, Şekil 4-37).



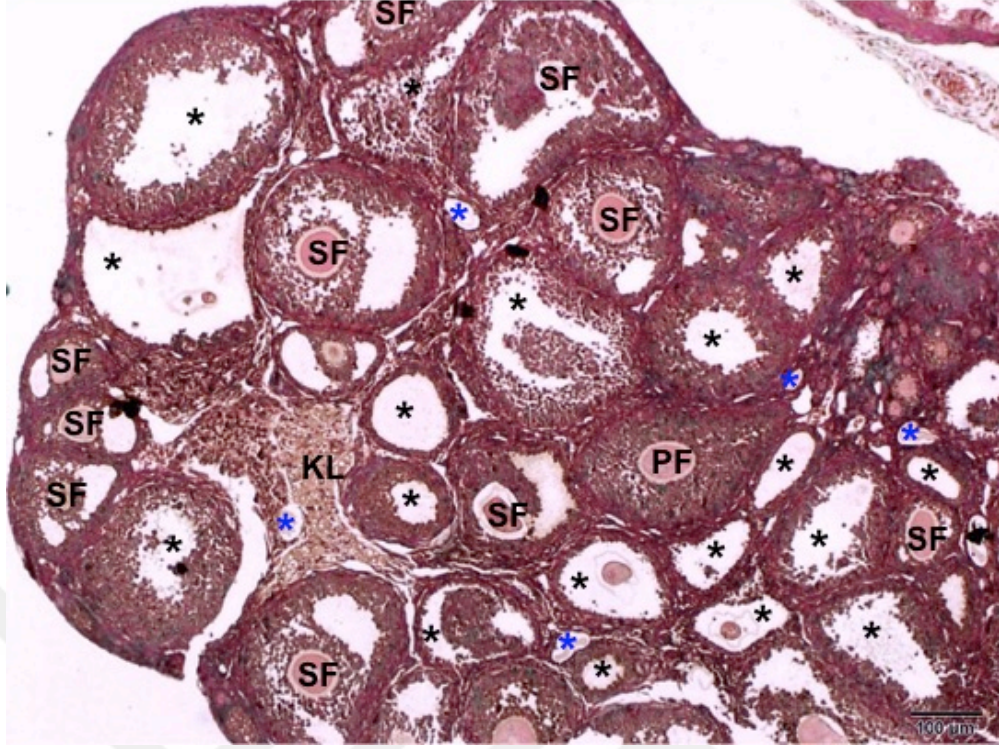
Şekil 4-33: PKOS grubuna ait ovaryumlardan kesitler. Siyah yıldız: Kistik foliküller; Siyah ok: Kistik foliküllerin lümenine dökülen GH'leri; Mavi ok: Kistik foliküllerin içerisindeki dejeneratif oositler. (H&E; A,B,C x10; D,F x20; E x40).



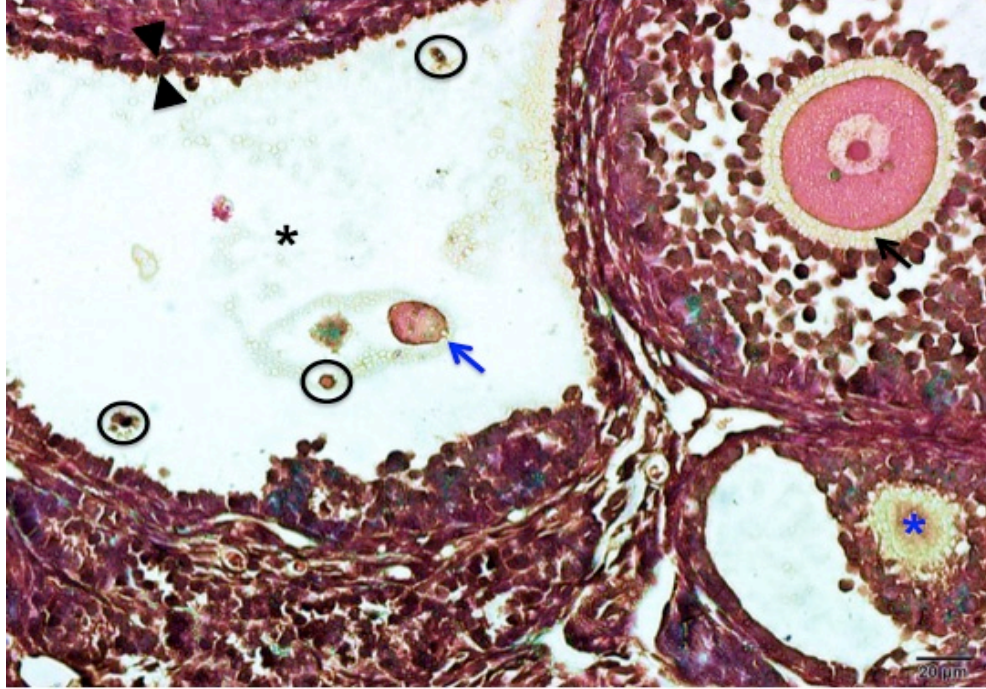
Şekil 4-34: PKOS grubuna ait foliküllerden kesitler. Siyah yıldız: Kistik foliküller; Mavi yıldız: Atretik foliküller; Siyah ok: Dejenere olan ZP'lar; Mavi ok: Kistik foliküllerin içerisindeki dejeneratif oositler; GH: Granüloza hücreleri. (H&E; A,B,C x20; D,E,F x40).



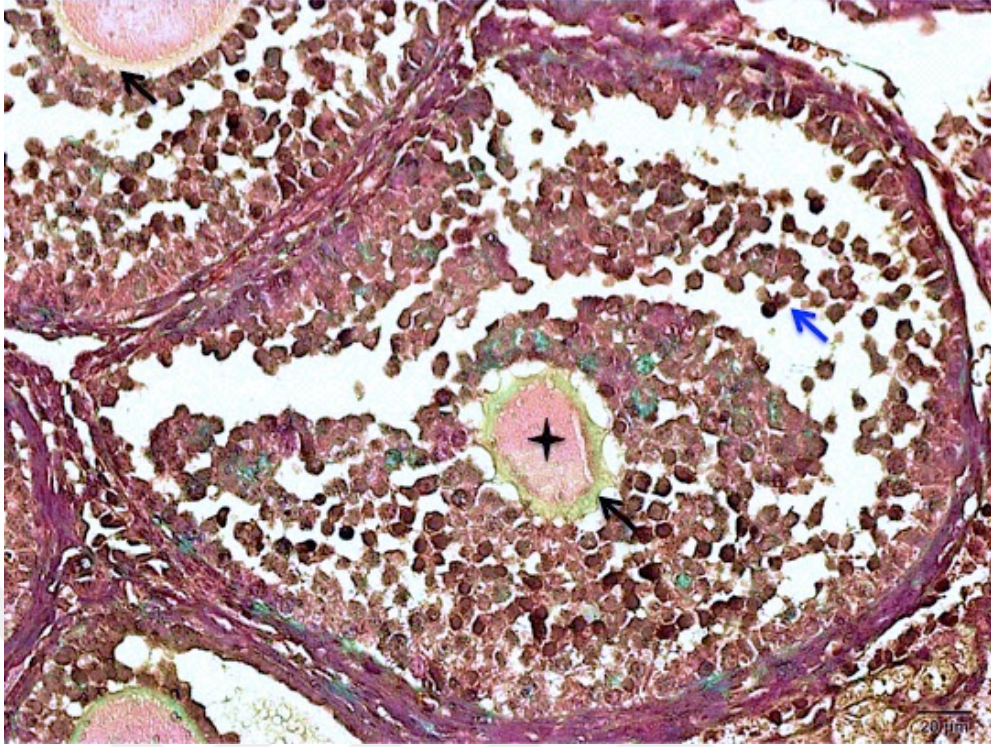
Şekil 4-35: A: PKOS grubuna ait bir ovaryumdan ovule edilen bir oosit. B: A şeklinde dikdörtgen içerisindeki alanın büyütülmüş hali. Siyah yıldız: Dejenere oosit. Siyah ok: bütünlüğünü kaybetmiş ve dejenere olmuş ZP; Mavi ok: Oosit ile birlikte atılan, genellikle piknotik nukleuslu olan kümülüs hücreleri. (Masson'un trikrom boyası; A x10; B x40).



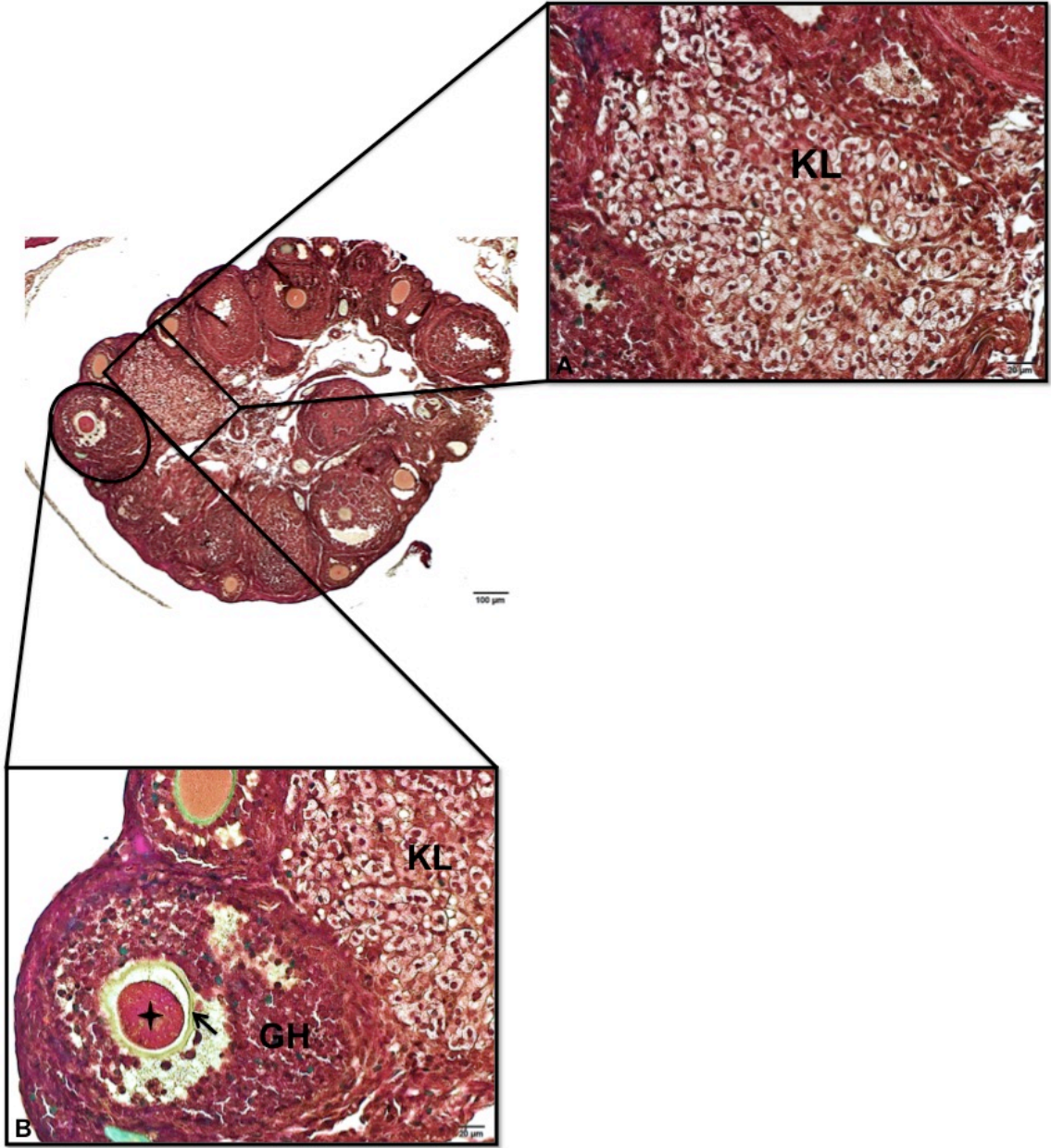
Şekil 4-36: PKOS grubuna ait ovarium yapısını gösteren resim. PF: Primer folikül; SF: Sekoder folikül; Siyah yıldız: Kistik folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül (Masson'un trikrom boyası, x10).



Şekil 4-37: PKOS grubuna ait kistik bir folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Kistik folikül; Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi ok: Kistik folikül içerisindeki dejenere oosit; Mavi yıldız: Sekonder folikül içerisindeki dejenere oosit; Siyah daireler: Kistik folikül içerisine dökülmüş olan GH'leri; Çift başlı ok: Kistik folikülü çevreleyen incelmış GH tabakası (Masson'un trikrom boyası, x40).



Şekil 4-38: PKOS grubuna ait bir Graaf folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi ok: Birbirinden ayrılmalar gösteren GH'leri. (Masson'un trikrom boyası, x40).



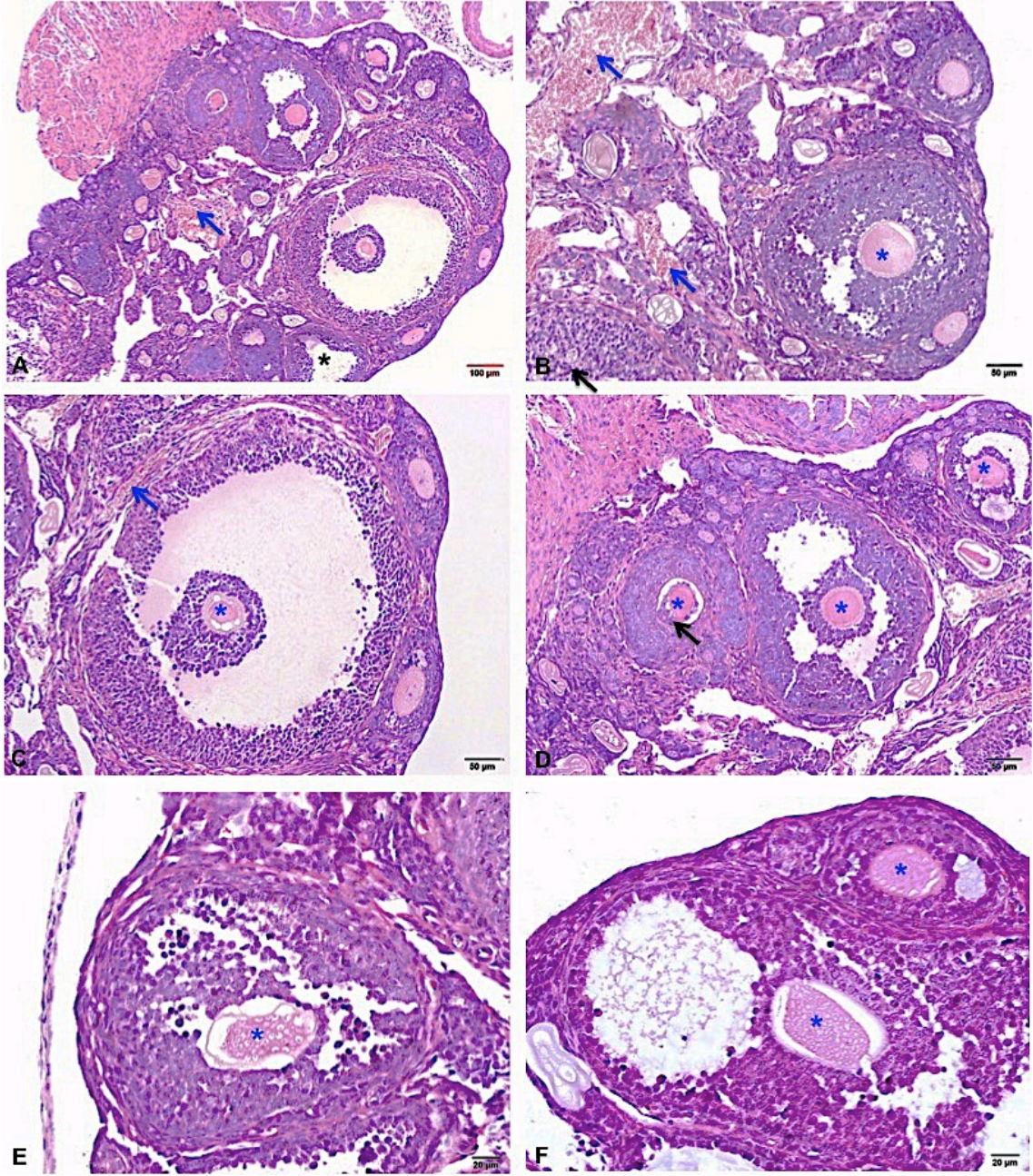
Şekil 4-39: PKOS grubuna ait bir ovaryumun yapısını gösteren resim. A: Siyah dikdörtgen içerisindeki alanın büyütülmüş resmi. Nadiren de olsa görülen bir KL'un oldukça açık renkli sitoplazmaya sahip olan lutein hücreleri dikkat çekici. B: Siyah daire içerisindeki bir sekonder folikülün büyütülmüş resmi. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; GH: Birbirinden ayrılmalar gösteren ve genellikle piknotik nükleuslara sahip olan GH'leri. (Masson'un trikrom boyası, Küçük resim x10; Ax40; Bx40).

PKOS+İNİH grubundaki hayvanların ovaryumları histolojik olarak incelendiğinde, PKOS grubuna kıyasla daha az olsa da kistik foliküller, gelişimin farklı evrelerindeki foliküllere eşlik ediyordu (Şekil 4-41, 4-42, 4-43, 4-44).

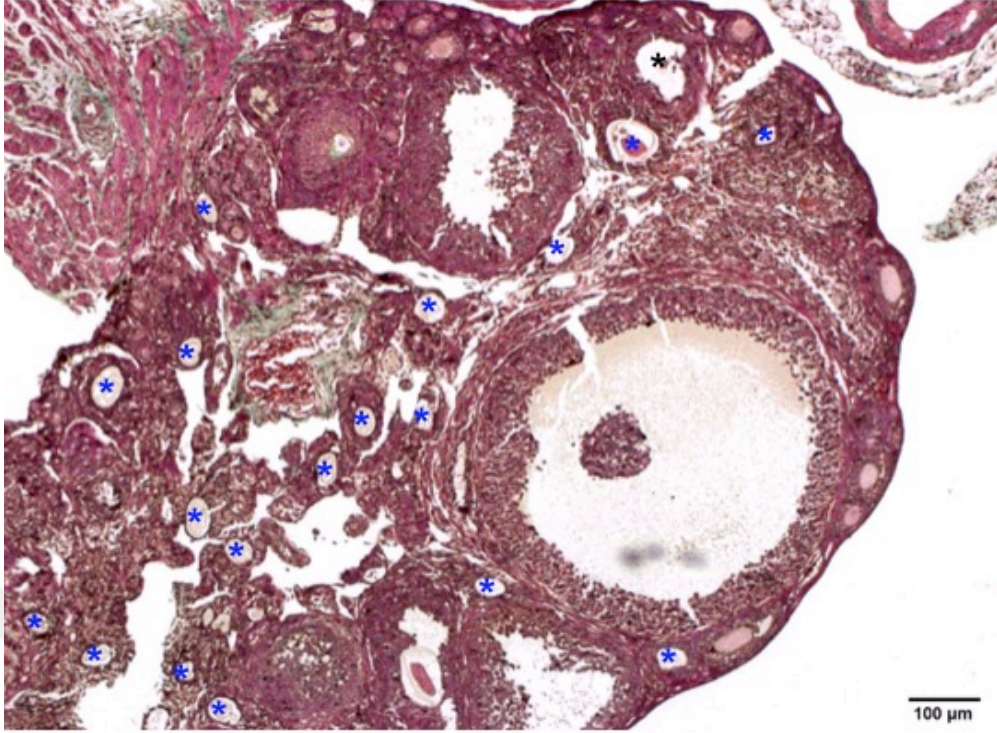
Özellikle sekonder ve Graaf foliküllerde bulunan neredeyse bütün primer oositler ve bu oositleri çevreleyen ZP'lar oldukça dejeneratifti (Şekil 4-40, 4-44, 4-45B ve C). Oositler, ZP ile bağlantılarını neredeyse tamamen kaybetmişti ve ZP'ların düzgün yapıları yok olmuştu (Şekil 4-40, 4-44, 4-45B ve C).

Bazı foliküllerde, ZP'dan infiltre olmuş makrofaj benzeri hücreler dikkat çekiciydi (Şekil 4-40D). Birbirinden ayrılmış GH'leri arasında boşluklar oluşmuştu (Şekil 4-40E ve F, 4-44, 4-45C.). Atretik foliküllerin sayısı, kistik folikül sayısının azalmasıyla ilişkili olarak oldukça fazlaydı (Şekil 4-41).

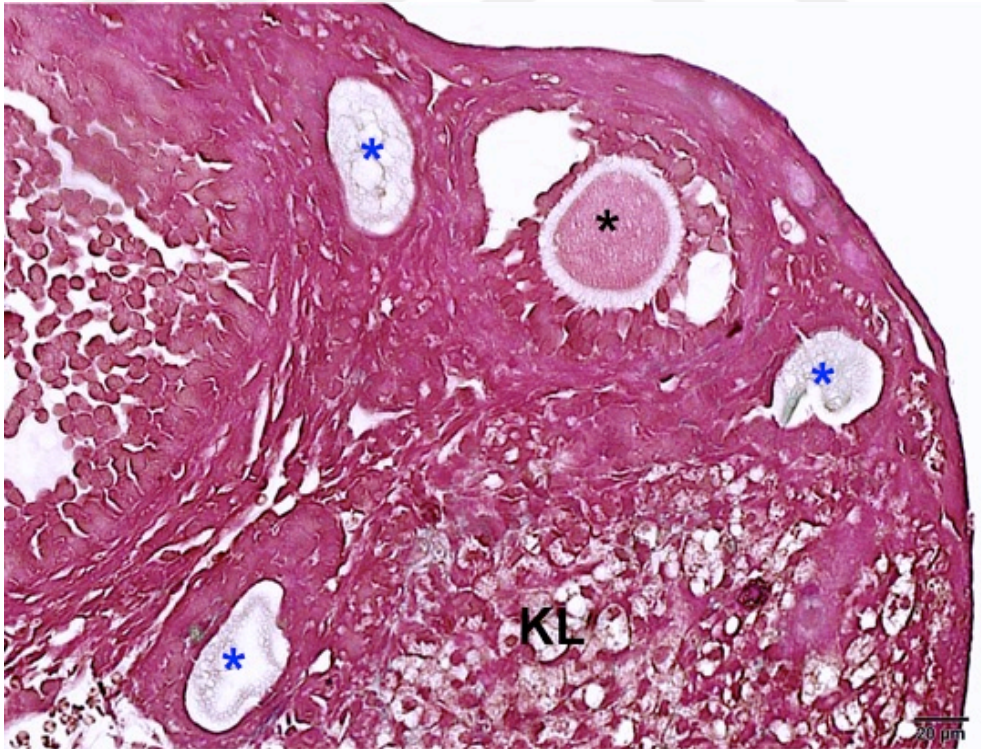
Ovaryumlarda az sayıda da olsa KL görüldü (Şekil 4-42). Ovaryum stromasının, PKOS grubuna kıyasla daha hiperplazik ve ödematöz bir yapı sergilemesinin yanı sıra, teka tabakasında ve stromada bulunan kan damarları fazlasıyla dilate olmuştu (Şekil 4-40 A,B,C,D).



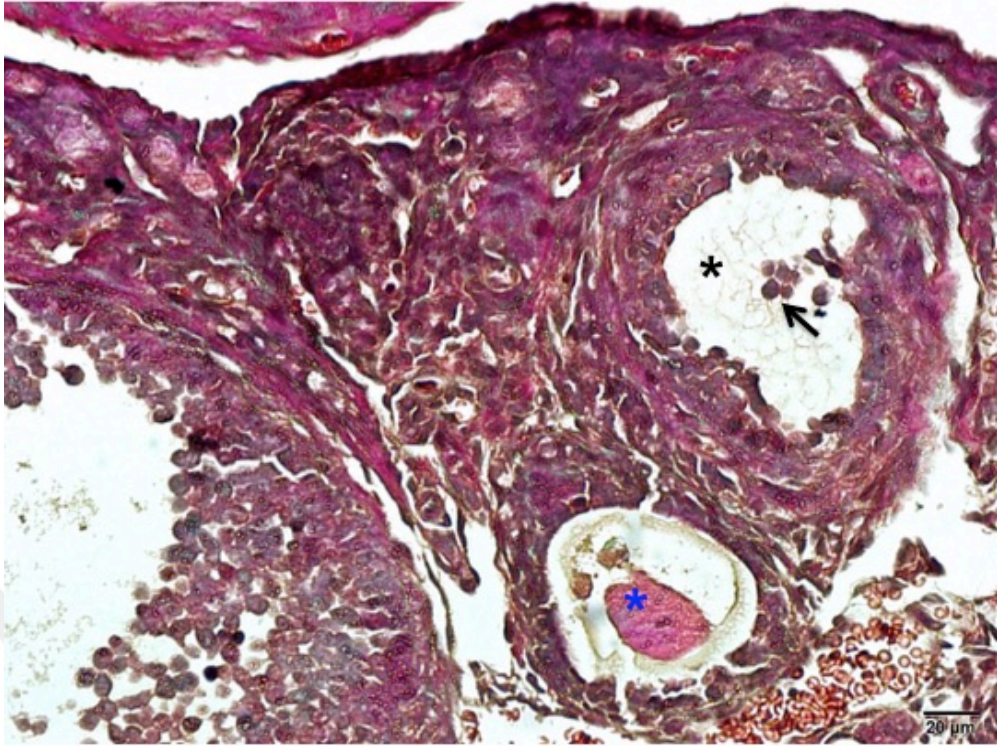
Şekil 4-40: PKOS+İNH grubuna ait foliküllerden kesitler. Siyah yıldız: Kistik foliküller; Mavi yıldız: Dejeneratif oositler; Siyah ok: ZP'dan infiltre olan makrofaj benzeri hücreler; Mavi ok: Dilate kan damarları. (H&E; A,B x10; C,D x20; E,F x40).



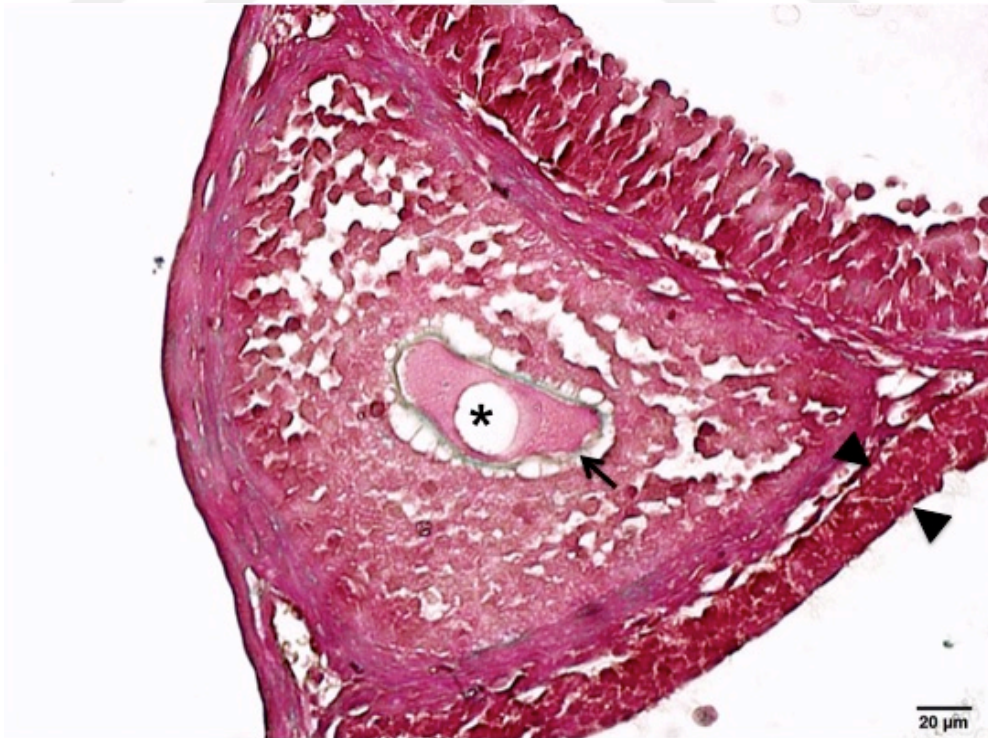
Şekil 4-41: PKOS+İNH grubuna ait bir ovaryumun yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Kistik folikül; Mavi yıldız: Atretik folikül (Masson'un trikrom boyası, x10).



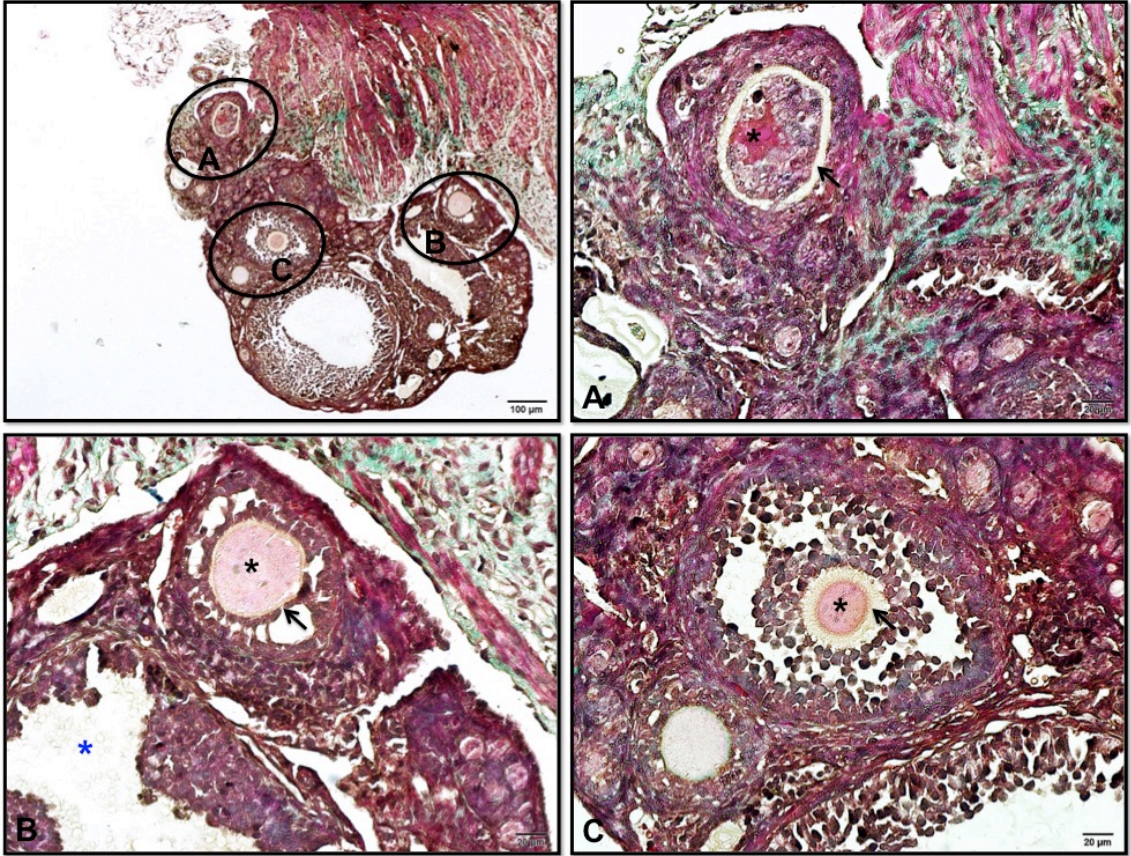
Şekil 4-42: PKOS+İNH grubuna ait bir sekonder folikülün ve KL'nin yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Mavi yıldız: Atretik folikül; KL: Korpus luteum. (Masson'un trikrom boyası, x40).



Şekil 4-43: PKOS+İNH grubuna ait kistik bir folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Kistik folikül; Siyah ok: Kistik folikül içerisine dökülmüş olan GH'leri; Mavi yıldız: Atretik folikül (Masson'un trikrom boyası, x40).



Şekil 4-44: PKOS+İNH grubuna ait kistik ve sekonder bir folikülün yapısını gösteren resim. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; Çift başlı ok: Kistik folikülü çevreleyen incelmış GH tabakası (Masson'un trikrom boyası, x40).

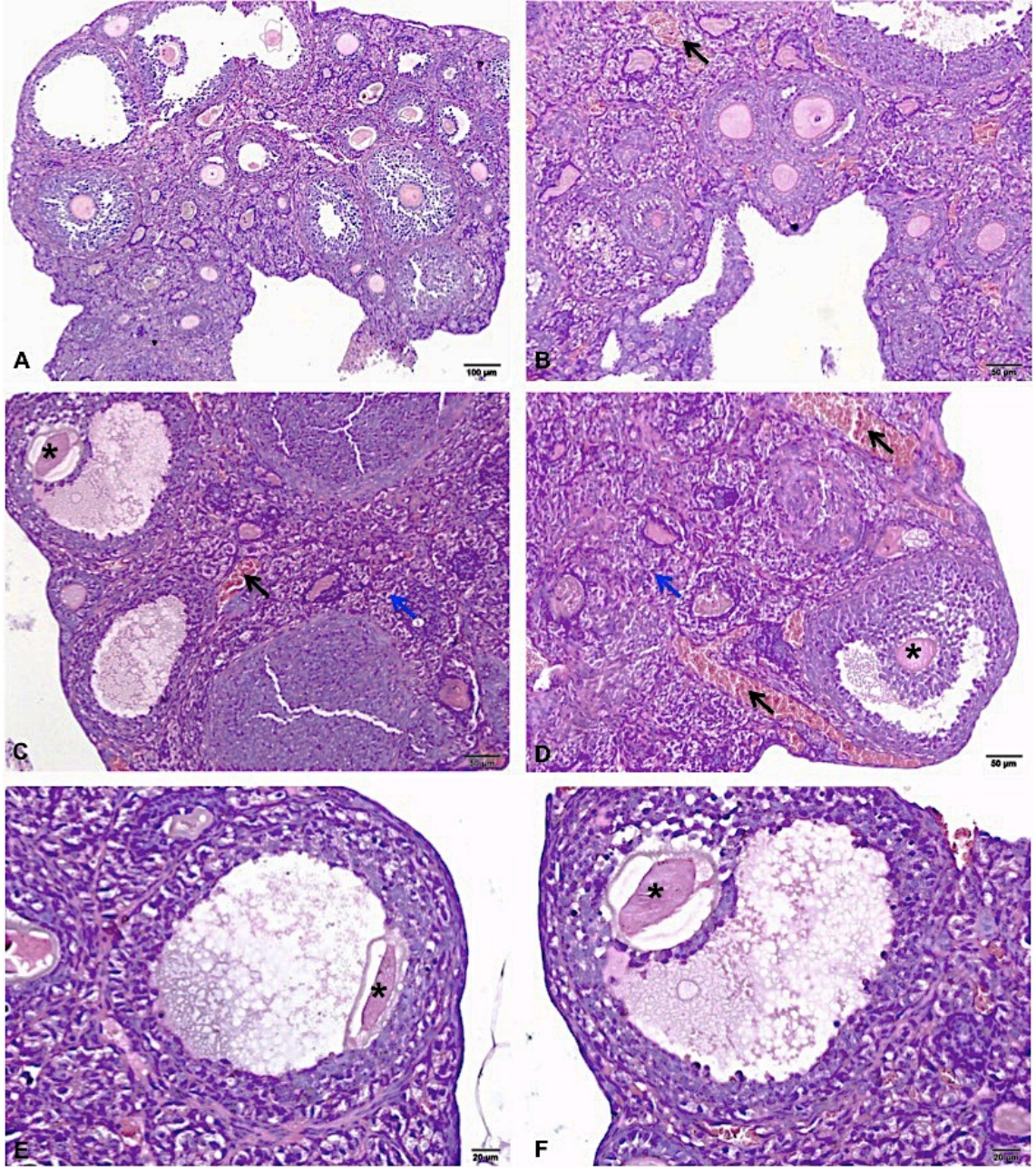


Şekil 4-45: PKOS+İNH grubuna ait bir ovaryumun yapısını gösteren resim. A: Siyah A dairesi içerisindeki alanın büyütülmüş resmi. Primer bir folikül içerisinde, oldukça fazla dejenerasyona uğramış olan oosit ve ZP dikkat çekici . B: Siyah B dairesi içerisindeki bir sekonder ve kistik folikülün büyütülmüş resmi. C: Siyah C dairesi içerisindeki foliküllerin büyütülmüş resmi. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi yıldız: Kistik folikül. (Masson'un trikrom boyası; Küçük resim x10; Ax40; Bx40; Cx40).

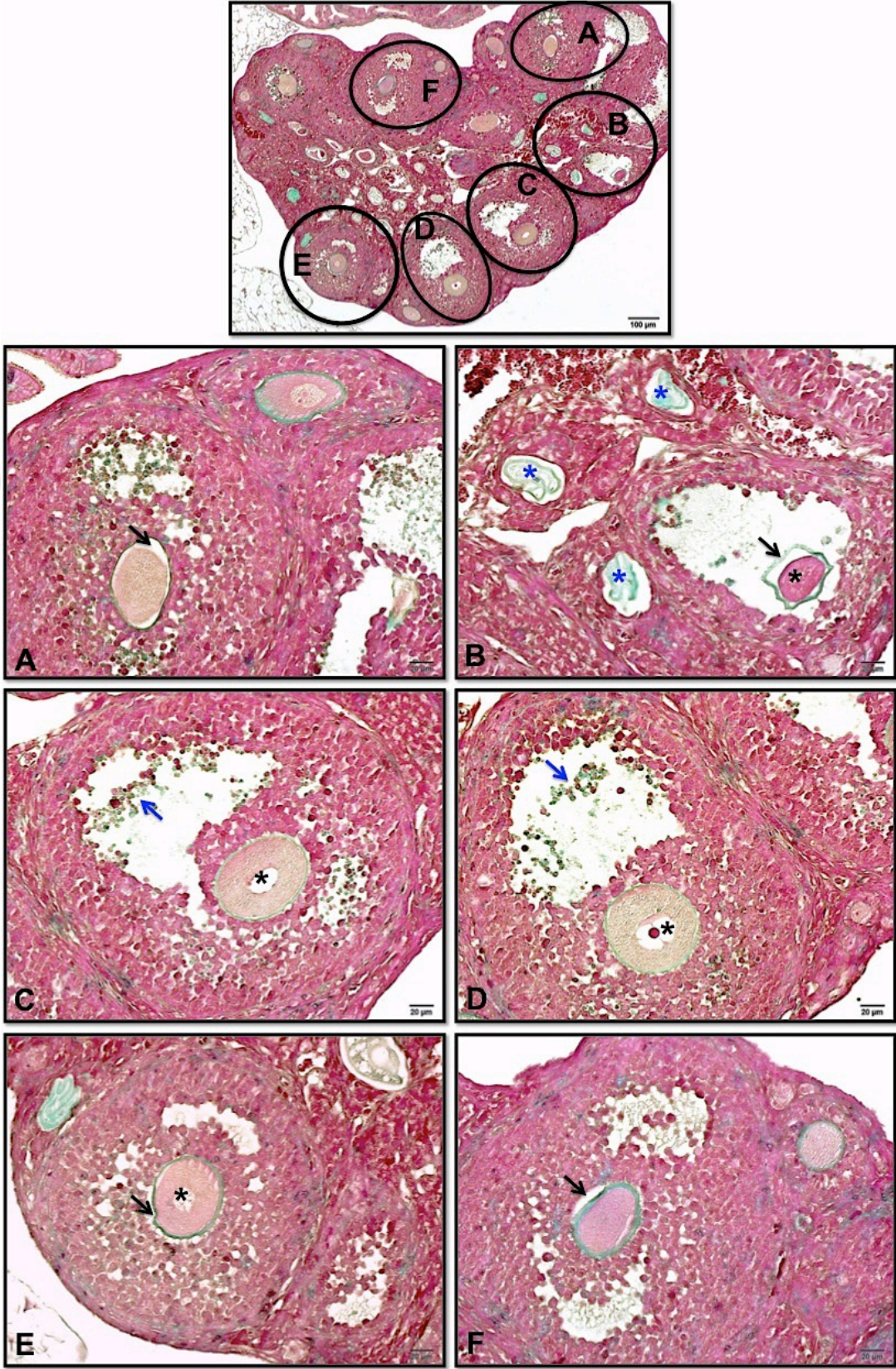
İNH grubundaki hayvanların ovaryumları histolojik olarak incelendiğinde, gelişimin farklı evrelerindeki foliküllere eşlik eden çok sayıda Graaf folikülün bulunması dikkat çekiciydi (Şekil 4-46, 4-47). Bu Graaf foliküllerde bulunan primer oositlerin hemen hepsi ve bu oositleri çevreleyen ZP'lar dejenerasyona uğramıştı (Şekil 4-46, 4-47, 4-48). Bunların yanısıra çoğu primer ve sekonder folikülde bulunan primer oositler de dejeneratif figürler sergiliyordu (Şekil 4-49, 4-50, 4-51).

Atreziye uğrayan foliküllerin sayısı, oldukça fazlaydı (Şekil 4-50, 4-51). Bu gruba ait hayvanların ovaryumlarında neredeyse hiç KL görülmedi. Vajinal smear değerlendirmesinde, bu gruptaki hayvanların hiç östrus fazı sergilememesi de bu bulguyu destekleyici nitelikteydi.

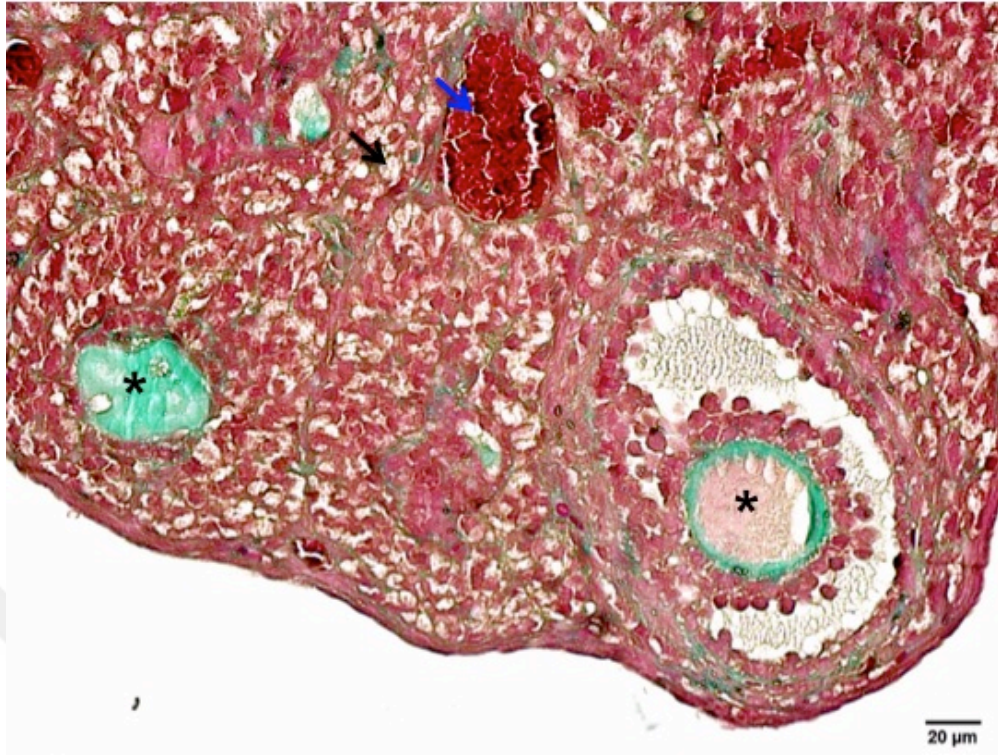
Ovaryum stroması, PKOS+İNH grubundaki gibi hiperplazik ve ödematöz bir yapı sergilerken, teka tabakasında ve stromada bulunan kan damarları da aynı şekilde dilateydi (Şekil 4-46, 4-48, 4-49, 4-50).



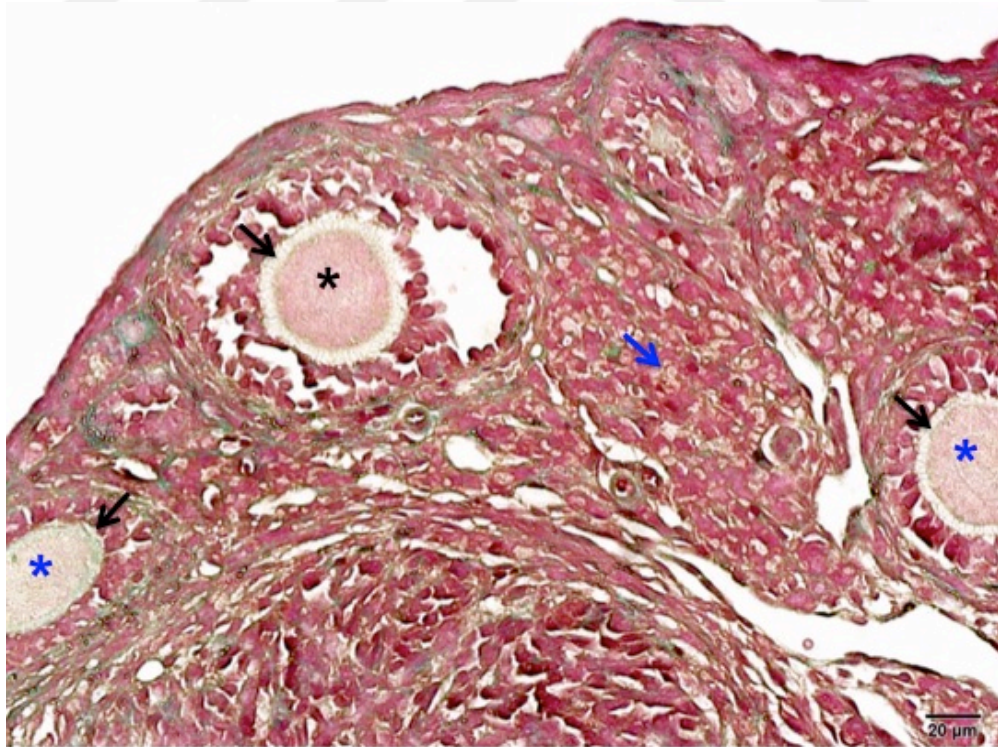
Şekil 4-46: İNH grubuna ait ovaryumlardan ve bu ovaryumlara ait foliküllerden kesitler. Siyah yıldız: Dejeneratif oositler; Mavi ok: Ödematöz stroma; Siyah ok: Dilate kan damarları. (H&E; A,B x10; C,D x20; E,F x40).



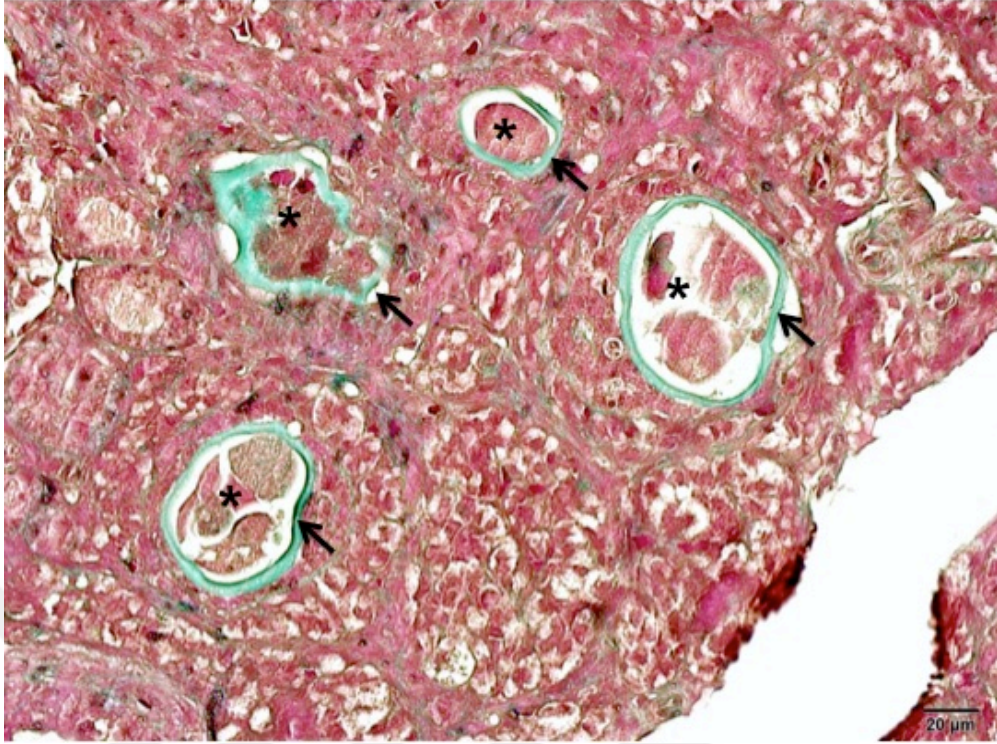
Şekil 4-47: İNH grubuna ait bir ovaryumun ve bu ovaryumdaki Graaf foliküllerin yapısını gösteren şekil. A,E ve F: Dejeneratif bir primer oosit ve bozuk yapıya sahip ZP içeren sekonder foliküller. B,C,D: Antrumlarında dökülmüş GH'leri içeren ve dejeneratif primer oositler içeren Graaf foliküller. Siyah yıldız: Dejenere oosit; Mavi yıldız: Atretik folikül. Siyah ok: Dejenere ZP; Mavi ok: Dökülmüş GH'leri. (Masson'un trikrom boyası; Küçük resim x10; Ax40; Bx40; Cx40; Dx40; Ex40; Fx40).



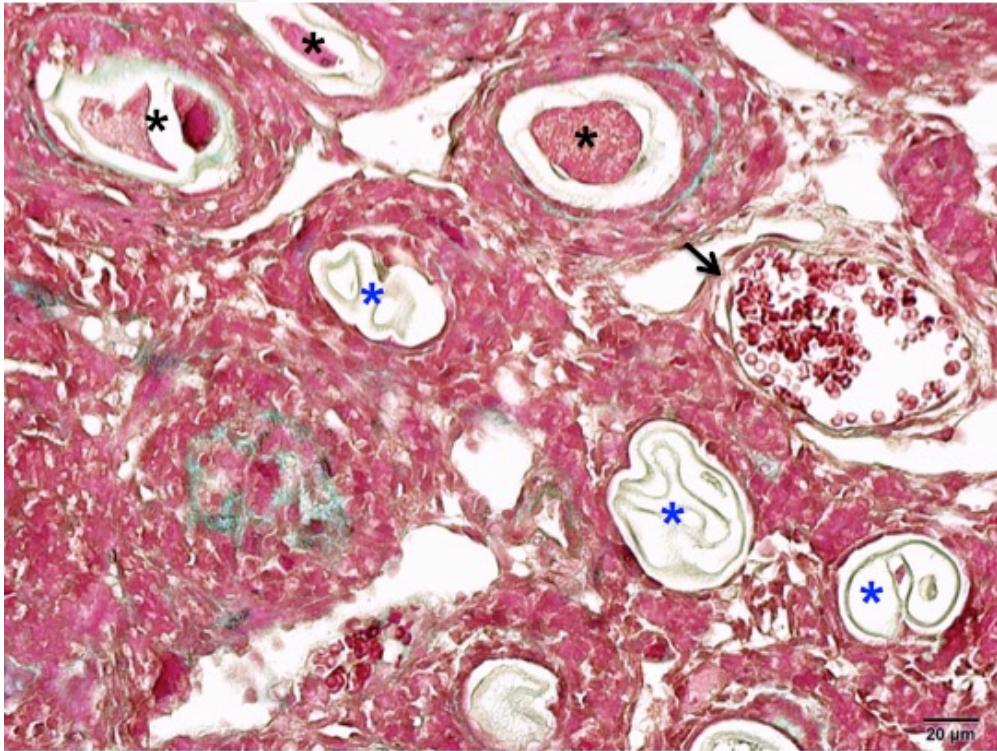
Şekil 4-48: İNH grubundaki bir ovaryumdaki çeşitli foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Dejeneratif oositler; Mavi ok: Dilate kan damarları;; Siyah ok: Ödematöz stroma. (Masson'un trikrom boyası, x40).



Şekil 4-49: İNH grubundaki bir ovaryumdaki primer ve sekonder foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Sekonder foliküldeki dejeneratif oosit; Mavi yıldız: Primer foliküllerdeki dejeneratif oositler; Mavi ok: Ödematöz stroma; Siyah ok: Dejenere ZP. (Masson'un trikrom boyası, x40).



Şekil 4-50: İNH grubundaki bir ovaryumda atreziye giden foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Dejeneratif oosit; Siyah ok: Dejeneratif ZP. (Masson'un trikrom boyası, x40).



Şekil 4-51: İNH grubundaki bir ovaryumda atreziye giden foliküllerin yapısını gösteren şekil. Siyah yıldız: Dejeneratif oosit; Mavi yıldız: Atretik folikül; Siyah ok: Dilate kan damarı. (Masson'un trikrom boyası, x40).

4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Deney gruplarından alınan ovaryum kesitlerine uygulanan primer antikolar ile yapılan immün işaretlemenin ardından, hazırlanan preparatlardan x10 ve x40 büyütmede çekilen fotoğraflarda, kahverengi (DAB kromojen kullanıldı) reaksiyon veren hücreler, immün pozitif olarak kabul edildi. Olympus BX 61 marka ışık mikroskopunda, her bir doku örneğinden x40 büyütmede rastgele seçilen beş bölgede H-SCORE yöntemi ile yarı-kantitatif değerlendirme yapıldı. Örnekler, immünreaktivitelere göre immünohistokimyasal boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından iki farklı kişi tarafından 0-300 arasında değerler verildi ve bu değerlendirmeye göre istatistiksel olarak analiz yapıldı.

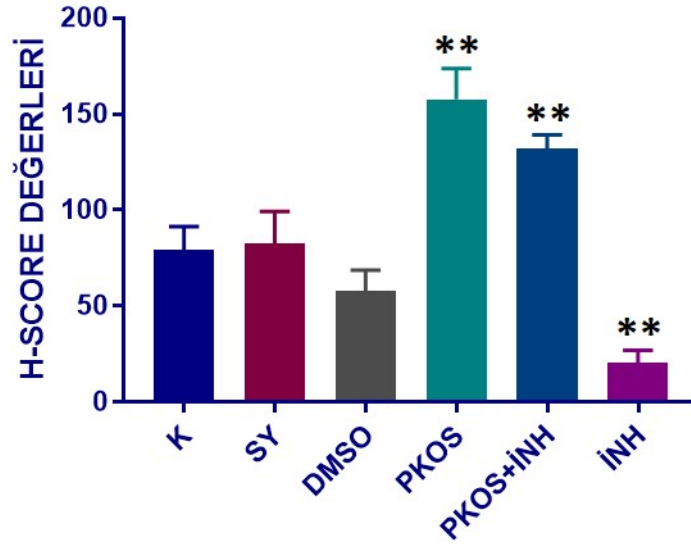
4.5.1. PCNA İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait ovaryum dokularındaki hücre proliferasyonunu göstermek için, PCNA proteinine yönelik immün işaretleme yöntemi kullanıldı. Tüm foliküllerdeki immün pozitif hücreler, semikantitatif H-SCORE yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4-52, Tablo 4-11). Negatif kontrol örneklerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi.

Bütün gruplardaki hayvanların ovaryum dokularındaki PCNA pozitif hücreler genel olarak değerlendirildiğinde, İNH grubundaki proliferatif hücrelerin, kontrol grubundaki proliferatif hücreler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenirken ($p \leq 0,001$); PKOS ve PKOS+İNH grubundaki proliferatif hücrelerin, kontrol grubundaki proliferatif hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği gözlendi ($p \leq 0,001$) (Şekil 4-52, 4-53, 4-54).

PKOS grubundaki proliferasyon, daha çok GH'lerinde artış göstermişken; PKOS+İNH grubundaki GH'lerinde PCNA pozitif hücre sayısı yok denilecek kadar azdı (Şekil 4-54). Bu gruptaki proliferasyon, teka hücrelerinde artış göstermekteydi (Şekil 4-54).

SY ve DMSO grubundaki proliferatif hücre sayısında ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$).

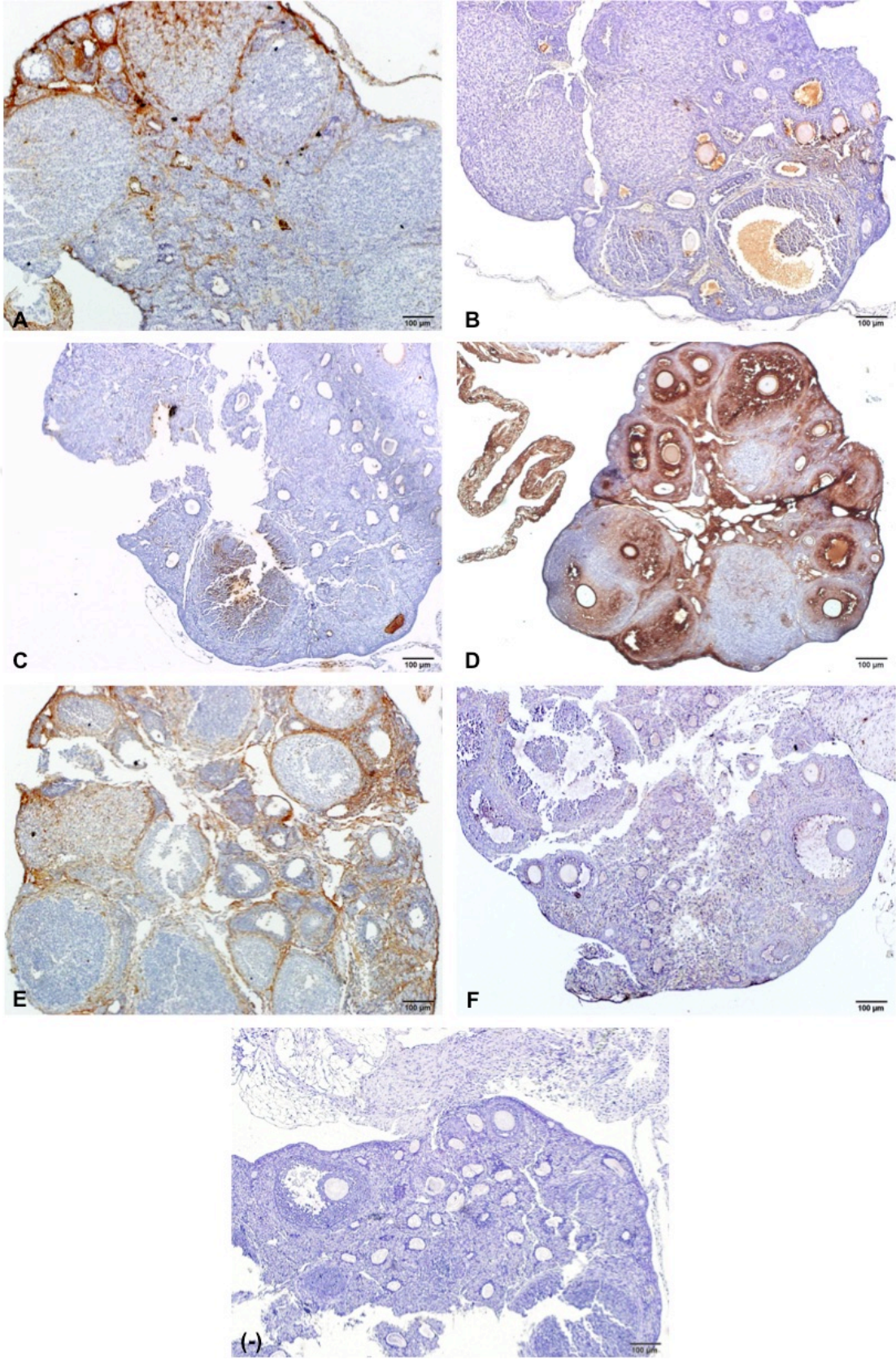


Şekil 4-52: Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki PCNA immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

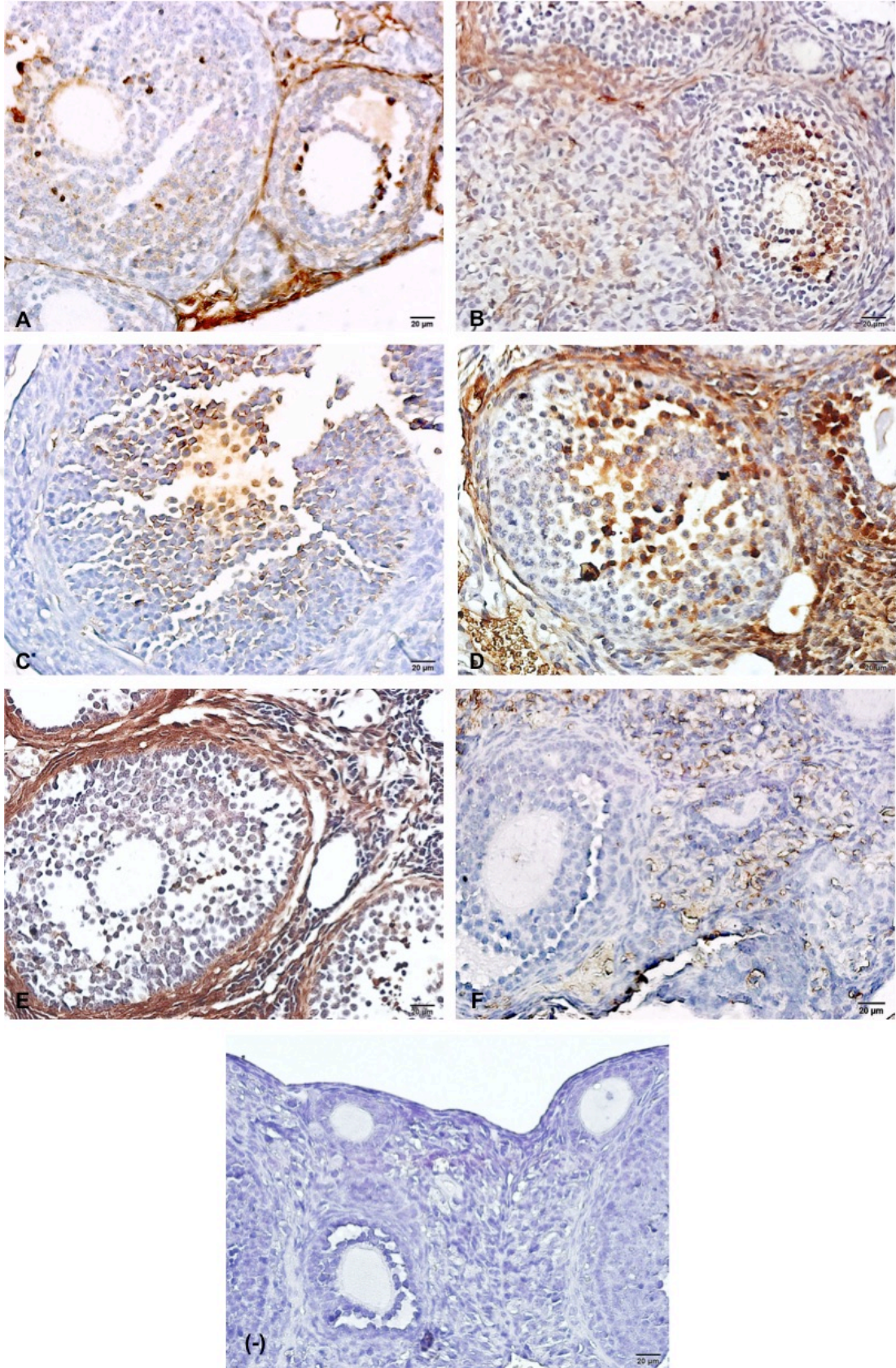
Tablo 4-11: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki PCNA immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	79,33	82,67	-3,333	0,6755	YOK	0,9966
KNT-DMSO	79,33	41,33	38	7,7	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS	79,33	157,7	-78,33	15,87	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	79,33	132,2	-52,83	10,71	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	79,33	20,33	59	11,96	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-DMSO	82,67	41,33	41,33	8,376	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS	82,67	157,7	-75	15,2	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	82,67	132,2	-49,5	10,03	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-İNH	82,67	20,33	62,33	12,63	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS	41,33	157,7	-116,3	23,57	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	41,33	132,2	-90,83	18,41	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-İNH	41,33	20,33	21	4,255	YOK	0,0538
PKOS-PKOS+İNH	157,7	132,2	25,5	5,167	VAR*	0,0114
PKOS-İNH	157,7	20,33	137,3	27,83	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	132,2	20,33	111,8	22,66	VAR****	$\leq 0,0001$

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.



Şekil 4-53: Deney gruplarına ait PCNA immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.



Şekil 4-54: Deney gruplarına ait PCNA immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+INH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.

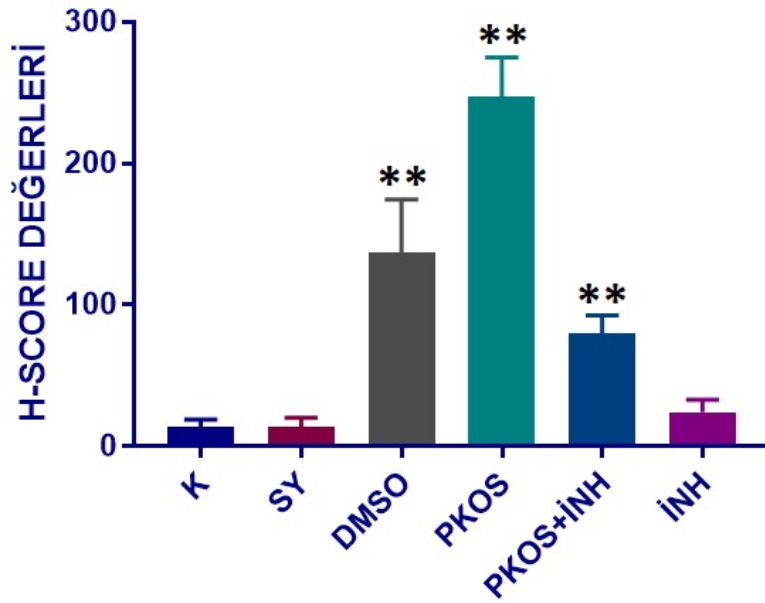
4.5.2. Cas-3 İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait ovaryum dokularındaki hücrelerde apoptozu göstermek için, Cas-3 proteinine yönelik immün işaretleme yöntemi kullanıldı. Tüm foliküllerdeki immün pozitif hücreler, semikantitatif H-SCORE yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4-55, Tablo 4-12). Negatif kontrol örneklerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi.

Bütün gruplardaki hayvanların ovaryum dokularındaki Cas-3 pozitif hücreler genel olarak değerlendirildiğinde, DMSO, PKOS ve PKOS+İNH gruplarındaki apoptotik hücrelerin, kontrol grubundaki apoptotik hücreler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($p \leq 0,001$) (Şekil 4-55, 4-56, 4-57).

DMSO grubundaki apoptotik hücreler, daha çok stromal hücrelerdi (Şekil 4-50C). PKOS grubundaki GH'lerinin çoğu apoptotikti. Ayrıca bu gruptaki oositlerde de yoğun Cas-3 immunreaksiyonu izlendi (Şekil 4-57D). PKOS+İNH grubunda, atreziye doğru giden foliküllerin GH'lerinde de yer yer Cas-3 pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 4-57E).

SY ve İNH grubundaki apoptotik hücre sayısında ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$).

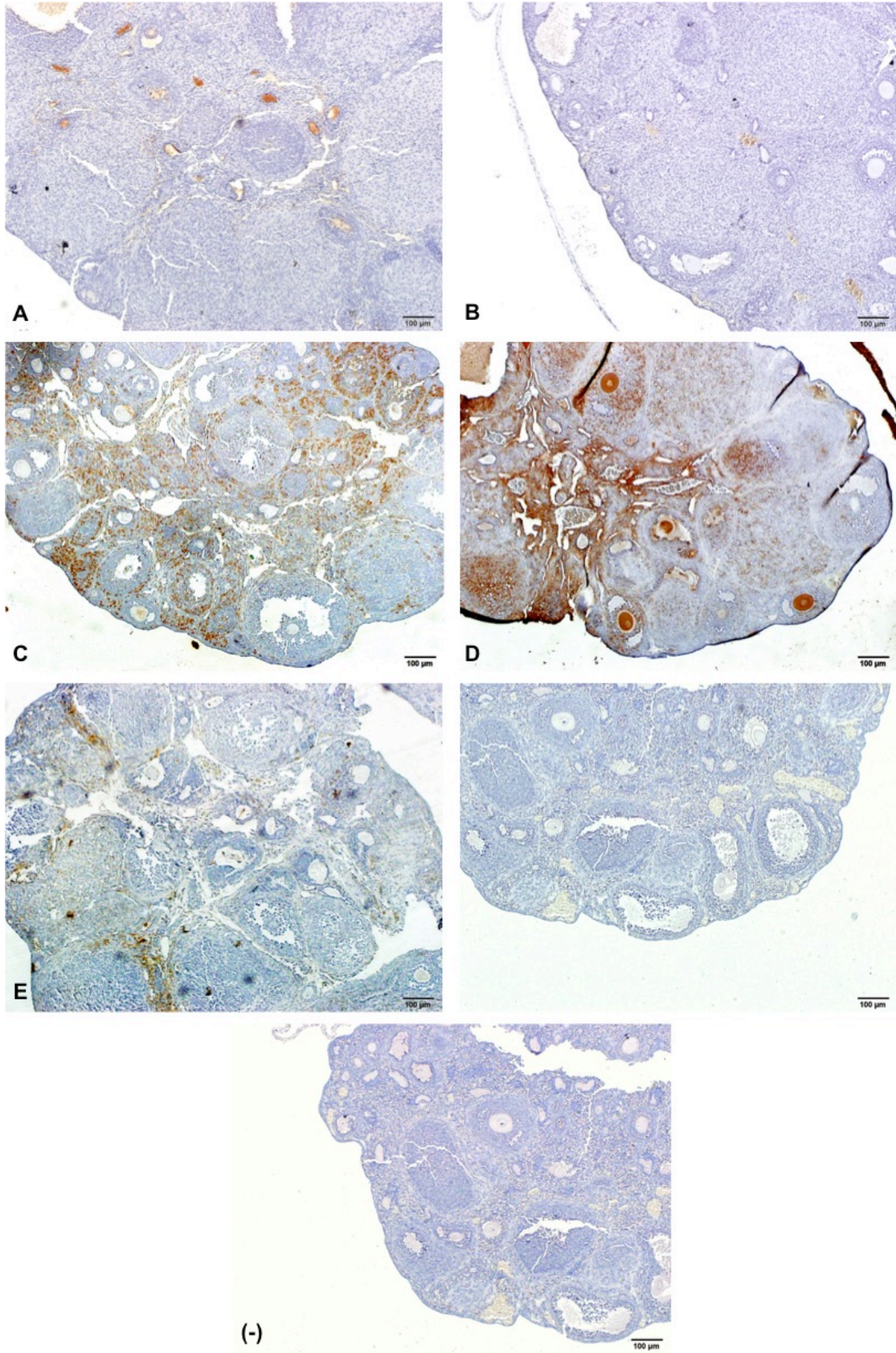


Şekil 4-55: Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki Cas-3 immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

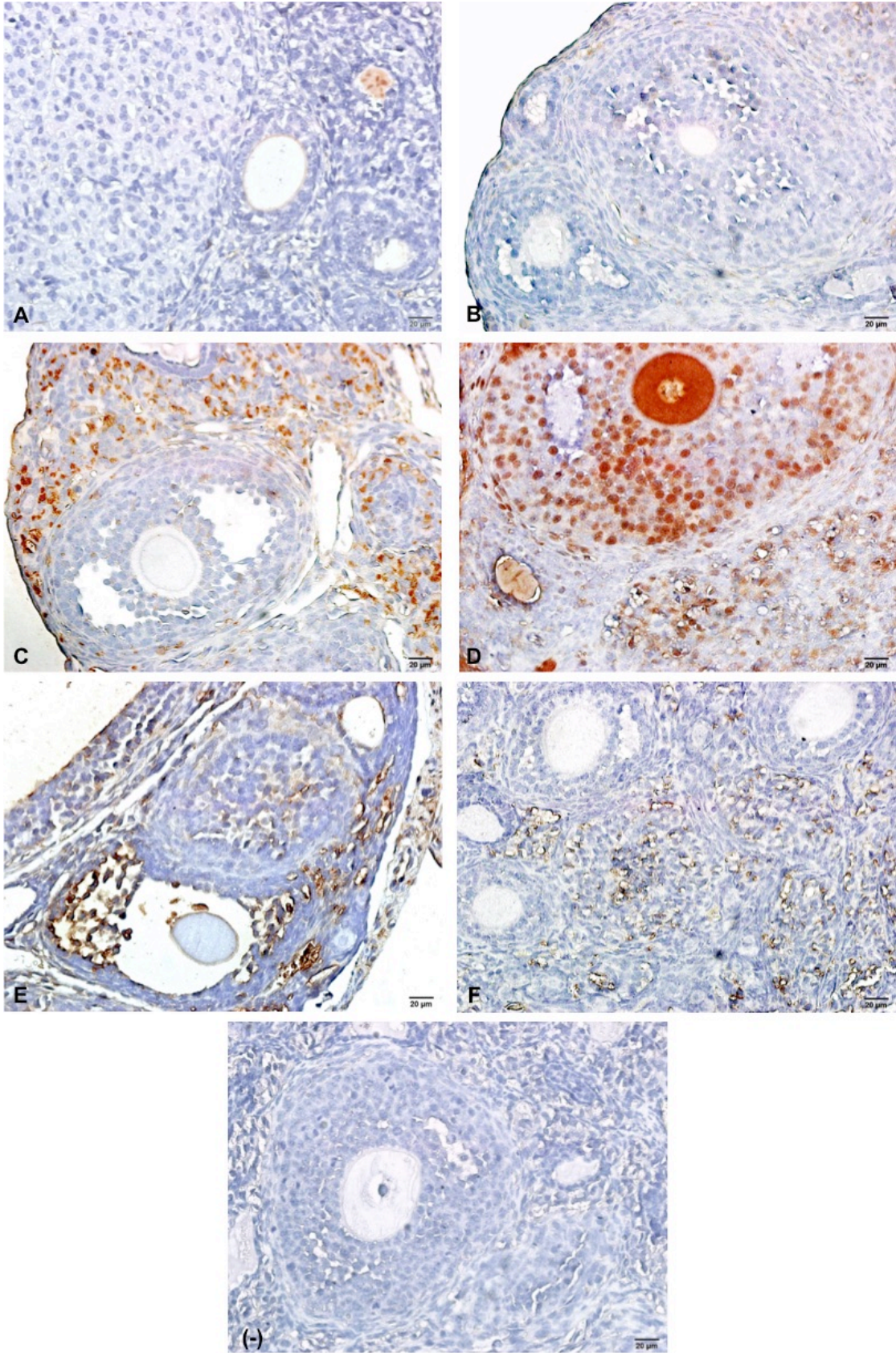
Tablo 4-12: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki Cas-3 immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	13,5	13,67	-0,1667	0,01982	YOK	$\geq 0,9999$
KNT-DMSO	13,5	136,5	-123	14,62	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS	13,5	247,3	-233,8	27,8	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	13,5	79,67	-66,17	7,867	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	13,5	24	-10,5	1,248	YOK	0,9477
SY-DMSO	13,67	136,5	-122,8	14,6	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS	13,67	247,3	-233,7	27,78	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	13,67	79,67	-66	7,847	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-İNH	13,67	24	-10,33	1,229	YOK	0,9511
DMSO-PKOS	136,5	247,3	-110,8	13,18	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	136,5	79,67	-56,83	6,757	VAR***	0,0006
DMSO-İNH	136,5	24	112,5	13,38	VAR****	0,0538
PKOS-PKOS+İNH	247,3	79,67	167,7	19,94	VAR****	0,0114
PKOS-İNH	247,3	24	233,3	26,55	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	79,67	24	55,67	6,619	VAR***	0,0007

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.



Şekil 4-56: Deney gruplarına ait Cas-3 immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+INH grubu; F) INH grubu; (-) Negatif kontrol.



Şekil 4-57: Deney gruplarına ait Cas-3 immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+INH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.

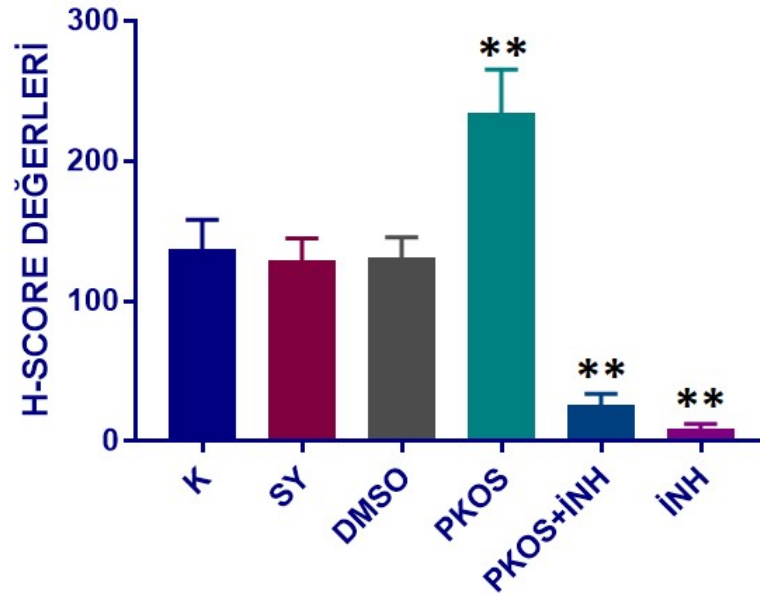
4.5.3. mTOR İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait ovaryum dokularındaki hücrelerde mTOR immünreaksiyonunu göstermek ve mTOR inhibisyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini teyid etmek için, mTOR proteinine yönelik immün işaretleme yöntemi kullanıldı. Tüm foliküllerdeki immün pozitif hücreler, semikantitatif H-SCORE yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4-58, Tablo 4-13). Negatif kontrol örneklerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi.

Bütün gruplardaki hayvanların ovaryum dokularındaki mTOR pozitif hücreler genel olarak değerlendirildiğinde, PKOS+İNH ve İNH grubundaki mTOR pozitif hücrelerde, kontrol grubundaki hücelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken ($p \leq 0,001$); PKOS grubundaki hücrelerde mTOR immünreaksiyonu, kontrol grubundaki hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı ($p \leq 0,001$) (Şekil 4-59, 4-60, 4-61).

mTOR immünreaksiyonu, PKOS+İNH ve İNH grupları hariç diğer bütün hücrelerde, gelişmekte olan bütün folikülerin GH'lerinde, sitoplazmik olarak gözlendi (Şekil 4-60A,B,C,D). mTOR inhibisyonu yapılan PKOS+İNH ve İNH gruplarındaki GH'lerinde ise herhangi bir immün reaktivite izlenmedi (Şekil 4-60E,F).

SY ve DMSO grubundaki GH'lerindeki mTOR immünreaktivitesi ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark sergilemedi ($p > 0,05$).

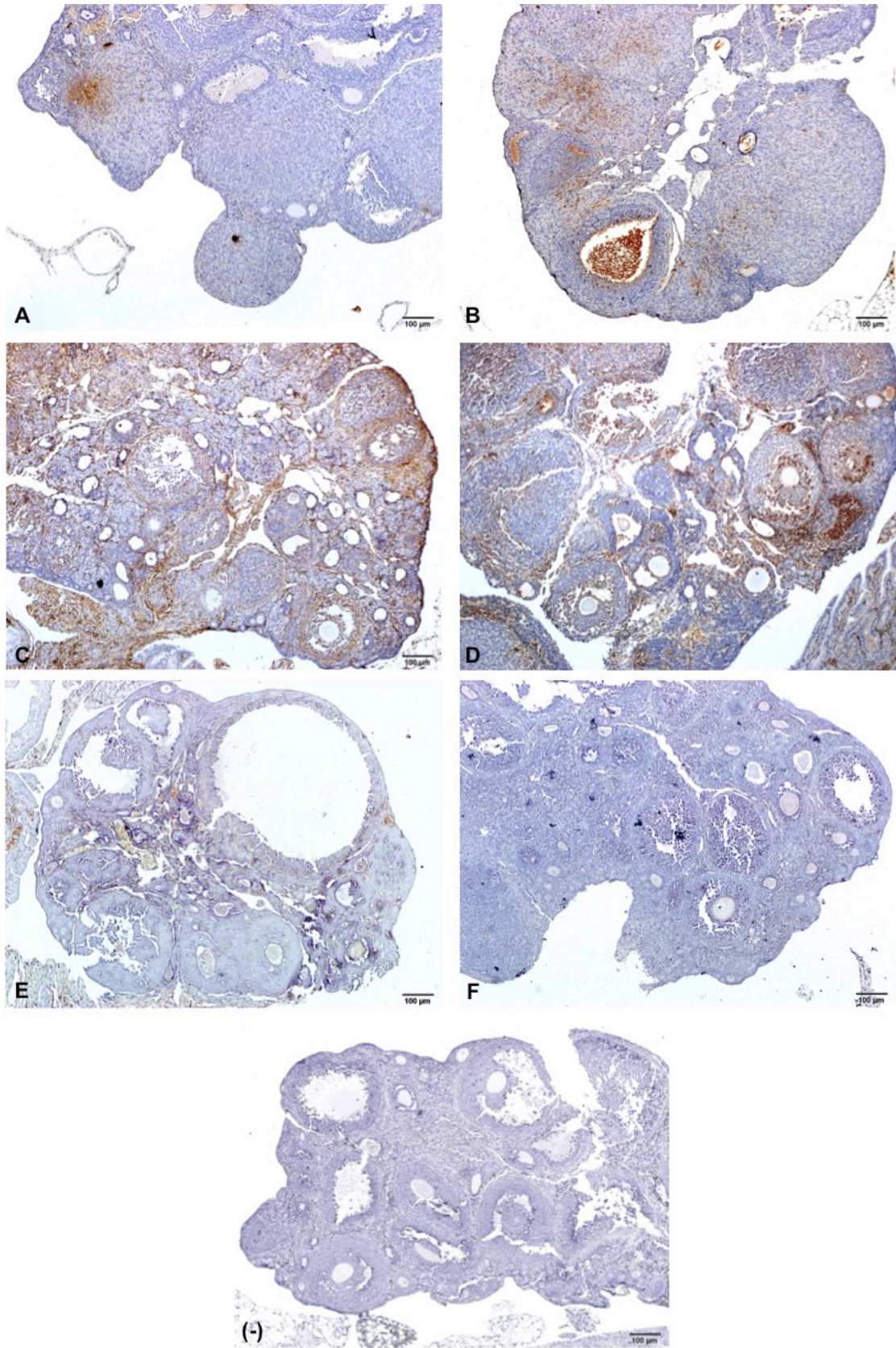


Şekil 4-58: Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki mTOR immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

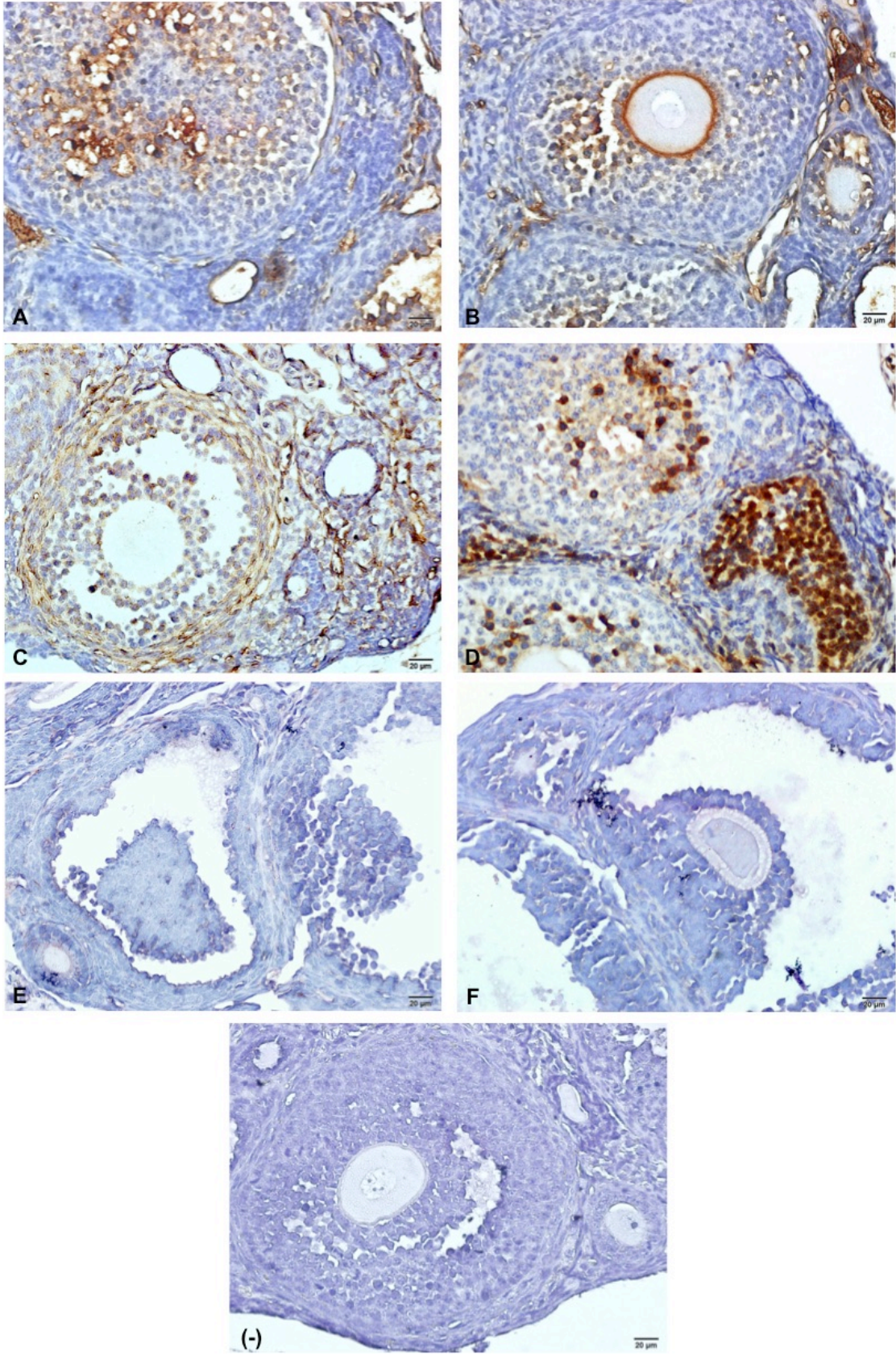
Tablo 4-13: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki mTOR immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	137,2	129	8,167	1,055	YOK	0,9742
KNT-DMSO	137,2	92,67	44,5	5,751	VAR**	0,0039
KNT-PKOS	137,2	234	-96,83	12,51	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	137,2	25,5	111,7	14,43	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	137,2	8,667	128,5	16,61	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-DMSO	129	92,67	36,33	4,695	VAR*	0,0261
SY-PKOS	129	234	-105	13,57	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	129	25,5	103,5	13,37	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-İNH	129	8,667	120,3	15,55	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS	92,67	234	-141,3	18,26	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	92,67	25,5	67,17	8,68	VAR***	$\leq 0,0001$
DMSO-İNH	92,67	8,667	84	10,85	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS-PKOS+İNH	234	25,5	208,5	26,94	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS-İNH	234	8,667	225,3	29,12	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	25,5	8,667	16,83	2,175	YOK	0,6434

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.



Şekil 4-59: Deney gruplarına ait mTOR immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.



Şekil 4-60: Deney gruplarına ait mTOR immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.

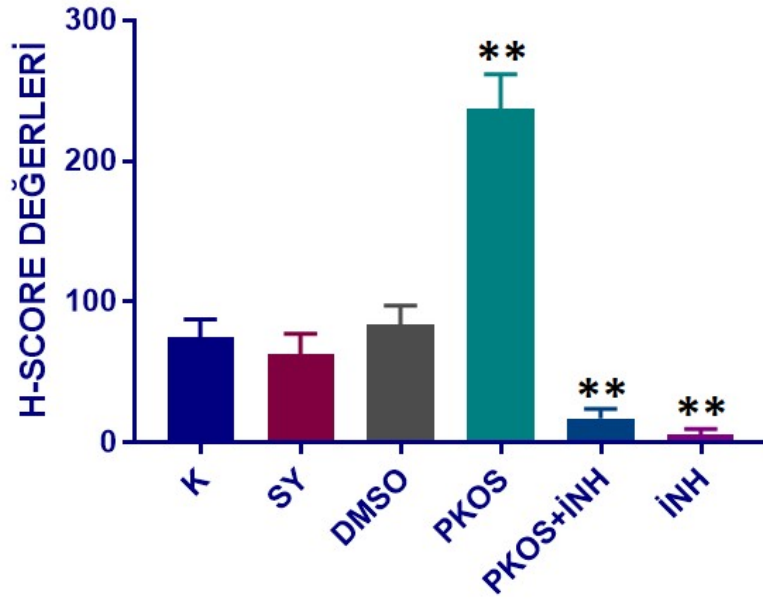
4.5.4. P-mTOR (2448) İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait ovaryum dokularındaki hücrelerde P-mTOR (Ser-2448) immünreaksiyonunu göstermek için, P-mTOR (Ser-2448) proteinine yönelik immün işaretleme yöntemi kullanıldı. Tüm foliküllerdeki immün pozitif hücreler, semikantitatif H-SCORE yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4-61, Tablo 4-14). Negatif kontrol örneklerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi.

Bütün gruplardaki hayvanların ovaryum dokularındaki P-mTOR (Ser-2448) pozitif hücreler değerlendirildiğinde, PKOS grubundaki hücrelerde P-mTOR (Ser-2448) immünreaksiyonu, kontrol grubundaki hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmışken ($p \leq 0,001$), PKOS+İNH ve İNH grubundaki P-mTOR (Ser-2448) pozitif hücreler, kontrol grubundaki hücelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı ($p \leq 0,001$) (Şekil 4-61, 4-62, 4-63).

P-mTOR (Ser-2448) immünreaksiyonu, PKOS+İNH ve İNH grupları hariç diğer bütün gruplarda, büyümekte olan folikülerin GH'lerinde ve teka hücrelerinde nükleer olarak gözlendi (Şekil 4-56 A,B,C,D). mTOR inhibisyonu yapılan PKOS+İNH ve İNH gruplarındaki hücrelerde, P-mTOR (Ser-2448) immün reaktivitesi de izlenmedi (Şekil 4-63 E,F).

SY ve DMSO grubundaki P-mTOR (Ser-2448) immünreaktivitesi ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p > 0,05$).

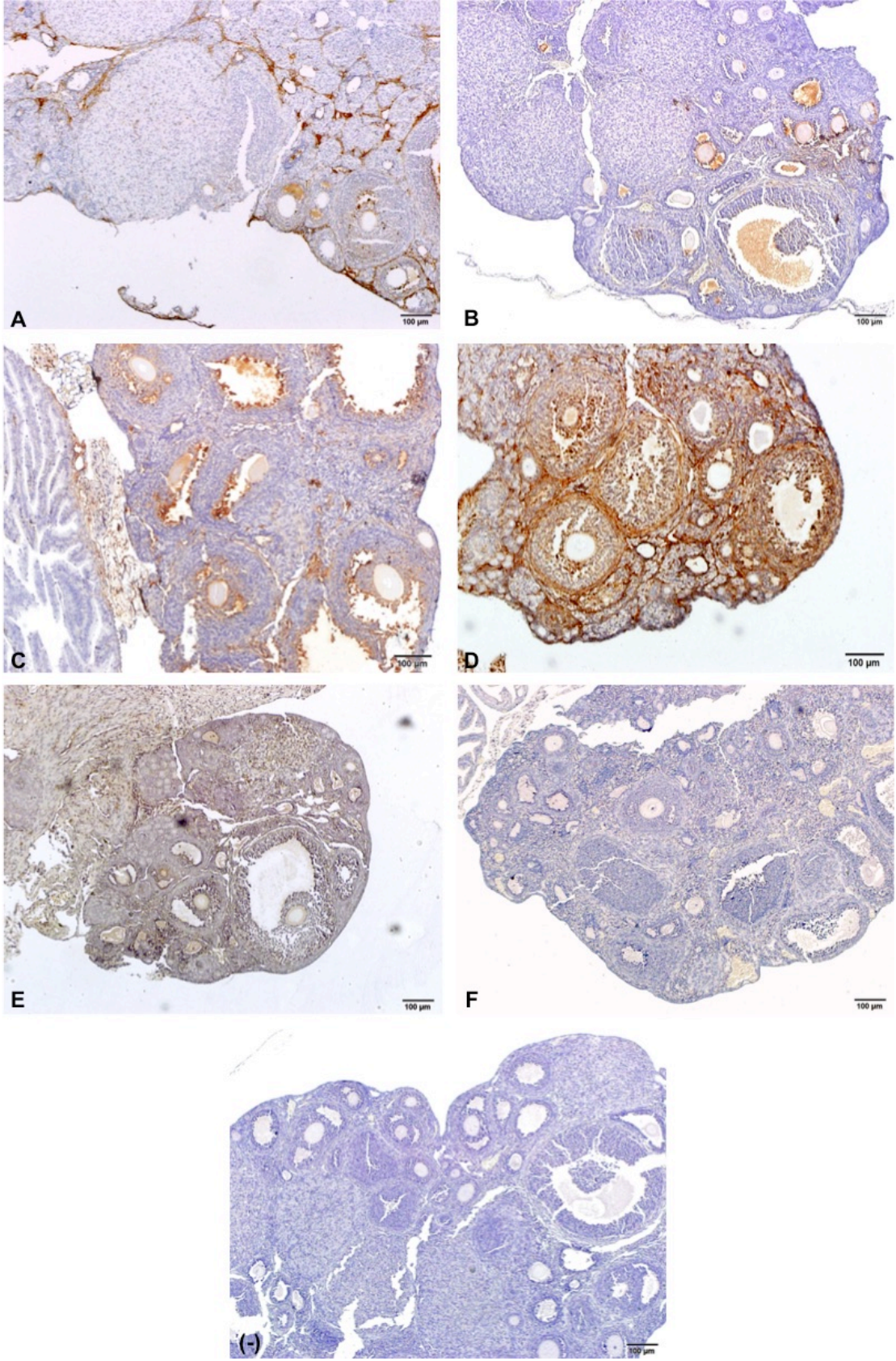


Şekil 4-61: Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2448) immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$).

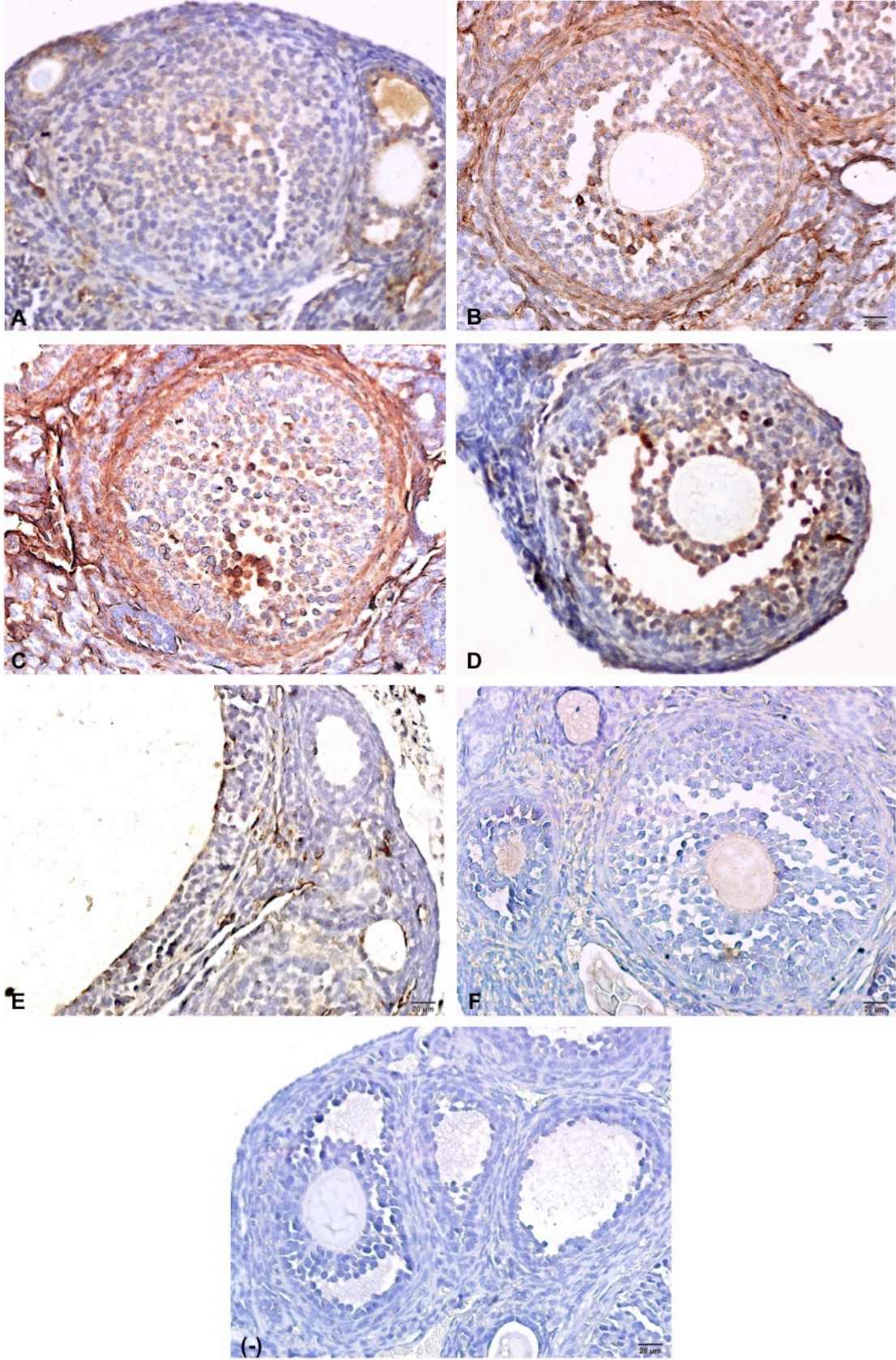
Tablo 4-14: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2448) immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	74,5	62,83	11,67	2,005	YOK	0,7164
KNT-DMSO	74,5	84	-9,5	1,632	YOK	0,8544
KNT-PKOS	74,5	237,3	-162,8	27,98	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	74,5	17	57,5	9,88	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	74,5	5,833	68,67	11,8	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-DMSO	62,83	84	-21,17	3,637	YOK	0,1358
SY-PKOS	62,83	237,3	-174,5	29,98	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	62,83	17	45,83	7,875	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-İNH	62,83	5,833	57	9,794	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS	84	237,3	-153,3	26,35	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	84	17	67	11,51	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-İNH	84	5,833	78,17	13,43	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS-PKOS+İNH	237,3	17	220,3	37,86	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS-İNH	237,3	5,833	231,5	39,78	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	17	5,833	11,17	1,919	YOK	0,7515

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.



Şekil 4-62: Deney gruplarına ait P-mTOR (Ser 2448) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.



Şekil 4-63: Deney gruplarına ait P-mTOR (Ser 2448) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrolrafları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.

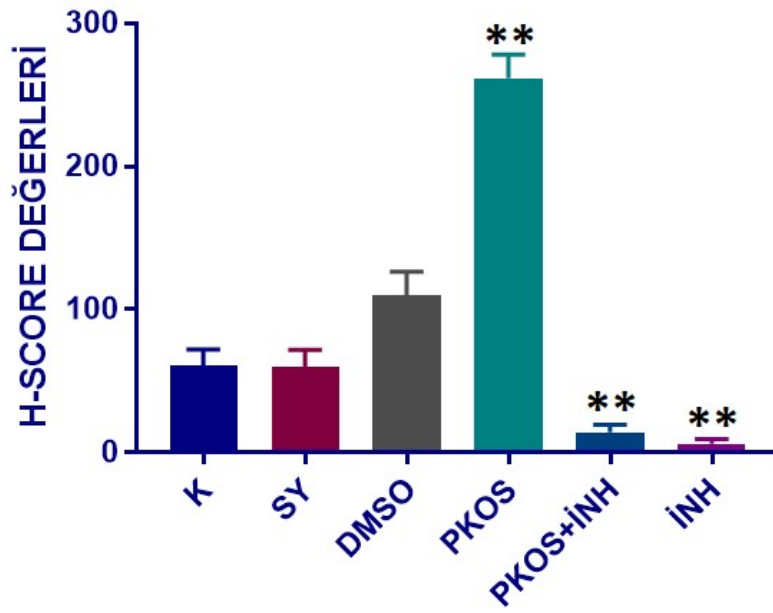
4.5.5. P-mTOR (2481) İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Deney gruplarına ait ovaryum dokularındaki hücrelerde P-mTOR (Ser-2481) immünreaksiyonunu göstermek için, P-mTOR (Ser-2481) proteinine yönelik immün işaretleme yöntemi kullanıldı. Tüm foliküllerdeki immün pozitif hücreler, semikantitatif H-SCORE yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4-64, Tablo 4-15). Negatif kontrol örneklerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi.

Bütün gruplardaki hayvanların ovaryum dokularındaki P-mTOR (Ser-2481) pozitif hücreler değerlendirildiğinde, DMSO ve PKOS grubundaki hücrelerde P-mTOR (Ser-2481) immünreaksiyonu, kontrol grubundaki hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmışken ($p \leq 0,001$), PKOS+İNH ve İNH grubundaki P-mTOR (Ser-2481) pozitif hücreler, kontrol grubundaki hücelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı ($p \leq 0,001$) (Şekil 4-64, 4-65, 4-66).

P-mTOR (Ser-2481) immünreaksiyonu da, P-mTOR (Ser-2448) immünreaksiyonunda olduğu gibi, PKOS+İNH ve İNH grupları hariç diğer bütün gruplarda, büyümekte olan folikülerin GH'lerinde ve teka hücrelerinde nükleer olarak gözlendi (Şekil 4-66 A,B,C,D). mTOR inhibisyonu yapılan PKOS+İNH ve İNH gruplarındaki hücrelerde, P-mTOR (Ser-2481) immün reaktivitesi izlenmedi (Şekil 4-66 E,F).

SY grubundaki P-mTOR (Ser-2481) immünreaktivitesi ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p > 0,05$).

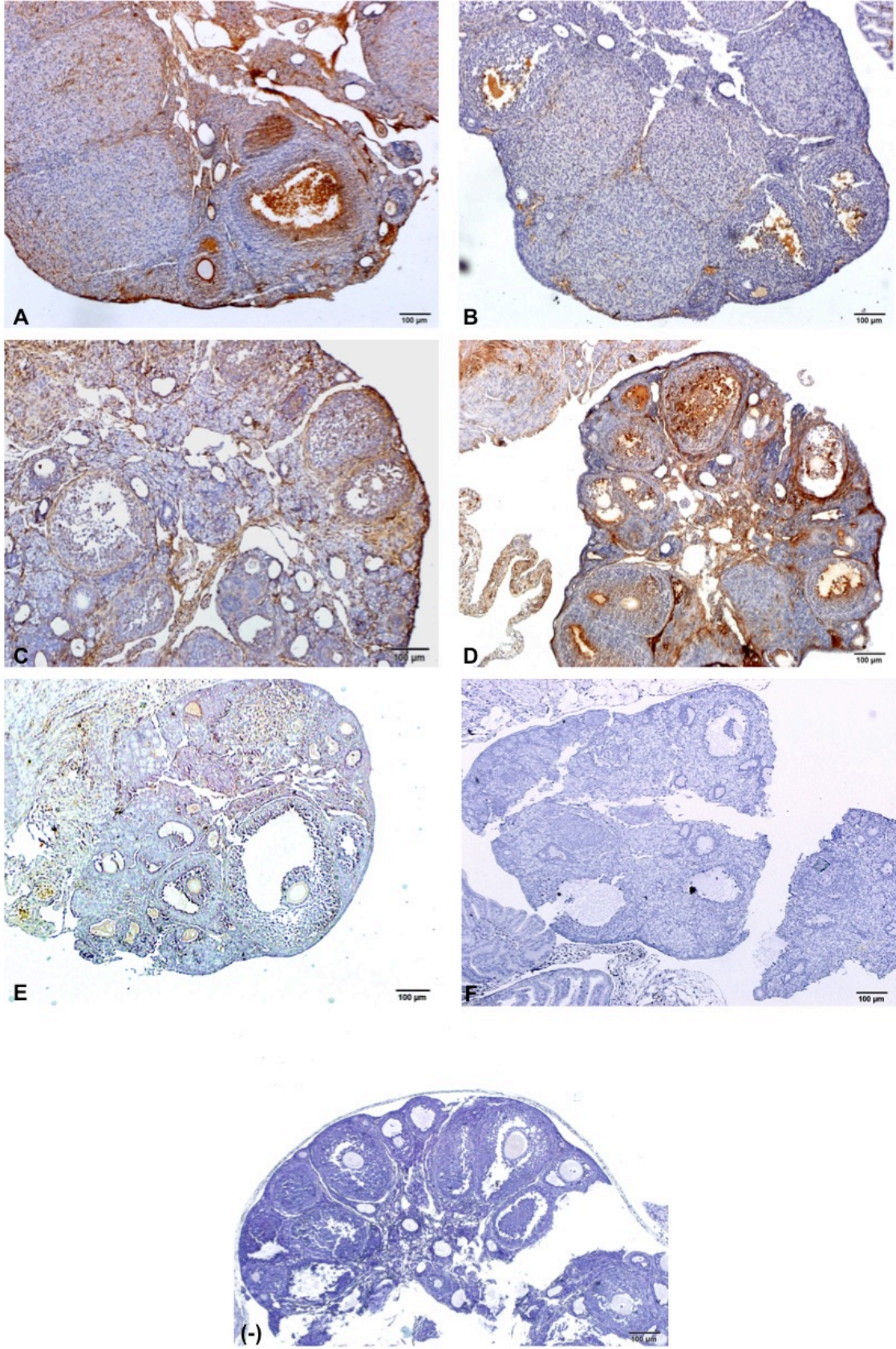


Şekil 4-64: Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2481) immünreaksiyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$).

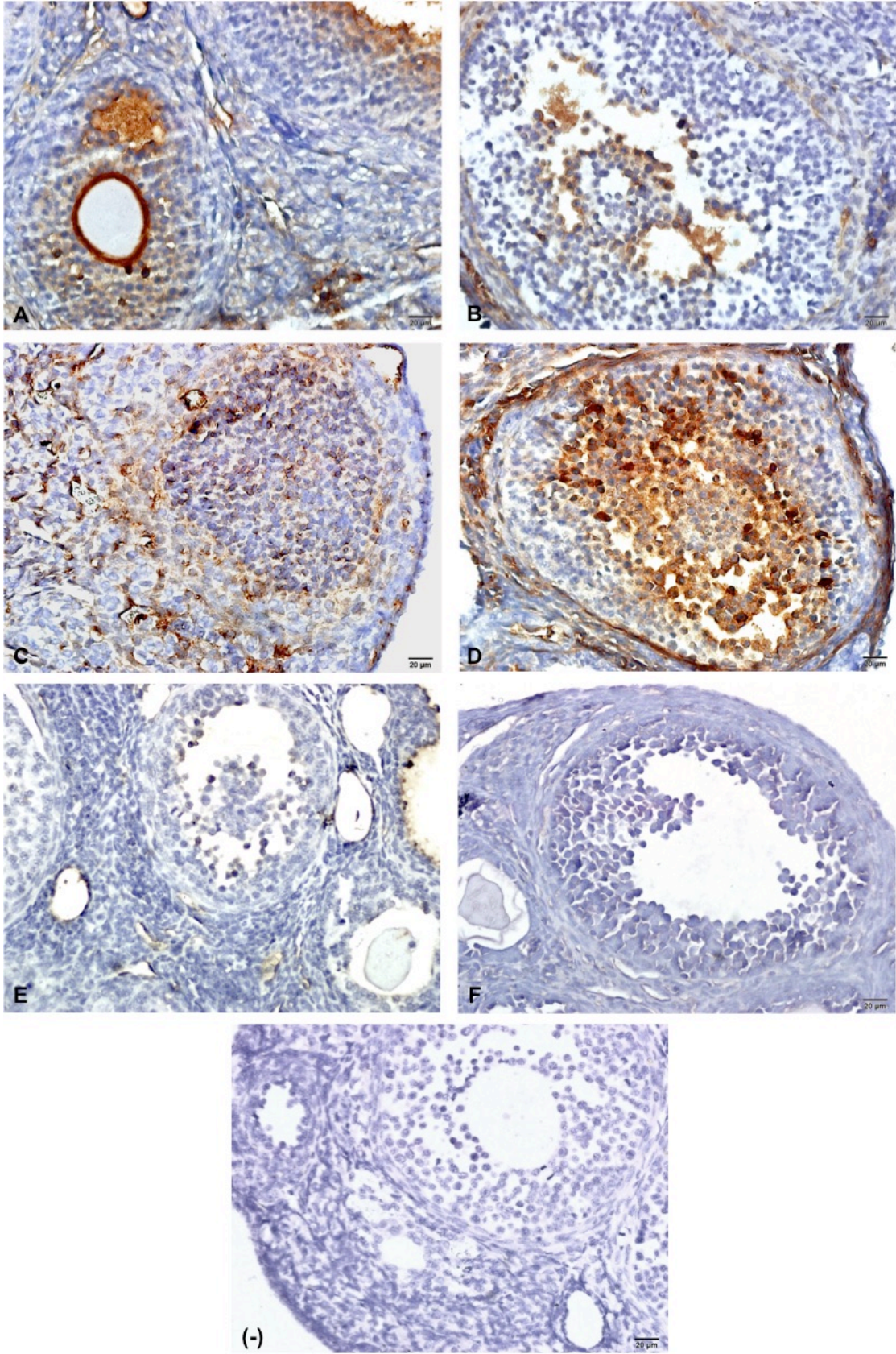
Tablo 4-15: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki P-mTOR (Ser 2481) immünreaksiyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	61,17	59,67	1,5	0,308	YOK	$\geq 0,9999$
KNT-DMSO	61,17	109,8	-48,67	9,992	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS	61,17	261,7	-200,5	41,17	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-PKOS+İNH	61,17	14,17	47	9,65	VAR****	$\leq 0,0001$
KNT-İNH	61,17	6,167	55	11,29	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-DMSO	59,67	109,8	-50,17	10,3	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS	59,67	261,7	-202	41,47	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-PKOS+İNH	59,67	14,17	45,5	9,342	VAR****	$\leq 0,0001$
SY-İNH	59,67	6,167	53,5	10,98	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS	109,8	261,7	-151,8	31,17	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-PKOS+İNH	109,8	14,17	95,67	19,64	VAR****	$\leq 0,0001$
DMSO-İNH	109,8	6,167	103,7	21,28	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS-PKOS+İNH	261,7	14,17	247,5	50,82	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS-İNH	261,7	6,167	255,5	52,46	VAR****	$\leq 0,0001$
PKOS+İNH-İNH	14,17	6,167	8	1,643	YOK	0,8512

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.



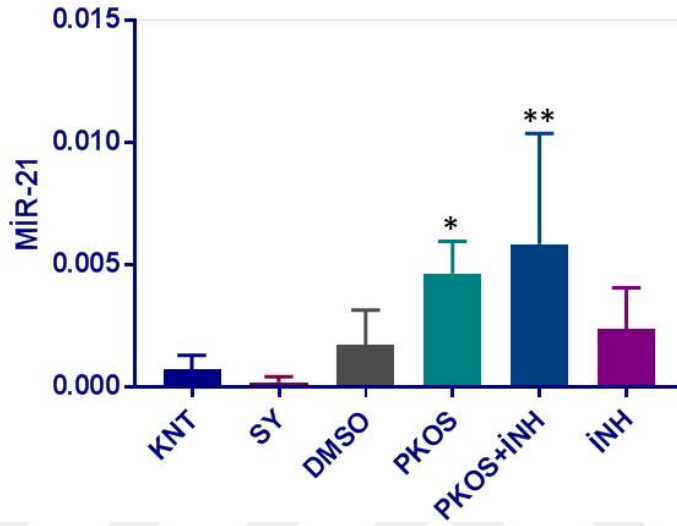
Şekil 4-65: Deney gruplarına ait P-mTOR (Ser 2481) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x10 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.



Şekil 4-66: Deneş gruplarına ait P-mTOR (Ser 2481) immünreaktivitesini gösteren ışık mikrografları (x40 büyütme). A) Kontrol grubu; B) SY grubu; C) DMSO grubu; D) PKOS grubu; E) PKOS+İNH grubu; F) İNH grubu; (-) Negatif kontrol.

4.6. RT-PCR ANALİZLERİ

PKOS ($p \leq 0,05$) ve PKOS+İNH ($p \leq 0,001$) gruplarındaki miR-21 gen ekspresyon seviyeleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede artmışken (Tablo 4-16, Şekil 4-67), SY, DMSO ve İNH gruplarındaki ekspresyon seviyeleri anlamlı bir farklılık sergilemedi ($p > 0,05$).



Şekil 4-67: Deney gruplarındaki hayvanların ovaryumlarındaki miR-21 gen ekspresyon seviyelerini gösteren grafik (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Tablo 4-16: Deney gruplarındaki hayvanların, ovaryumlarındaki miR-21 gen ekspresyon seviyelerinin One-way ANOVA testi çoklu karşılaştırma sonuçlarını gösteren tablo (Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

GRUPLAR	ORT. 1	ORT. 2	ORT. FARK	q	FARKLILIK	P DEĞERİ
KNT-SY	0,00073	0,0001933	0,0005367	0,7079	YOK	0,9959
KNT-DMSO	0,00073	0,001714	-0,0009843	1,298	YOK	0,9397
KNT-PKOS	0,00073	0,004646	-0,003916	5,164	VAR**	0,0088
KNT-PKOS+İNH	0,00073	0,00584	-0,00511	6,739	VAR***	0,0003
KNT-İNH	0,00073	0,00235	-0,00162	2,137	YOK	0,6592
SY-DMSO	0,0001933	0,001714	-0,001521	2,006	YOK	0,7158
SY-PKOS	0,0001933	0,004646	-0,004453	5,872	VAR**	0,0021
SY-PKOS+İNH	0,0001933	0,00584	-0,005646	7,447	VAR****	≤0,0001
SY-İNH	0,0001933	0,00235	-0,002157	2,845	YOK	0,3531
DMSO-PKOS	0,001714	0,004646	-0,002932	3,866	YOK	0,0896
DMSO-PKOS+İNH	0,001714	0,00584	-0,004125	5,441	VAR**	0,005
DMSO-İNH	0,001714	0,00235	-0,0006362	0,839	YOK	0,9909
PKOS-PKOS+İNH	0,004646	0,00584	-0,001194	1,574	YOK	0,8732
PKOS-İNH	0,004646	0,00235	0,002295	3,027	YOK	0,287
PKOS+İNH-İN	0,00584	0,00235	0,003489	4,602	VAR*	0,0256

Kontrol ile karşılaştırıldığında: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

5. TARTIŞMA

PKOS, üreme çağındaki kadınların yaklaşık %5-10'unu etkileyen karmaşık bir endokrinopatidir ve anovulatuvar infertilitenin en yaygın nedenidir^{19,52-61}. Hastalığın semptomları arasında oligomenore, amenore, anovülasyon, çok sayıda antral folikül, dolaşımdaki LH'nin hipersekresyonu ile daha düşük veya eşdeğer FSH seviyeleri, obezite, hirsutizm, hiperinsülinemi, insülin direnci, hipotalamik-hipofizyal dissenkronizasyon, anormal pulsatil gonadotropin salgısı, granüloza/teka hücre disfonksiyonu, çeşitli metabolik bozukluklar ve aşırı ovaryan androjen üretimi yer alır^{19,62-66}.

Menarş ile birlikte başlayan PKOS'lu hastalarda, düzensiz menstrual siklus ya da adet görememe gibi siklus düzensizlikleri, genellikle anovulatuvar infertilite ile sonuçlanır. Yapılan çalışmalarda, DHEA enjeksiyonu sonrasında deneysel olarak PKOS oluşturulan sıçanlar, asiklik ve anovulatuvar hale gelmektedir¹³³. Bizim çalışmamızda da kontrol ve Sham (SY ve DMSO) gruplarındaki hayvanlar normal östrus siklusları sergilerken, PKOS ve PKOS+İNH gruplarındaki deney hayvanları, uzayan ve tamamlanamayan östrus siklusları sergiledi. Bu gruptaki deney hayvanlarının ovaryum kesitleri incelendiğinde, ovaryumlarda ya hiç KL bulunmaması ya da tek tük KL yapısı görülmesi, bu gruptaki hayvanların ovulasyon gerçekleştirmediği bulgusunu destekleyici nitelikteydi. Bu bulgular her iki grupta da deneysel PKOS modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu doğruladı. Son olarak İNH grubundaki deney hayvanlarının vajinal smear yaymaları incelendiği zaman, bu gruptaki hayvanların nispeten daha düzenli östrus siklusları sergilemesine rağmen, sikluslarını tamamlasalar bile, hiç östrus fazına girememeleri dikkat çekiciydi. PKOS+İNH grubundaki hayvanların da düzensiz östrus siklusları sergilemeleri ile birlikte bu bulgu bize, mTOR inhibisyonunun, ovulasyonu engelliyor olabileceğini düşündürdü. İNH grubundaki deney hayvanlarının ovaryumlarında KL yapısına rastlanmaması da bu düşüncüyü güçlendirdi.

PKOS'lu kadınlar genellikle, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve prediyabet, abdominal yağlanma, yüksek kolesterol ve yüksek kan basıncı ile karakterize olan metabolik sendroma tıpa tıp benzeyen metabolik bozukluklara sahiptir^{60,61,68,71-78}. PKOS'lu kadınlar, yaşam tarzı ve obezite aracılı ekstrasik insülin direnciyle

şiddetlenen intrinsik insülin direncine sahiptir ⁹¹ ve PKOS'lu kadınların %38-88'i obezken; %50-70'i insülin dirençlidir ⁷⁹⁻⁸³. Androjenler, folikülogenezin yanı sıra, adiposit fonksiyonunda da çeşitli etkilere sahiptir. PKOS'lu kadınlarda hiperandrojenizm, abdominal depolarda yağ birikmesiyle karakterize android vücut yağı dağılımıyla ilişkilidir ¹⁰³ ve hiperinsülineminin varlığı obeziteden bağımsızdır ¹⁰⁴. Hiperandrojenizmin hiperinsülinemiye yol açıp açmadığı veya tam tersi hiperinsülineminin hiperandrojenizme neden olup olmadığı ise belirsizdir ve her ikisi de mümkündür ¹⁰⁵. Androjenlerin yanı sıra, artan folikül havuzundan salınan diğer faktörlerin, metabolik fenotipe yol açıp açmadığı da bilinmemektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, DHEA ile muamele edilen farelerin vücut ağırlığında artışla birlikte, açlık insülin ve glikoz düzeylerinin de arttığı rapor edilmiştir ¹⁴⁴. Biz de çalışmamızda, deneyin ilk ve son günü deney hayvanlarının vücut ağırlıklarını ölçtük. Deney sonunda, vücut ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO ve İNH gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıkları azalırken, PKOS grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları anlamlı derecede artmıştı. SY ve PKOS+İNH grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları ise kontrol grubundaki hayvanlar ile benzerlik göstermekteydi. Sonuçlarımız arasında, PKOS grubundaki hayvanların vücut ağırlıklarının artması, PKOS'lu kadınlardaki abdominal yağlanma ile birlikte vücut ağırlığının artmasını destekleyici nitelikteydi. DMSO ve İNH gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıklarının azalmasının yanında, normalde artış olması beklenen PKOS+İNH grubunda da ağırlığın kontrol seviyelerine gerilemesi bize, mTOR inhibisyonu için kullandığımız KU-0063794'ün çözgen maddesi DMSO'nun, vücut ağırlığını düşürücü bir etkisinin olabileceğini, mTOR inhibisyonunun bu yönde çok rol oynamayabileceğini düşündürdü.

PKOS'un etiyolojisi hem genetik yatkınlık, hem de çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinden etkilenir. Ancak, steroidogenez ve androjen mekanizmasının çeşitli yollarının çalışılmasına rağmen, hiperandrojenizmin PKOS'taki patogenezi hala belirsizdir. Hiperandrojenik kadınlarda ve uzun dönem androjen tedavisi alan kadın-erkek transseksüellerde genellikle PKOM görülmektedir ⁹²⁻⁹⁷. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların, endojen gonadotropin salgısının, bazal androjen salgısına katkıda bulunduğunu ve düşük gonadotropin düzeylerine rağmen ovaryan androjen sentezini ve gonadotropinlere duyarlılığı koruduğunu göstermesi, PKOS'lu kadınlarda hiperandrojenizme neden olan mekanizmalardan birinin, primer TH disfonksiyonu

olabileceğine işaret eder ²⁵⁰⁻²⁵⁵. Normal ovaryumlarda, TH oluşumu, ilk olarak sekonder folikül gelişimi sırasında bazal membran yakınında ve folikül çevresinde birleşmeye başlayan ince, uzamış stromal hücrelerle ortaya çıkar. Folikül büyümeye devam ederken TH'leri teka internaya farklılaşır, steroidojenik kapasite ve androjen üretme yeteneği kazanır. Normal TH görünümünün tersine PKOS'un antral folikülleri, oldukça büyük hücre niteliğine sahip ve genellikle GH tabakasının genişliğinden kalın bir teka tabakası ile çevrelenir ²⁵¹. Oluşan bu teka hiperplazisinde, pitüiter LH salgısının anormal artışının ve fazla ovaryan androjen üretiminin kesinlikle rol oynadığını gösteren bulgular vardır ²⁵²⁻²⁵³. Ayrıca, PKOS'da TH steroidogenezinde meydana gelen primer bir hasarın, gonadotropin stimülasyonuna fazla yanıt verilmesine yol açtığı düşünülmektedir. PKOS ovaryumlarından kültür edilen TH'lerinin, başlangıçta ve LH stimülasyonunu takiben, normal TH'lerinden daha fazla androjen ürettiği ortaya koyulmuştur ²⁵⁴⁻²⁵⁵. İn vivoda fazla ovaryan androjen üretiminin doğasını belirlemek için PKOS'lu kadınlara, normal kadınlara ve normal erkeklere GnRH agonisti uygulanmasını takiben 24 saat sonra, PKOS'lu kadınların serum 17-hidroksiprogesteron (17-OHP) ve androstenedion (A₄) konsantrasyonları, normal erkeklere benzer şekilde, normal kadınlara kıyasla artarken; PKOS'lu kadınlar ve normal kadınlar arasındaki testosteron (T) seviyelerinde farklılık bulunmamıştır ²⁵⁶. PKOS'lu kadınlarla yapılan başka bir çalışmada da, LH stimülasyonu yerine hCG'ye cevaben 17-OHP üretimi normal kadınlara kıyasla artmıştır ve GnRH agonisti ile endojen gonadotropinlerin baskılanmasını takiben yüksek kalmıştır ²⁴⁹. Bu klinik sonuçlar, PKOS'lu kadınlarda gonadotropin stimülasyonuna cevaben androjen üretiminin artışına yol açan TH'lerinde, CYP17'nin kalıtsal düzensizliği görüşünü desteklemektedir. Ayrıca, PKOS TH'leri kullanılarak, radyoaktif olarak işaretli pregnenolonun, 17-OH pregnenolona, DHEA'ya ve sonunda A₄'e, normal hücrelere kıyasla daha hızlı metabolize edildiği gösterilmiştir ²⁵⁷. Yine başka bir çalışmada, PKOS'lu kızlarda GnRH salım sıklığında artış görülmüştür ¹⁰¹. GnRH'daki bu artış, fazla LH salınımına yol açar. Çok erken safhalarda, büyüyen foliküllerde, LH reseptörlerinin zamanından önce kazanılması da, ovaryan androjen üretiminin artışına neden olabilmektedir ¹⁰¹. Çok sayıda çalışmada, farklı büyüklüklerdeki PKOS'lu ve normal foliküllerin GH'lerinde steroid üretimi, LH stimülasyonu sonrası ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Küçük PKOS foliküllerinde (4 mm) LH ile stimüle edilen P₄ üretiminin, normal ovaryumlardaki daha büyük foliküllerde (9,5-10 mm) üretilen P₄ miktarından daha fazla olduğu görülmüştür ²⁵⁸. PKOS'lu

kadınlarda hiperinsülinemiden önce ve sonra FSH'a karşı üretilen P₄ yanıtları incelendiğinde ise, PKOS'lu kadınlarda FSH ile uyarılan P₄ üretiminde anlamlı derecede artış görülürken, normal kadınlarda değişim görülmemiştir⁹⁰. Normal kadınlara kıyasla PKOS'lu kadınlarda FSH'a karşı daha fazla P₄ yanıtının olması, bu hastalıkta erkenden luteinize olan GH'leri ile uyumluluk göstermektedir. Küçük antral foliküllerin GH'lerinin artan LH reseptörlerini nasıl kazandığı tam olarak bilinmemektedir. Kültür edilmiş GH'lerinde FSH'ın, LH reseptörünü indüklediği bilinmektedir²⁵⁹⁻²⁶⁰. Ancak PKOS'lu kadınlarda FSH salgısı azalmasına rağmen, testosteron içeren silastik kapsül implante edilmiş insan olmayan primatların GH'lerinde, FSH reseptör ekspresyonunun arttığı ve androjen reseptörüyle birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir^{98,261}. Dolayısıyla fazla androjen üretimi, PKOS'lu hiperandrojenik kadınlarda FSH'a karşı daha fazla ovaryan yanıt verildiğini göstermektedir. İlk in vitro çalışmalar, FSH stimülasyonunu takiben anovulatuvar PKOS'lu kadınların GH'leri tarafından E₂ üretiminin de, normal hücrelerde görülen yanıtlara kıyasla 6 ila 10 kat daha fazla olduğunu göstermiştir^{262,263}. Sonraki klinik çalışmalar, bu in vitro çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. PKOS'lu kadınlar, artan dozlarda intravenöz FSH ile akut olarak uyarıldığında, en yüksek dozda FSH ile uyarılan kadınlarda, normal kadınlarda görülene kıyasla anlamlı derecede daha fazla E₂ üretmiştir²⁶⁴. E₂'nin de in vitroda FSH'a karşı ovaryan yanıtları güçlendirebileceği gösterilmiştir²⁶⁵⁻²⁶⁸. Kültür edilmiş GH'lerinde E₂ ile FSH arasındaki sinerjinin, artan FSH reseptör bağlanması, LH reseptör indüksiyonu, artan CYP17 aktivitesi ve progestin senteziyle ilişkili olduğu gösterilmiştir^{266,269}. Knecht ve ark, E₂ ile muamele edilen olgunlaşmamış sıçanlarda, FSH stimülasyonunu takiben her GH'sinde, FSH bağlanma kapasitesinin arttığını göstermişlerdir²⁷⁰. Almahbobi ve ark. da, PKOS'lu anovulatuvar kadınların antral foliküllerinden kaynaklanan GH'lerinin FSH bağlanmasının, normal ovaryumlardaki aynı büyüklükteki foliküllerden kaynaklanan GH'lerine kıyasla arttığını rapor etmişlerdir²⁷¹. Hiperandrojenizmin bir diğer nedeni de, hiperinsülinemi olabilir. Çünkü insülin, LH ile birlikte ovaryumun steroidojenik cevabını uyarır^{102,272,273}. İnsülinin LH reseptörlerini inhibe ettiğinin rapor edilmesine rağmen, sıçan ve domuz GH'lerinde FSH ile indüklenen LH reseptörlerini uyardığı gösterilmiştir²⁷⁴⁻²⁷⁶. İnsülinin, GH fonksiyonundaki rolünü irdelemek üzere PKOS'lu ve normal kadınların ovaryumlarından elde edilen GH'leri ile bir dizi çalışma yapılmıştır. Yalnız insülin ile inkübasyon, normal ovaryumların ve ovulatuvar ve anovulatuvar PKOS ovaryumlarının

GH'lerinde, artan E₂ ve P₄ üretimiyle sonuçlanmıştır ²⁷⁷. Sonuç olarak, PKOS foliküllerinin GH'lerinde insülin ve LH, steroid üretimini uyarmaktadır. Bu bulgular, PKOS ovaryumlarındaki foliküllerde bulunan GH'lerinin, gelişimin daha erken bir aşamasında LH reseptörlerini kazanarak erkenden luteinizasyon geçirdiğini ileri sürmüştür ²⁵⁸. Bu görüş, PKOS'lu GH'lerinde LH reseptörü mRNA'sının, normal foliküllerin GH'lerine kıyasla fazla eksprese edildiğini gösteren çalışmalarla da desteklenmiştir ²⁷⁸. PKOS'lu kadınların artan E₂ salgısı, fazla androjen üretimi ve dengeleyici hiperinsülinemi ile birlikte insülin direnci gösterdiği için bu faktörler, FSH'a karşı GH duyarlılığının artışı ile açıklanabilir. PKOS'lu anovulatuvar kadınların GH'leri, normal ovaryumlardaki aynı boyutlu foliküllerin GH'lerine kıyasla çok daha fazla E₂ üretirler ²⁷⁹. DHEA ile indüklenen deney hayvanlarında da, serum DHEA, T, E₂, P₄, FSH, LH ve PRL konsantrasyonları, kontrol hayvanlarına kıyasla anlamlı derecede artmıştır ^{19,136,137,141-143,178,280-285}. Biz de deneyin son gününde, gruplardaki hayvanlardan elde ettiğimiz serum örneklerinde, ELISA yöntemi ile E₂ ve P₄ tayini yaptık. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PKOS (p≤0,05) ve PKOS+İNH (p≤0,001) gruplarındaki E₂ seviyeleri anlamlı derecede artarken, Sham grupları (SY ve DMSO) ve İNH gruplarındaki E₂ seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık sergilemedi. PKOS (p≤0,001) grubundaki serum P₄ seviyesi de, kontrol grubuna kıyasla artarken, diğer deney gruplarındaki P₄ seviyeleri, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık sergilemedi. PKOS grubumuzda E₂ ve P₄ düzeylerinin kontrole göre yüksek çıkması, daha önceden yapılan çalışmalar ile paralellik göstermekteydi. E₂ seviyesinin, PKOS+İNH grubunda, PKOS grubundan da fazla artış gösterirken, İNH grubunda kontrol seviyelerinde seyretmesi, dikkat çekici bir bulguydu. İNH grubundaki E₂ seviyesinin kontrol ile paralellik gösterirken PKOS+İNH grubunda, PKOS grubundan da yüksek seviyesi, yüksek miR-21 ekspresyonu ya da başka bir mekanizma ile ilişkili olabilir ve ileri çalışmalara gereksinim duymaktadır. P₄ seviyesinin ise hem PKOS+İNH, hem de İNH grubunda, kontrol seviyelerinin altına düşmesi, mTOR inhibisyonunun P₄ üretimini ters yönde etkileyebileceğini göstermektedir.

PKOS'un bir diğer özelliği de, primordiyal folikül sayısı herhangi bir değişiklik göstermezken, büyüyen preantral ve antral foliküllerin popülasyonunun, normal ovaryumlardaki popülasyonun 2 ila 3 katını geçen belirgin folikül sayısı artışıdır ^{90,107,286,287}. Webber ve ark, sağlıklı ve PKOS'lu kadınlardan, küçük büyüyen folikülleri toplamış ve yaklaşık 2 hafta kültüre etmişlerdir ²⁸⁷. Kültürde hem PKOS'lu, hem de

normal foliküllerin çapı artmış ve büyümüştür. Ancak kültür edilmiş PKOS folikülleri, normal ovaryumların aynı aşamadaki foliküllerinden daha az miktarda atreziye uğramıştır. Ayrıca, immatür prepubertal sıçanlara DHEA uygulanması, bu hayvanlarda yüksek düzeylerde DHEA, testosteron ve androstenedion ile ilişkili olarak, oositlerde mayozun erken aktivasyonuna yol açmıştır ²⁸⁸. PKOS'daki foliküllerin olgunlaşma hatası, PKOS'lu kadınlarda azalan serum FSH düzeyleri sonucu yetersiz FSH stimülasyonuna atfedilmektedir. Fakat PKOS'lu GH'lerinin, in vitro ve in vivo da, FSH reseptörü ekspresyonları artış göstermiş ve bu hücreler FSH'a anında yanıt vermiştir ^{264,271,277}. Ek olarak PKOS'lu kadınlarda anovülasyon, dışarıdan FSH uygulamasıyla çözülebilmektedir. FSH salgısının kısmen baskılanması ve artan LH salgısı, PKOS'lu kadınlarda görülen hipotalamik GnRH sinyali üreticisinin artan aktivitesinin bir sonucu olabilir. Artan GnRH sinyal aktivitesi, FSH- β gen ekspresyonunu inhibe ederken, LH- β gen ekspresyonunu artırır ve dolayısıyla yetersiz gonadotropin salgısı PKOS'dan sorumlu iken, LH ve FSH alt birim genleri, kademeli olarak düzenlenir ²⁸⁹. Dolaşımdaki FSH'ın daha fazla azalması, kronik E₂ salgılanmasından da kaynaklanabilir. E₂ ile iki haftadan fazla tedavi gören PKOS'lu kadınlarda serum FSH düzeyleri giderek azalmış ve gonadotropinlerden FSH ve LH'ın farklı salınımı artmıştır ²⁹⁰. Zamanından önce androjen üretimi, PKOS'da duraksamış antral folikül gelişimini de açıklayabilir ²⁷⁹ Ek olarak intrinsik anormal ovaryan çevrenin foliküler duraksamaya katkıda bulunacağı düşünülmektedir ²⁷⁹. Biz de çalışmamızda, gruplar arasındaki folikül sayılarını karşılaştırmalı olarak değerlendirdik. Toplam folikül sayıları incelendiğinde, PKOS grubundaki toplam folikül sayısı, diğer gruplardakilere göre azalmıştı. PKOS grubundaki primordial, primer ve Graaf folikül sayıları, kontrol grubuna göre azalmışken; sekonder ve kistik folikül sayıları artmıştı. KL sayısı ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma sergilemekteydi. 'Oosit içi PI3K/mTOR yolu' primordial folikülden primer foliküle geçiş, oosit büyümesi, granüloza hücresinin yassı halden küboidal hale farklılaşması ve teka hücre göçünü kapsayan primordial foliküllerin aktivasyonu için anahtar bir yolaktır ^{64,291}. Transgenik fare modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, PTEN, Akt1, Foxo3, rpS6 veya Tsc1/Tsc2 yollarına ait genleri olmayan knockout farelerde, primordial foliküller erkenden tükenir ²⁹²⁻²⁹⁴. Liu ve ark, primordial folikülleri çevreleyen mikroçevrenin, pre-granüloza hücrelerindeki mTORC1-KITL sinyalini aktive ederek KIT-PI3K sinyal yolu aracılığı ile, hareketsiz oositlerin aktivasyonunu tetiklediğini göstermişlerdir ²⁹⁵.

Çalışmamızda, PKOS grubundaki yüksek seviyede bulunan mTOR aktivitesi, primordial foliküllerin aktivasyonunu hızlandırarak primordial folikül sayısının azalmasını açıklayabilir. Primer aşamada yavaşlamış folikül gelişiminin, uzayan folikül sağkalımı ile birlikte, preantral folikül birikimine yol açması da PKOS'lu kadınların ovaryumlarındaki büyüyen folikül sayısının artışıyla açıklanmaktadır. Ayrıca bu evreden sonra, PKOS'da folikül gelişimi, mid-antral aşamanın ötesine geçemez ve folikül büyümesi duraksar. Ancak duraksamadan veya folikül gelişiminin sona ermesinden sorumlu mekanizma tam olarak bilinmemektedir ve bu durumdan, prematür terminal GH farklılaşması ve yetersiz FSH salınımının sorumlu olabileceği düşünülmektedir⁹⁰. Bu gruptaki Graaf foliküllerin sayısının azalarak atreziye giden foliküllerin büyük bir çoğunluğunun kistik folikülleri oluşturması da bu bulguları desteklemektedir. Yetişkin hayvanlarda herhangi bir sebeple ovülasyonun olmaması, ovaryumda KL yokluğuyla kolayca tanınabilir. Bu grupta görülen KL azlığı, vajinal smear bulguları ile desteklendiğinde, PKOS'lu farelerin anovulatuvar ya da oligoovulatuvar oldukları gerçeğini ortaya koymaktadır ve yine total folikül sayısının azalması ile de paraleldir. PKOS+İNH grubunda, PKOS grubuna benzer şekilde primordial ve primer folikül sayıları, kontrol grubuna göre azalmışken; sekonder ve kistik folikül sayıları artmıştı. Ancak PKOS+İNH grubundaki kistik folikül sayısında, PKOS grubuna kıyasla bir düşüş söz konusuysen, atretik folikül sayısı belirgin derecede artış gösterdi. Bu bulgu da mTOR inhibisyonunun, kist oluşumunu azaltarak dejenere foliküllerin atreziye uğramasını sağladığını düşündürmektedir. Ancak bu grupta da KL sayısının az olması, mTOR inhibisyonunun, PKOS'ta ovulasyonu destekleyici bir etki göstermediğinin kanıtıdır. İNH grubundaki Graaf ve atretik folikül sayısı belirgin derecede artış gösterirken, bu gruptaki hayvanların ovaryumlarında neredeyse hiç KL görülmemesi ise, mTOR inhibisyonunun sağlıklı bir ovaryumda ovulasyonu engellediği ve foliküllerin gelişim esnasında dejenerasyona uğrayarak atreziye gittikleri gerçeğini ortaya çıkarmaktadır.

Endokrin, parakrin ve otokrin sinyallerin hepsi, GH'nde birleşerek büyümelerini ve farklılaşmalarını kontrol eder^{175,296,297}. Yaba ve ark, fare granüloza hücreleri ve folikülleri ile yaptıkları bir çalışmada, mTOR inhibisyonunun in vitro olarak azalmış GH proliferasyonu ile sonuçlandığını ve mTOR'un in vivo folikül büyümesini düzenlemek için yeni bir mitotik sağkalım kontrol noktası olarak davrandığını göstermişlerdir¹⁷⁶. Yaba ve ark, daha sonra yaptıkları bir çalışmada ise, PKOS'lu fare

ovaryumlarında hücre proliferasyonunun arttığını ve bu nedenle, mTOR'un PKOS'ta aşırı miktarda granüloza ve teka hücre proliferasyonundan ve hormonal disfonksiyondan sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir ¹⁷⁶. Bizim çalışmamızda da, gruplardaki hayvanların ovaryum dokularındaki hücre proliferasyonu, PCNA immünboyanması ile değerlendirildi. İNH grubundaki proliferatif hücrelerin, kontrol grubundaki proliferatif hücreler ile karşılaştırıldığında azaldığı gözlenirken; PKOS ve PKOS+İNH grubundaki proliferatif hücrelerin, kontrol grubundaki proliferatif hücrelere göre artış gösterdiği görüldü. PKOS grubundaki proliferasyon, daha çok GH'lerinde artmışken; PKOS+İNH grubundaki GH'lerinde PCNA pozitif hücre sayısı yok denilecek kadar azdı. Bu gruptaki proliferasyon, teka hücrelerinde artış göstermekteydi. Bu bulgular da bize, daha önceki çalışmalar ile paralel olarak, mTOR inhibisyonunun, GH proliferasyonunu azalttığını gösterdi.

PKOS'lu kadınların ovaryumları içerdikleri çok sayıdaki küçük (2-9 mm) antral foliküller nedeniyle hafifçe genişler, merkezi stroma artar ve bu foliküller genellikle perifere doğru yerleşirler ⁹⁰. PKOS'un bu farklı görünümü, her bir ovaryum için 12 folikülden fazlası veya 10 ml'den fazla ovaryum hacmi ile tanımlanmıştır (Rotterdam, 2004 a,b). Histolojik olarak büyüyen preantral ve erken antral folikül oluşumu normale benzer. Ancak mid-antral aşamadaki normal gelişim, folikül büyüme duraksaması ve dejeneratif değişimler göstermeye başlar ⁹⁰. Foliküler sıvı birikimi ve antrumun genişlemesi artarken, GH tabakası apoptoza uğrar ve giderek daha fazla atretik hale gelir. Sonunda folikül duvarı GH'lerinden yoksun hale gelerek ince duvarlı bir kist görünümünü alır ve kistik folikülleri şekillendirir. Atretik foliküller, artan TUNEL, FasL, işlenmiş kaspaz-8 ve MT1-MMP mRNA düzeyleriyle ilişkilendirilmiştir ^{288,298}. Çalışmamızda, ovaryum dokularındaki apoptotik hücreler, Cas-3 immünreaksiyonu ile değerlendirildiğinde, DMSO, PKOS ve PKOS+İNH gruplarındaki apoptotik hücrelerin, kontrol grubundaki apoptotik hücrelere kıyasla artmış olduğu gözlemlendi. DMSO grubundaki apoptotik hücrelerin, daha çok stromal hücreler olması, çözgen maddenin bir etkisi olabileceğini düşündürdü. PKOS grubundaki büyüyen foliküllere ait GH'lerinin çoğunun apoptotik olmasıyla birlikte, bu foliküllerdeki oositlerde de yoğun Cas-3 immünreaksiyonu izlenmesi, PKOS'da mid-antral foliküllerin büyümeye devam etmeyerek atreziye yönlendiğine işaret etmekteydi. Bulgularımız, daha önceki çalışmalarla da paralellik göstermekteydi. PKOS+İNH grubunda, atreziye doğru giden foliküllerde de yer yer Cas-3 pozitif GH'lerin gözlenmesi, ancak oranın PKOS

grubundakine göre düşük olması, mTOR inhibisyonunun yanısıra, bu gruptaki yüksek miR-21 seviyelerinin de apoptozu engelliyor olabileceğini akla getirmektedir. Çünkü, pro-survival olan miR-21, murin granuloza hücrelerinde LH ile yüksek derecede indüklenmiş ve in vitro olarak miR-21 aktivitesinin baskılanması GH apoptozuna yol açmıştır ²⁹⁹. Bu etkisinden dolayı miR-21 seviyesinin artışı, GH apoptozunu engelleyecektir. Yine bu grupta kistik folikül sayısının PKOS grubuna göre bir miktar azalırken atretik folikül sayısının da bir miktar artması, foliküllerin kistik yapılara dönüşmek yerine atreziye yöneldiklerini desteklemektedir. DMSO grubunda apoptozun yüksek olmasına rağmen, aynı çözügen maddenin kullanıldığı İNH grubunda apoptotik hücre seviyesinin kontrol seviyelerinde olması da, bu gruptaki nispeten yüksek miR-21 seviyesi ile açıklanabilmekte ve bu hipotezimizi güçlendirmektedir.

Zhang ve arkadaşları PKOS'lu hastalarda, kontrol bireylere kıyasla daha yüksek fosforile AKT (p-AKT) ifadesi olduğunu raporlamıştır ¹⁷⁴. PKOS hastaları, homeostaz model değerlendirme-insülin direnci (HOMA-IR) indeksine dayanarak, insülin direnci olan ve insülin direnci olmayan şeklinde gruplandırıldığında, insülin direnci grubunun p-AKT seviyesinin, insülin direnci olmayan gruba göre daha yüksek bir ifadeye sahip olduğu bulunmuştur ⁶². Roa ve ark, ergenlik başlangıcı ve LH salgılanmasının kontrolünde, mTOR'un önemli bir rol oynadığını belirtmiştir ¹⁸. Bununla birlikte, mTOR sinyal yolu rapamisin tarafından baskılandığında, pubertede gonadotropik aksın inhibisyonuna, östradiol ve LH seviyelerini azaltmaya, vajinal açıklığı önemli ölçüde geciktirmeye ve uterus ve yumurtalık atrofisine neden olur. mTOR, p70S6K kinaz ve 40S ribozomal protein S6'nın fosforillenmesi yoluyla translasyonun başlatılmasını teşvik eder ¹⁷⁵. Yaba ve Demir, p-mTOR ifadesinin PKOS'lu farelerde, kontrol ile karşılaştırıldığında arttığını ve mTORC1 ve mTORC2'nin PKOS gelişiminde önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir ¹⁹. Yaba ve Demir başka bir çalışmalarında ise mTOR'un, mitotik bir sağkalım kontrol noktası olarak çalışarak, folikül büyümesini in vivo olarak düzenleyebildiğine dikkat çekmişlerdir ¹⁷⁶. Ayrıca aynı çalışmada Rapamisin tarafından inhibe edilen mTOR aktivasyonunun, in vitro folikül büyümesini ve granuloza hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir ¹⁷⁶. Biz de çalışmamızda, gruplardaki hem mTOR, hem de fosforile mTOR (P-mTOR) ekspresyon seviyelerini inceledik. mTOR ekspresyonu, PKOS+İNH ve İNH gruplarında, kontrole kıyasla azalırken, PKOS grubunda anlamlı derecede artmıştı. P-mTOR (Ser-2448) ve P-mTOR (Ser-2481) ekspresyonları da, PKOS grubundaki hücrelerde artarken, PKOS+İNH ve

İNH grubundaki hücrelerde, kontrol grubundaki hücelere kıyasla anlamlı derecede azalmıştı. Bu bulgular hem daha önceki çalışmalar ile paralellik gösterirken, hem de mTOR inhibisyonunun doğru bir şekilde gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır.

miRNA'lar hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozu ve hormon biyosentezi ve salınımı gibi çeşitli önemli hücrel fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynarlar¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ ve GH proliferasyonu ve apoptozunda görev alırlar²¹. miRNA ekspresyonu, organa spesifiktir ve organ fonksiyonu ile, özellikle de ovaryum ile yakından ilişkilidir. Ovaryumda eksprese edilen miRNA'lar memeli üremesinin düzenlenmesinde görev alırlar²¹⁰. miRNA ekspresyonu ve fonksiyonu, farklı hücre türleriyle ilişkilidir. Biyoinformatik ve gen ontolojisi analizleri, ovaryumda ağırlıklı olarak eksprese edilen miRNA'ların hedef genlerinin, hücrenin siklus düzenlenmesi, büyümesi, proliferasyonu ve apoptozunda, endokrin sistem hastalıklarında ve ovaryan fonksiyonlarda görev aldığını göstermiştir²⁰³. İnsan PKOS ovaryumlarında, normale kıyasla, ayrımsal gen ekspresyonu analizleri yapılmıştır²¹⁷. Retinoik asit biyosentezi ve LH'a cevap veren genler de dahil olmak üzere steroidogenezde görev alan genler, genellikle PKOS'lu bireylerin teka hücrelerinde upregüle edilirken²¹⁸; Wnt sinyalleşmesi ve ovaryum folikülogeneziyle ilişkili genler downregüle edilmektedir²¹⁹⁻²²⁰. Ovaryan apoptotik genler PKOS'da değişikliğe uğramasına rağmen, bu değişimlerin net etkisi belirsizdir²¹⁹. Yardımcı üreme tedavisi gören kadınların granüloza/kümüülüs hücrelerinde miR-23b, miR-542-3p, miR-211 ve miR-17-5p ayrımsal ekspresyonları, miRNA ekspresyonunun dişi infertilitesinde altta yatan etioloji olabileceğini akla getirmektedir³⁰⁰⁻³⁰¹. Dahası miRNA'ların obezite, insülin direnci dahil olmak üzere metabolik sendromlar²²⁷ ve sıklıkla PKOS ile ilişkili koşullarda rol oynadığını göstermiştir. miR-222'nin fazla ekspresyonu, azalan ER α proteini ve ER α hedef genlerinin sinyalleşmesine ek olarak ekspresyonuyla da ilişkilendirilmiştir. miR-132 ve miR-320 polikistik ovaryuma sahip hastaların foliküler sıvılarında, normal kontrole kıyasla anlamlı derecede azalmış düzeylerde eksprese olmaktadır. Ek olarak PKOS hastalarında miR-132, miR-320, miR-520c-3p, miR-24 ve miR-222 östrojen konsantrasyonlarını düzenler ve miR-24, miR-193b, ve miR-483-5p PKOS hastalarında P₄ konsantrasyonunu düzenler. miR-93 PKOS'da fazla eksprese olur ve GLUT4 ve artan IR ile ilişkilidir²²⁸. miR-21, miR-27b, miR-103 ve miR-155 metabolik süreçlerde önemli roller oynar ve PKOS hastalarında obezite ve dolaşımdaki androjen konsantrasyonlarından etkilenir²³. Foliküler aşamada miR-199a-3p, miR-145

ve miR-31 fazlaca eksprese olur ve foliküler-luteal geçişte anlamlı bir azalma gösterir. Buna karşın miR-503, miR-21 ve miR-142-3p genel olarak foliküler aşamalarda düşük düzeylerde eksprese olur ve luteal dokularda anlamlı artışlar gösterir ²⁰⁹. Bizim çalışmamızda da, gruplar arasında, miR-21 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, PKOS ve PKOS+İNH gruplarındaki miR-21 ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı. miR-21'in fazla ekspresyonu, PTEN downregülasyonuna ve PI3-kinaz-Akt yolağı üzerinden daha aktif bir sinyalleşmeye yol açabileceği hipoteziyle uyumlu şekilde, apoptoza daha az yatkın kanser hücrelerinin oluşturulması ve miR-21 ekspresyonun artması, PI3K/Akt/mTOR yolağının aktivasyonu ile ilişkilidir ²³⁵. Ancak, Rapamisin aksine KU-0063794, SGK1 aktivitesini ve Ser⁴²² fosforilasyonunu inhibe ederken forbol esterinin indüklediği ERK veya RSK fosforilasyonunu ve RSK aktivasyonunu inhibe etmez. İnhibisyon gruplarındaki yüksek ekspresyon seviyelerinin nedeni, miR-21 ekspresyonunun bu yolaklar üzerinden devam etmesi olabilir.

Bütün bu verilerin yanısıra, yaptığımız morfolojik değerlendirmelerde, PKOS grubundaki oosit, ZP ve GH'lerinde ciddi morfolojik dejenerasyonlar görüldü. Hayvanlar oligoovulatuvar ya da anovulatuvarı. Ayrıca ovulasyon gerçekleşse bile, ovule edilen oosit dejeneratifti. PKOS+İNH grubundaki hayvanlarda da PKOS grubuna benzer dejenerasyonların devam etmesi, KU-0063794 aracılığı ile mTOR inhibisyonunun, PKOS tedavisinde çok başarılı bir sonuç oluşturamayacağına işaret etmektedir. İNH grubumuzda da, sağlıklı bir ovaryumda mTOR inhibisyonunun, oosit ve GH dejenerasyonu, folikül atrezisi, foliküler gelişimin duraksaması ve anovulasyon ile sonuçlanması, bu hipotezimizi güçlendirmektedir. Ancak daha net veriler elde edilmesi açısından, ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Belosi C, Selvaggi L, Apa R, Guido M, Romualdi D, Fulghesu AM, Lanzone A. (2006). Is the PCOS diagnosis solved by ESHRE/ASRM 2003 consensus or could it include ultrasound examination of the ovarian stroma? *Hum Reprod*, 21:3108-3115.
2. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. (2002). Developmental origin of polycystic ovary syndrome-a hypothesis. *J Endocrinol*, 174:1-5.
3. Voutilainen R, Franks S, Mason HD, Martikainen H. (1996). Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, and IGF receptor messenger ribonucleic acids in normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:1003-1008.
4. Burger CW, Korsen T, van Kessel H, van Dop PA, Caron FJ, Schoemaker J. (1985). Pulsatile luteinizing hormone patterns in the follicular phase of the menstrual cycle, polycystic ovarian disease (PCOD) and non-PCOD secondary amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*, 61:1126-1132.
5. Berga SL, Yen SS. (1989). Opioidergic regulation of LH pulsatility in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol*, 30:177-184.
6. Ehrmann DA. (2005). Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 352:1223-1236.
7. Chang RJ. (2004). A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 191:713-717.
8. Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A. (1987). Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 65:499-507.
9. Adams J, Polson DW, Franks S. (1986). Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 293:355-359.
10. Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Williamson R, McCarthy M. (1997). The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, 12:2641-2648.
11. Kahsar-Miller M, Azziz R. (1998). The development of the polycystic ovary syndrome: family history as a risk factor. *Trends Endocrinol Metab*, 9:55-58.
12. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124:471-484.
13. Chiang GG, Abraham RT. (2007). Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med*, 13:433-442.
14. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today*, 12:112-124.
15. Martin DE, Hall MN. (2005). The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol*, 17:158-166.
16. Schmelzle T, Hall MN. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103:253-262.
17. Yang Q, Guan KL. (2007). Expanding mTOR signaling. *Cell Res*, 17:666-681.
18. Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, Sanchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Romero M, Aguilar E, Lopez M, Gaytan F, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. (2009). The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology*, 150:5016-5026.
19. Yaba A, Demir N. (2012). The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Journal of Ovarian Research*, 5:38.
20. Li Y, Fang Y, Liu, Yang X. (2015). MicroRNAs in ovarian function and disorders. *Journal of Ovarian Research*, 8:51.
21. Yang X, Zhou Y, Peng S, Wu L, Lin HY, Wang S. (2012). Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of miR-23a in granulosa cell apoptosis. *Reproduction*, 144:235-44.
22. Zheng H, Zhang L, Zhao Y, Yang D, Song F, Wen Y. (2013). Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *Plos One*, 8:77853.

23. Murri M, Insenser M, Fernandez-Duran E, San-Millan JL, Escobar-Morreale HF. (2013). Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 98:1835-44.
24. Jin Gyoung Jung, Duk Kyung Kim, Tae Sub Park, Seon Duk Lee, Jeong Mook Lim, Jae Yong Hana. (2005). Development of Novel Markers for the Characterization of Chicken Primordial Germ Cells. *Stem Cells*, 23(5):689-98.
25. Moore KL, Persaud TVN. (2013). *The Developing Human; Clinically Oriented Embryology*. Philadelphia. Elsevier.
26. Sadler TW. (2017). *Langman Medikal Embriyoloji*. Ankara. Palme Yayınevi.
27. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. (2015). *Larsen's Human Embryology*. Philadelphia. Elsevier.
28. Yamaji M, Tanaka T, Shigeta M, Chuma S, Saga Y, Saitou M. (2010). Functional reconstruction of NANOS3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of NANOS3. *Reproduction*, 139:381-393.
29. Beck ARP, Miller IJ, P. Anderson, Streuli M. (1998). RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. Cell Biology*, 95:2331-2336.
30. Donovan PJ. (1994). Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. *Curr Top Dev Biol*, 29:189-225.
31. De Felici M, Pesce M. (1994). Interactions between migratory primordial germ cells and cellular substrates in the mouse. *Ciba Found Symp*, 182:140-53.
32. Matsui Y. (1998). Regulation of germ cell death in mammalian gonads. *APMIS*, 106(1):142-148.
33. De Felici M, Dolci S, Pesce M. (1992). Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture. *Int. J. Dev. Biol*, 36:205-213.
34. Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Satot M, Fujimotot H, Furusawa M, Nocet T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. Developmental Biology*, 91:12258-12262.
35. Maatouk DM, Resnick JL. (2003). Continuing primordial germ cell differentiation in the mouse embryo is a cell-intrinsic program sensitive to DNA methylation. *Developmental Biology*, 258:201-208.
36. Encinas G, Zogbi C, Stumpp T. (2012). Detection of four germ cell markers in rats during testis morphogenesis: differences and similarities with mice. *Cells Tissues Organs*, 195(5):443-55.
37. Leatherman JL, Kaestner KH, Jongens TA. (2000). Identification of a mouse germ cell-less homologue with conserved activity in Drosophila. *Mech Dev*, 92(2):145-53.
38. Li W, Deng F, Wang H, Zhen Y, Xiang F, Sui Yand Y, Li J. (2006). Germ cell-less expression in zebrafish embryos. *Develop. Growth Differ*, 48:333-338
39. Wang D, Ikeda Y, Parker KL, Enders GC. (1997). Germ cell nuclear antigen (GCNA1) expression does not require a gonadal environment or steroidogenic factor 1: examination of GCNA1 in ectopic germ cells and in Ftz-F1 null mice. *Mol Reprod Dev*, 48(2):154-8.
40. Kimura T, Yomogida K, Iwai N, Kato Y, Nakano T. (1999). Molecular cloning and genomic organization of mouse homologue of Drosophila germ cell-less and its expression in germ lineage cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 262(1):223-30.
41. Lerit AD, C.W. Shebelut CW, Lawlor KJ, Rusan NM, Gavis ER, Schedl P, Deshpande G. (2017). Germ cell-less promotes centrosome segregation to induce germ cell formation. *Cell Rep*, 18(4): 831-839.
42. Ross WH, Pawlina W. (2006). *Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.
43. Yıldırım M. (2003). *İnsan Anatomisi*. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi.
44. Henry Gray. (1999). *Anatomy, Descriptive and Surgical, The Unabridged Gray's Anatomy*. Philadelphia. Running Press.
45. Chung KW. (2000). *Gross Anatomy*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.
46. Martini F. (2001). *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. New Jersey. Prentice Hall.
47. Kierszenbaum AL. (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş*. Ankara. Palme yayıncılık.
48. Gartner LP, Hiatt JL. (2007). *Color text book of histology*. Philadelphia. Elsevier.

49. Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. (2006). *Wheater's functional histology: A text and colour atlas*. Philadelphia. Elsevier.
50. Granner DK, Rodwell VW, Mayes PA, Murray RK. (1993). *Harper'in biyokimyası*. Ankara. Barış kitabevi.
51. Ganong WF. (2001). *Tıbbi Fizyoloji*. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi.
52. Guyton AC, Hall JE. (2007). *Tıbbi Fizyoloji*. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi.
53. <https://abdominalkey.com/ovarian-hormones-structure-biosynthesis-function-mechanism-of-action-and-laboratory-diagnosis/>
54. Franks S. (1995). Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 333(13):853-61.
55. Evidence-Based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndrome. Melbourne: Jean Hailes Foundation for Women's Health on Behalf of the PCOS Australian Alliance. (2011).
56. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med*, 12(7):324-332.
57. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. (2010). The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*, 25(2):544-551.
58. Boyle JA, Cunningham J, O'Dea K, Dunbar T, Norman RJ. (2012). Prevalence of polycystic ovary syndrome in a sample of Indigenous women in Darwin, Australia. *Med J*, 196(1):62-66.
59. Yildiz BO, Bozdag G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. (2012). Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod*, 27(10): 3067-3073.
60. Everett JW. (1964). Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. *Physiol Rev*, 44:373-431.
61. McCormack CE, Sridaran R. (1978). Timing of ovulation in rats during exposure to continuous light: evidence for a circadian rhythm of luteinizing hormone secretion. *J Endocrinol*, 76:135-44.
62. Liu AL, Liao HQ, Li ZL, Liu J, Zhou CL, Guo ZF, Xie HY, Peng CY. (2016). New Insights into mTOR Signal Pathways in Ovarian-Related Diseases: Polycystic Ovary Syndrome and Ovarian Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(12):5087-5094.
63. Xing Y, Liu YX, Liu X, Wang SL, Li P, Lin XH, Sui CL, Xu C, Qi B, Tong Q. (2017). Effects of Gui Zhu Yi Kun formula on the P53/AMPK pathway of autophagy in granulosa cells of rats with polycystic ovary syndrome. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13:3567-3573.
64. He Y, Peng X, Wu T, Yang W, Liu W, Zhang J, Su Y, Kong F, Dou X, Li J. (2017). Restricting the induction of NGF in ovarian stroma engenders selective follicular activation through the mTOR signaling pathway. *Cell Death and Disease*, 8:2817.
65. Song X, Shen Q, Fan L, Yu Q, Jia X, Sun Y, Bai W, Kang J. (2018). Dehydroepiandrosterone-induced activation of mTORC1 and inhibition of autophagy contribute to skeletal muscle insulin resistance in a mouse model of polycystic ovary syndrome. *Oncotarget*, 9(15):11905-11921.
66. Wu Y, Li P, Zhang D, Sun Y. (2018). Metformin and pioglitazone combination therapy ameliorate polycystic ovary syndrome through AMPK/PI3K/JNK pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15:2120-2127.
67. Beys E, Hodge T, Nohynek GJ. (1995). Ovarian changes in Sprague-Dawley rats produced by nocturnal exposure to low intensity light. *Lab Anim*, 29:335-8.
68. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 81(1):19-25
69. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF (2006). Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(11):4237-4245
70. Livadas S, Diamanti-Kandarakis E. (2013). Polycystic Ovary Syndrome: Definitions, Phenotypes and Diagnostic Approach. *Front Horm Res*, 40:1-21.
71. Singh KB. (1969). Induction of polycystic ovarian disease in rats by continuous light. I. The reproductive cycle, organ weights, and histology of the ovaries. *Am J Obstet Gynecol*, 103:1078-83.
72. Singh KB. (1969). Persistent estrus: an experimental model of the polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Surv*, 24:2-17.

73. Bradshaw M, Critchlow V. (1966). Pituitary concentration of luteinizing hormone in three types of “constant estrous” rats. *Endocrinology*, 78:1007-14.
74. Lowton IE, Schwartz NB. (1967). Pituitary ovarian function in rats exposed to constant light: a chronological study. *Endocrinology*, 81:497.
75. Teede HJ, Hutchison SK, Zoungas S. (2007). The management of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab*, 18(7):273-279
76. Meyer C, McGrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, Teede HJ. (2005). Vascular dysfunction and metabolic parameters in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(8): 4630-4635
77. Hart R, Doherty DA. (2015). The potential implications of a PCOS diagnosis on a woman’s long-term health using data linkage. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(3):911-919
78. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). (2001). *JAMA*, 285(19):2486-97.
79. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C, et al. (1995). Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod*, 10(8):2107-11.
80. Sir-Petermann T, Codner E, Perez V, Echiburru B, Maliqueo M, Ladron de Guevara A, et al. (2009). Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(6):1923-30.
81. Carson RS, Zhang Z, Hutchinson LA, Herington AC, Findlay JK. (1989). Growth factors in ovarian function. *J Reprod Fertil*, 85(2):735-46.
82. Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. (2002). Relationship between serum mullerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril*, 77(1):141-6.
83. Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C, Carrillo A. (1997). Mullerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril*, 67(5):962-5.
84. Wild RA. (2002). Long-term health consequences of PCOS. *Hum Reprod Update*, 8(3):231-41.
85. Takeo Y. (1984). Influence of continuous illumination on estrous cycle of rats: time course of changes in levels of gonadotropins and ovarian steroids until occurrence of persistent estrus. *Neuroendocrinology*, 39:97-104.
86. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. (2006). Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(6):2100-2104
87. Hayes MG, Urbanek M, Ehrmann DA, et al. (2015). Reproductive Medicine Network. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nat Commun*, 6:7502
88. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. (2006). A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*, 12(6): 673-683
89. Doherty DA, Newnham JP, Bower C, Hart R. (2015). Implications of polycystic ovary syndrome for pregnancy and for the health of offspring. *Obstet Gynecol*, 125(6):1397-1406
90. Chang RJ, Cook-Andersen H. (2013). Disordered follicle development. *Mol Cell Endocrinol*, 373(0):51-60.
91. Stepto NK, Cassar S, Joham AE, et al. (2013). Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp. *Hum Reprod*, 28(3):777-784
92. Dunaif A, Scully RE, Andersen RN, Chapin DS, Crowley WF Jr. (1984). The effects of continuous androgen secretion on the hypothalamic-pituitary axis in women: evidence from a luteinized thecoma of the ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 59:389-393.
93. Erickson GF, Magoffin DA, Jones KL. (1989). Theca function in polycystic ovaries of a patient with virilizing congenital adrenal hyperplasia. *Fertil. Steril*, 51:173-176.
94. Barnes RB, Rosenfield RL, Ehrmann DA, Cara JF, Cuttler L, Levitsky LL, Rosenthal IM. (1994). Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 79:1328-1333.
95. Futterweit W, Deligdisch L. (1986). Histopathological effects of exogenously administered testosterone in 19 female to male transsexuals. *J. Clin Endocrinol. Metab*, 62:16-21.

96. Spinder T, Spijkstra JJ, van den Tweel JG, Burger CW, van Kessel H, Hompes PG, Gooren LJ. (1989). The effects of long term testosterone administration on pulsatile luteinizing hormone secretion and on ovarian histology in eugonadal female to male transsexual subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 69:151-157.
97. Chadha S, Pache TD, Huikeshoven FJM, Brinkmann AO, van der Kwast TH. (1994). Androgen receptor expression in human ovarian and uterine tissue of long term androgen-treated transsexual women. *Human Path*, 25:1198-1204.
98. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. (1998). Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J. Clin. Invest*, 101:2622-2629.
99. Bronstein J, Tawdekar S, Liu Y, Pawelczak M, David R, Shah B. (2011). Age of onset of polycystic ovarian syndrome in girls may be earlier than previously thought. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 24(1):15-20.
100. Franks S. (2002). Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16(2):263-72.
101. Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. (2006). The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*, 12 (4):351-61.
102. Franks S, Gilling-Smith C, Watson H, Willis D. (1999). Insulin action in the normal and polycystic ovary. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 28(2):361-78.
103. Franks S, Comim F, Hardy K. (2012). Involvement of local factors in aberrant follicle development. *ESHRE Campus Symposium*, 19-21.
104. Shannon L. Byers¹, Michael V. Wiles², Sadie L. Dunn¹, Robert A. Taft. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PlosOne*, 7(4):35538.
105. Ekambaram G, Kumar SKS, Joseph LD. (2017). Comparative Study on the Estimation of Estrous Cycle in Mice by Visual and Vaginal Lavage Method. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(1):05-07.
106. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. (2003). Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*, 362:1017-1021.
107. Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, Erickson GF. (2004). Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 89:5321-5327.
108. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383:531-535.
109. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF. (2002). Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 87:1337-1344.
110. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. (2004). Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol. Hum. Reprod*, 10:77-83.
111. Stubbs SA, Hardy K, Da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Themmen AP, Visser JA, Groome NP, Franks S. (2005). Anti-mullerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 90:5536-5543.
112. Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, Mason H. (2007). Granulosa cell production of anti-Mullerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 92:240-245.
113. van Houten ELAF, Visser JA. (2014). Mouse models to study polycystic ovary syndrome: A possible link between metabolism and ovarian function? *Reproductive Biology*, 4:32-43.
114. Shi D, Vine DF. (2012). Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility*, 98(1):185-193.
115. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. (2007). Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord*, 8:127-41.
116. Joham AE, Palomba S, Hart R. (2016). Polycystic Ovary Syndrome, Obesity, and Pregnancy. *Semin Reprod Med*, 34(2):93-101.
117. Schoot DC, Harlin J, Shoham Z, Mannaerts BM, Lahlou N, Bouchard P, Bennink HJ, Fauser BC. (1994). Recombinant human follicle-stimulating hormone and ovarian response in gonadotrophin deficient women. *Hum. Reprod*, 9:1237-1242.

118. Jokubkiene L, Sladkevicius P, Valentin L. (2012). Ovarian size and vascularization as assessed by three-dimensional grayscale and power Doppler ultrasound in asymptomatic women 20–39 years old using combined oral contraceptives. *Contraception*, 86:257-267.
119. Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Vinales GC, Webb R, (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate: a review. *Reprod. Fertil. Dev*, 23:444-467.
120. Zhao JZ, Zhou W, Zhang W, Ge HS, Huang XF, Lin JJ. (2009). In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries in infertile women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril*, 91:2568-2571.
121. Delvigne A, Rozenberg S. (2002). Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum. Reprod*, 8:559-577.
122. Sugiyama N, Barros RP, Warner M, Gustafsson JA. (2010). ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 21(9):545-52.
123. Moore AM, Prescott M, Campbell RE. (2013). Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic ovarian syndrome. *Endocrinology*, 154(2):796-806.
124. Roland AV, Moenter SM. (2011). Prenatal androgenization of female mice programs an increase in firing activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons that is reversed by metformin treatment in adulthood. *Endocrinology*, 152(2):618-28.
125. Roland AV, Nunemaker CS, Keller SR, Moenter SM. (2010). Prenatal androgen exposure programs metabolic dysfunction in female mice. *J Endocrinol*, 207(2): 213-23.
126. Sullivan SD, Moenter SM. (2004). Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(18):7129-34.
127. Beloosesky R, Gold R, Almog B, Sasson R, Dantes A, Land-Bracha A, et al. (2004). Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *Int J Mol Med*, 14(2):207-15.
128. Demissie M, Lazic M, Foecking EM, Aird F, Dunaif A, Levine JE. (2008). Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am J Phys Endocrinol Metab*, 295(2):262-268.
129. Hillier SG, Ross GT. (1979). Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol Reprod*, 20(2):261-8.
130. Tyndall V, Broyde M, Sharpe R, Welsh M, Drake AJ, McNeilly AS. (2012). Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats. *Reproduction*, 143(1):21-33.
131. Edwards DA. (1971). Neonatal administration of androstenedione, testosterone or testosterone propionate: effects on ovulation, sexual receptivity and aggressive behavior in female mice. *Physiol Behav*, 6(3):223-8.
132. Loughlin T, Cunningham S, Moore A, Culliton M, Smyth PP, McKenna TJ. (1986). Adrenal abnormalities in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 62(1):142-7.
133. Abbott DH, TA, Dumesic DA. (2009). Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Am J Primatol*, 71:776-84.
134. Abbott DH, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW, Dumesic DA. (2002). Prenatal androgen excess programs for PCOS in female rhesus monkeys. In: Polycystic ovary syndrome. *New York: Marcel Dekker*, 119-33.
135. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Abbott DH, Recabarren SE, Herkimer C. (2010). Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to off-spring of overweight females. *Endocrinology*, 151:595-605.
136. Birch RA, Padmanabhan V, Foster DL, Unsworth WP, Robinson JE. (2003). Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: fetal androgen exposure produces progressive disruption of reproductive cycles in sheep. *Endocrinology*, 144:1426-34.
137. McNeilly AS, Duncan WC. (2013). Rodent models of polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 373:2-7.
138. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. (2005). Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update*, 11:357-74.
139. Goy RW, Bercovitch FB, McBair MC. (1988). Behavioral masculinization is independent of genital masculinization in prenatally androgenized female rhesus macaques. *Horm Behav*, 22:552-71.

140. Unsworth WP, Taylor JA, Robinson JE. (2005). Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: the effect of prenatal androgens on the development of estrogen positive feedback and ovarian cycles in the ewe. *Biol Reprod*, 72:619-27.
141. Sander V, Solano ME, Elia E, Luchetti CG, Di Girolamo G, Gonzalez C, et al. (2005). The influence of dehydroepiandrosterone on early pregnancy in mice. *Neuroimmunomodulation*, 12(5):285-92.
142. Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, et al. (2006). The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod*, 12(8): 475-81.
143. Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Elia E, Di Girolamo G, Gonzalez C, et al. (2006). Role of the N,N0-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*, 131(3):591-602.
144. Solano ME, Sander VA, Ho H, Motta AB, Arck PC. (2011). Systemic inflammation, cellular influx and up-regulation of ovarian VCAM-1 expression in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Reprod Immunol*, 92(1-2):33-44.
145. Chapman JC, Min SH, Freeh SM, Michael SD. (2009). The estrogen-injected female mouse: new insight into the etiology of PCOS. *Reprod Biol Endocrinol*, 7:47.
146. Domecq JP, Prutsky G, Mullan RJ, et al. (2013). Adverse effects of the common treatments for polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 98:4646-54.
147. Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, et al. (1995). Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res*, 1:53-71.
148. Eskelinen EL, Prescott AR, Cooper J, Brachmann SM, Wang L, et al. (2002). Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic*, 3:878-893.
149. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, et al. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110:163-175.
150. Kim DH, Sabatini DM. (2004). Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Current Topics in Microbiological Immunology*, 279:259-270.
151. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, 493:338-45.
152. Laplante M, Sabatini DM. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149:274-93.
153. Lee d Y (2015). Roles of mTOR Signaling in Brain Development. *Exp Neurobiol*, 24:177-85.
154. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Regg MA, et al. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6:1122-1128.
155. Wullschlegel S, Loewith R, Oppliger W, Hall MNN. (2005). Molecular organization of TOR complex 2. *J Biol Chem*, 280(35):30697-30704.
156. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, et al. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and akt/pkb. *Mol Cell*, 22:159-168.
157. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschlegel S, Deak M, Ibrahim AF, Gourlay R, Magnuson MA, Alessi DR. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 405:513-522.
158. Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenou P, Arriemerlou C, Hall MN. (2007). PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One*, 2:1217.
159. Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. (2007). PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem*, 282:25604-25612.
160. Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J (2014). Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res*, 114:549-64.
161. Badura S, Tesanovic T, Pfeifer H, Wystub S, Nijmeijer BA, Liebermann M, Falkenburg JHF, Ruthardt M, Ottmann OG. (2013). Differential effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Plos One*, 8:80070.
162. Huang S, Houghton PJ (2003). Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol*, 3:371-7.

163. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30:214-26.
164. Yip PY. (2015). Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 4:165-76.
165. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126:955-68.
166. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144.
167. Ashworth RE, Wu J. (2014). Mammalian target of rapamycin inhibition in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, 6:776-82.
168. Dibble CC, Asara JM, Manning BD. (2009). Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*, 29:5657-70.
169. Lyu D, Yu W, Tang N, Wang R, Zhao Z, Xie F, He Y, Du H, Chen J. (2013). The mTOR signaling pathway regulates pain-related synaptic plasticity in rat entorhinal-hippocampal pathways. *Mol Pain*, 9:64.
170. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. (2008). Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*, 8:393-412.
171. Gingras A, Raught B, Sonenberg N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*, 15:807-826.
172. Rousseau D, Gingras A, Pause A, Sonenberg N. (1996). The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* 13:2415-2420.
173. Lipton JO, Sahin M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron*, 84:275-91.
174. Zhang HY, Zhang YF, Han YK, Xue FX, Zhao XH, Zhang XL. (2012). Activation and significance of the PI3K/Akt pathway in endometrium with polycystic ovary syndrome patients. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 47:19-23.
175. Alam H, Maizels ET, Park Y, Ghaey S, Feiger ZJ, Chandel NS, Hunzicker-Dunn M. (2004). Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol Chem*, 279:19431-40.
176. Yu J, Yaba A, Kasiman C, Thomson T, Johnson J. (2011). mTOR Controls Ovarian Follicle Growth by Regulating Granulosa Cell Proliferation. *Plos One*, 6 (7).
177. Allemand MC, Irving BA, Asmann YW, Klaus KA, Tatpati L, Coddington CC, Nair KS. (2009). Effect of testosterone on insulin stimulated IRS1 Ser phosphorylation in primary rat myotubes--a potential model for PCOS-related insulin resistance. *PLoS One*, 4:4274.
178. Tessaro I, Modena SC, Franciosi F, Sivelli G, Terzaghi L, Lodde V, Luciano AM. (2015). Effect of oral administration of low-dose follicle stimulating hormone on hyperandrogenized mice as a model of polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res*, 8:64.
179. Mallon R, Feldberg LR, Lucas J, Chaudhary I, Dehnhardt C, Santos ED, Chen Z, dos Santos O, Ayrall-Kaloustian S, Venkatesan A, Hollander I. (2011). Antitumor efficacy of PKI-587, a highly potent dual PI3K/mTOR kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*, 17:3193-203.
180. Hong ZI, Xiao M, Yang Y, Han Z, Cao Y, Li C, Wu Y, Gong Q, Zhou X, Xu D, Meng L, Ma D, Zhou J. (2011). Arsenic disulfide synergizes with the phosphoinositide 3-kinase inhibitor PI-103 to eradicate acute myeloid leukemia stem cells by inducing differentiation. *Carcinogenesis*, 32:1550-8.
181. Shah KN, Patel SS (2016). Phosphatidylinositide 3-kinase inhibition: A new potential target for the treatment of polycystic ovarian syndrome. *Pharm Biol*, 54:975-83.
182. Sivalingam VN, Myers J, Nicholas S, Balen AH, Crosbie EJ (2014). Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. *Hum Reprod Update*, 20:853-68.
183. Zhao Y, Zhang C, Huang Y, Yu Y, Li R, Li M, Liu N, Liu P, Qiao J. (2015). Up-regulated expression of WNT5a increases inflammation and oxidative stress via PI3K/AKT/NF-kappaB signaling in the granulosa cells of PCOS patients. *J Clin Endocrinol Meta*, 100:201-11.
184. Kim VN. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*, 19:1-15.
185. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-6.

186. Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116:281-97.
187. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75:843-54.
188. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9:654-9.
189. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 285:17442-52.
190. PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:10513-8.
191. Imbar T, Eisenberg I. (2014). Regulatory role of microRNAs in ovarian function. *Fertil Steril*, 101:1524-30.
192. Baley J, Li J. (2012). MicroRNAs and ovarian function. *J Ovarian Res*, 5:8.
193. Morohaku K, Hoshino Y, Sasada H, Sato E. (2013). Incorporation of phosphatase inhibitor in culture prompts growth initiation of isolated non-growing oocytes. *PLoS One*, 8:77533.
194. Boyer A, Lapointe E, Zheng X, Cowan RG, Li H, Quirk SM, DeMayo FJ, Richards JS, Boerboom D. . (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J*, 24:3010-25.
195. Fenwick MA, Mora JM, Mansour YT, Baithun C, Franks S, Hardy K. (2013). Investigations of TGF- β signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. *Endocrinology*, 154:3423-36.
196. Slack J, Weidhaas JB. (2008). MicroRNA in cancer prognosis. *N. Engl. J. Med*, 359:2720-2722.
197. Kim VN, Han J, Siomi MC. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 10:126-139.
198. Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10:413.
199. Yang JS, Lai EC. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell*, 43:892-903.
200. Kim VN. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 6:376-385.
201. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell*, 27:91-105.
202. Filellaa X, Foja L. (2017). miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med*, 55(5):715-736.
203. Sun Y, Koo S, White N, Peralta E, Esau C, Dean NM, Perera RJ. (2004). Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res*, 32:188.
204. Ko JY, Park JH. (2013). Mouse models of polycystic kidney disease induced by defects of ciliary proteins. *BMB Rep*, 46:73-79.
205. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, Braeg S, Voelker H, Bredt S, Beyer T, Janusch H, Hamann C, Godel M, Muller K, Herbst M, Hornung M, Doerken M, Kottgen M, Nitschke R, Igarashi P, Walz G, Kuehn EW. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat. Cell Biol*, 12:1115-1122.
206. Kim S, Zaghoul NA, Bubenshchikova E, Oh EC, Rankin S, Katsanis N, Obara T, Tsiokas L. (2011). Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nat. Cell Biol*, 13:351-360.
207. Lancaster MA, Schroth J, Gleeson JG. (2011). Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium. *Nat. Cell Biol*, 13:700-707.
208. Belibi F, Ravichandran K, Zafar I, He Z, Edelstein CL. (2011). mTORC1/2 and rapamycin in female Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 300:236-244.
209. Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson, SJ, Grantham JJ, Calvet JP. (2004). Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *J. Biol. Chem*, 279:40419-40430.
210. Woo YM, Park JH. (2013). microRNA biomarkers in cystic diseases. *BMB Rep*, 46(7):338-345.

211. Hossain MM, Cao M, Wang Q, Kim JY, Schellander K, Tesfaye D, Tsang BK. (2013). Altered expression of miRNAs in a dihydrotestosterone-induced rat PCOS model. *Journal of Ovarian Research*, 6:36
212. Tetsuka M, Hillier SG. (1996). Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormones. *Endocrinology*, 137:4392-4397.
213. Yao N, Lu CL, Zhao JJ, Xia HF, Sun DG, Shi XQ, Wang C, Li D, Cui Y, Ma X. (2009). A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH. *Front Biosci*, 14:3239-3245.
214. Yao N, Yang BQ, Liu Y, Tan XY, Lu CL, Yuan XH, Ma X. (2010). Follicle-stimulating hormone regulation of microRNA expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells. *Endocrine*, 38:158-166.
215. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G, Kerin MJ. (2009). MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11:R27.
216. Mercier L, le Guellec C, Thieulant ML, Samperez S, Jouan P. (1976). Androgen and estrogen receptors in the cytosol from male rat anterior hypophysis: further characteristics and differentiation between androgen and estrogen receptors. *J Steroid Biochem*, 7:779-785.
217. Diao FY, Xu M, Hu Y, Li J, Xu Z, Lin M, Wang L, Zhou Y, Zhou Z, Liu J, Sha J. (2004). The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. *J Mol Endocrinol*, 33:59-72.
218. Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, McAllister JM, Mosselman S, Strauss JF III. (2003). The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem*, 278:26380-26390.
219. Hughes C, Elgasim M, Layfield R, Atiomo W. (2006). Genomic and post-genomic approaches to polycystic ovary syndrome—progress so far: Mini Review. *Hum Reprod*, 21:2766-2775.
220. Wood JR, Ho CK, Nelson-Degrave VL, McAllister JM, Strauss JF III. (2004). The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol*, 63:51-60.
221. Ro S, Song R, Park C, Zheng H, Sanders KM, Yan W. (2007). Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. *RNA*, 13:2366-2380.
222. Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovskiy A, Lao K, Surani MA. (2007). Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*, 21:644-648.
223. Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X, Christenson LK. (2008). Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 79:1030-1037.
224. Zhao H, Rajkovic A. (2008). MicroRNAs and mammalian ovarian development. *Semin Reprod Med*, 26:461-468.
225. Sirotkin AV, Laukova M, Ovcharenko D, Brenaut P, Mlyneczek M. (2009). Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis. *J Cell Physiol*, 223:49-56.
226. Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Laukova M, Mlyneczek M. (2009). Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol*, 219:415-420.
227. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. (2010). Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *Obes Rev*, 11:354-361.
228. Chen YH, Heneidi S, Lee JM, Layman LC, Stepp DW, Gamboa GM, et al. (2013). miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes*, 62:2278-86.
229. Waanders E, Venselaar H, te Morsche RH, de Koning DB, Kamath PS, Torres VE, Somlo S, Drenth JP. (2010). Secondary and tertiary structure modeling reveals effects of novel mutations in polycystic liver disease genes PRKCSH and SEC63. *Clin. Genet*, 78:47-56.
230. Banales JM, Munoz-Garrido P, Bujanda L. (2013). Somatic second-hit mutations leads to polycystic liver diseases. *World J. Gastroenterol*, 19:141-143.
231. Nicolau C, Torra R, Badenas C, Perez L, Oliver JA, Darnell A, Bru C. (2000). Sonographic pattern of recessive polycystic kidney disease in young adults. Differences from the dominant form. *Nephrol. Dial. Transplant*. 15:1373-1378.
232. Ong AC, Harris PC, Davies DR, Pritchard L, Rossetti S, Biddolph S, Vaux DJ, Migone N, Ward CJ. (1999). Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int*, 56:1324-1333.

233. Giovannetti E, Erozenski A, Smit J, Danesi R, Peters GJ. (2012). Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 81:103-122
234. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. (2005). microRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 65(14):6029-33.
235. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*, 130(7):2113-29.
236. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. (2007). MicroRNA-21 regulates the expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2):647-58.
237. Li J, Huang H, Sun L, et al. (2009). miR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*, 15(12):3998-4008.
238. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, et al. (2010). microRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res*, 70(11):4528-38.
239. Wang P, Zou F, Zhang X, et al. (2009). MicroRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res*, 69(20):8157-65.
240. Folini M, Gandellini P, Longoni N, et al. (2010). miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol Cancer*, 9:12.
241. Krichevsky AM, Gabriely G. (2009). Mir-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*, 13(1):39-53.
242. Keshav, A., P. Norge, and K.L. Wasewar. (2012). Reactive extraction of citric acid using tri-n-octylamine in nontoxic natural diluents: part 1—equilibrium studies from aqueous solutions. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(2):197-213.
243. J. M. Garcí́a-Martí́nez, J. Moran, R. G. Clarke, A. Gray, S. C. Cosulich, C. M. Chresta and D. R. Alessi. (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem. J*, 421:29-42.
244. Hao Zhang¹, Dror Berel^{2,4}, Yanping Wang¹, Ping Li¹, Neil A. Bhowmick³, Robert A. Figlin³, Hyung L. Kim. (2013). Comparison of Ku0063794, a Dual mTORC1 and mTORC2 Inhibitor, and Temsirolimus in Preclinical Renal Cell Carcinoma Models. *PlosOne*, 8(1):54918
245. Jie Sun^{1.}, Chunlan Jin^{3.}, Huangan Wu², Jimeng Zhao¹, Yunhua Cui², Huirong Liu², Lingxiang Wu², Yin Shi^{1,2*}, Bing Zhu. (2013). Effects of Electro-Acupuncture on Ovarian P450arom, P450c17a and mRNA Expression Induced by Letrozole in PCOS Rats. *PlosOne*, 8(11):79382.
246. Saeed Zavareh¹, 2 Ph.D., Zahara Gholizadeh¹ M.Sc., Taghi Lashkarbolouki. (2018). Evaluation of changes in the expression of Wnt/ β -catenin target genes in mouse reproductive tissues during estrous cycle: An experimental study. *Int J Reprod BioMed*, 16(2):69-76.
247. Shabnam Bakhshalizadeh, Fardin Amidi, Ashraf Alleyassin, Masoud Soleimani, Reza Shirazi & Maryam Shabani Nashtaei. (2017). Modulation of steroidogenesis by vitamin D3 in granulosa cells of the mouse model of polycystic ovarian syndrome. *Systems Biology In Reproductive Medicine*, 63(3):150-161.
248. Nicholson DW. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6:1028-1042.
249. Gilling-Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. (1997). Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol*, 47:93-99.
250. Hirshfeld-Cytron J, Barnes RB, Ehrmann DA, Caruso A, Mortensen MM, Rosenfield RL. (2009). Characterization of functionally typical and atypical types of polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 94:1587-1594.
251. Erickson GF, Yen SSC. (1984). New data on follicle cells in polycystic ovaries: a proposed mechanism for the genesis of cystic follicles. *Semin. Reprod. Endocrinol*, 2:231-243.
252. Rebar R, Judd HL, Yen SS, Rakoff J, Vandenberg G, Naftolin F. (1976). Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Invest*, 57:1320-1329.
253. de Ziegler D, Steingold K, Cedars M, Lu JK, Meldrum DR, Judd HL, Chang RJ. (1989). Recovery of hormone secretion after chronic gonadotropin-releasing hormone agonist administration in women with polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 68:1111-1117.

254. Barbieri RL, Makris A, Ryan KJ. (1984). Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of human ovarian stroma and theca. *Obstet. Gynecol*, 64:73-80.
255. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. (1994). Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 79:1158-1165.
256. Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S, Ehrmann DA. (1989). Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med*, 320:559-565.
257. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. (1999). Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol. Endocrinol*, 13:946-957.
258. Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. (1998). Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 83:3984-3991.
259. Richards JS. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr. Rev*, 15:725-751.
260. Lindeberg M, Carlstrom K, Ritvos O, Hovatta O. (2007). Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum. Reprod*, 22:401-406.
261. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. (1999). Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 84:2951-2956.
262. Erickson GF, Magoffin DA, Cragun JR, Chang RJ. (1990). The effects of insulin and insulin-like growth factors-I and -II on estradiol production by granulosa cells of polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 70:894-902.
263. Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RM, Margara R, Franks S. (1994). Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 79:1355-1360.
264. Coffler MS, Patel KS, Dahan MH, Malcom PJ, Kawashima T, Deutsch R, Chang RJ. (2003). Evidence for abnormal granulosa cell responsiveness to follicle stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 88:1742-1747.
265. Richards JS, Jonassen JA, Rolfes AI, Kersey K, Reichert LE Jr. (1979). Adenosine 3',5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 104:765-773.
266. Adashi EY, Hsueh AJW. (1982). Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem*, 257:6077-6083.
267. Jonassen JA, Bose K, Richards JS. (1982). Enhancement and desensitization of hormone-responsive adenylate cyclase in granulosa cells of preantral and antral ovarian follicles: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 111:74-79.
268. Daniel SA, Armstrong DT. (1983). Involvement of estrogens in the regulation of granulosa cell aromatase activity. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 61:507-511.
269. Richards JS, Ireland JJ, Rao MC, Bernath GA, Midgley ARJ, Reichert LEJ. (1976). *Endocrinology*, 99:1562-1570.
270. Knecht M, Darbon J-M, Ranta T, Baukal AJ, Catt KJ. (1984). Estrogens enhance the adenosine 3', 5'-monophosphate-mediated induction of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 115:41-49.
271. Almahbobi G, Anderiesz C, Hutchinson P, McFarlane JR, Wood C, Trounson AO. (1996). Functional integrity of granulosa cells from polycystic ovaries. *Clin. Endocrinol*, 44:5.
272. Barbieri RL, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kistner RW, Ryan KJ. (1986). Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 62:904-910.
273. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Selleskog U, Hillensjo T. (1993). Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil. Steril*, 59:323-331.
274. May JV, McCarty K Jr, Reichert LE Jr, Schomberg DW. (1980). Follicle-stimulating hormone-mediated induction of functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors during monolayer culture of porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 107:1041-1049.
275. Sanders MM, Midgley AR Jr. (1982). Rat granulosa cell differentiation: an in vitro model. *Endocrinology*, 111:614-624.

276. Davoren JB, Kasson BG, Li CH, Hsueh AJ. (1986). Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology*, 119:2155-2162.
277. Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. (1996). Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 81:302-309.
278. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. (2001). Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 86:1318-1323.
279. Franks S, Mason H, Willis D. (2000). Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 163(1-2):49-52.
280. Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Abbott DH. (2000). Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:1206-10.
281. Padmanabhan V, Manikkam M, Recabarren S, Foster D. (2006). Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol Cell Endocrinol*, 246:165-74.
282. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, et al. (2004). Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol*, 64(1-2):59-74.
283. Motta AB. (2010). Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 119(3-5):105-11.
284. Solano ME, Elia E, Luchetti CG, Sander V, Di Girolamo G, Gonzalez C, et al. (2006). Metformin prevents embryonic resorption induced by hyperandrogenisation with dehydroepiandrosterone in mice. *Reprod Fertil Dev*, 18(5):533-44.
285. Familiari G, Toscano V, Motta PM. (1985). Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone. *Cell Tissue Res*, 240(3):519-28.
286. Hughesdon PE. (1982). Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet. Gynecol. Surv*, 37:59-77.
287. Webber LJ, Stubbs SA, Stark J, Margara RA, Trew GH, Lavery SA, Hardy K, Franks S. (2007). Prolonged survival in culture of preantral follicles from polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 92:1975-1978.
288. Anderson E, Lee GY. (1997). The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *Tissue Cell*, 29:171-189.
289. Kaiser U, Sabbagh E, Katzenellenbogen R, Conn P, Chin W. (1995). A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:12280-12284.
290. Chang RJ, Mandel FP, Lu JK, Judd HL. (1982). Enhanced disparity of gonadotropin secretion by estrone in women with polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 54:490-494.
291. Kerr JB, Myers M, Anderson RA. (2013). The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction*, 146: 205-215.
292. Adhikari D, Liu K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev*, 30: 438-464.
293. Reddy P, Zheng W, Liu K. (2010). Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab*, 21: 96-103.
294. Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. (2012). Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol*, 356: 24-30.
295. Zhang H, Risal S, Gorre N, Busayavalasa K, Li X, Shen Y et al. (2014). Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol*; 24:2501–2508.
296. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci*, 82:40-52.
297. Matzuk M. (2000). Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*, 163: 61-66.
298. Honnma, H., Endo, T., Henmi, H., Nagasawa, K., Baba, T., Yamazaki, K., Kitalima, Y., Hayashi, T., Manase, K., Saito, T., (2006). Altered expression of Fas/Fas ligand/ caspase 8 and membrane type 1-matrix

metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis*, 11:1525-1533.

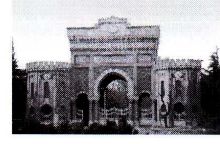
299. Dell, K. M. R. and Avner, E. D. (2001). Polycystic kidney disease, autosomal recessive. *GeneReviews*.
300. Alford C, Toloubeydokhti T, Al-Katanani Y, Drury KC, Williams R, Chenini N. (2007). The expression of microRNA (miRNA) mir-23a and 23b and their target gene, CYP19A1 (aromatase) in follicular cells obtained from women undergoing ART. *Fertil Steril*, 88:166-167.
301. Toloubeydokhti T, Alford C, Al-Katanani Y, Luo X, Williams RS, Nasser C. (2007). The expression of microRNA (miRNA), mir-17, mir-211 and mir-542 and their target genes, StAR, IL-1b and Cox2 in follicular cells derived from women undergoing ART. *Fertil Steril*, 88:165-166.



ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı: 2016/ **SS**

27/ 05/ 2016

Sayın Prof. Dr. İsmail SEÇKİN
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Fakültesi

Karar No _____ 2016/ **SS****Başvuru** _____ : 20.05.2016

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **MSc Sibel DEMİRCİ DELİPİNAR**'a ait "Farelerdeki Polikistik Over Sendromu Modelinde, Mir-21 Ve Mtor İlişkisinin İncelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	42 SS
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		Temmuz 2016/ Ocak 2018

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak. Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FARELERDEKİ POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE MİR-21 VE MTOR İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%4

İNTERNET
KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%1

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	readgur.com İnternet Kaynağı	%1
3	www.turkjbiochem.com İnternet Kaynağı	<%1
4	preview-ovarianresearch.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<%1
5	Burcu GÖRGÜLÜ ŞAHİN, Özcan OCAKOĞLU, İsmail SEÇKİN, Sibel DEMİRCİ DELİPİNAR, Tuğba EKİZ YILMAZ, Belisa KALECİ. "The Effects of Polyquad-Preserved Travoprost, Benzalkonium Chloride-Preserved Latanoprost, Purite-Preserved Brimonidine and Preservative-Free Tafluprost on Ocular Surface: A Rabbit Ocular Surface Study", <i>Türkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology</i> , 2017 Yayın	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SİBEL	Soyadı	DEMİRCİ DELİPİNAR
Doğ.Yeri	ERLENBACH	Doğ.Tar.	09/02/1984
Uyruğu	TC.	TC Kim No	10606688892
Email	sibell.demirci@gmail.com	Tel	+90 555 4478054

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AbD.	2011
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi (yarı zamanlı)	Biruni Üniversitesi-Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu	2018-Halen
2.	Öğretim Görevlisi (yarı zamanlı)	Işık Üniversitesi	2018-Halen
3.	Öğretim Görevlisi (yarı zamanlı)	İstanbul Bilgi Üniversitesi-Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu	2014-Halen
4.	Laboratuvar Teknik Elemanı	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi-Histoloji ve Embriyoloji AbD.	2009-2012
5.	Operasyon Sorumlusu (yarı zamanlı)	Acıbadem Mobil Sağlık Hizmetleri	2009-2010
6.	Biyokimya Laboratuvarı Sorumlusu	Özel Ortaköy Tıp Merkezi	2008-2009
7.	Mikropreparasyon Teknikleri Stajı	İstanbul Üniversitesi Carrapaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2007
8.	Rutin ve Acil Biyokimya Stajı	Kasımpaşa Asker Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı	2006
9.	Biyokimya ve Mikrobiyoloji Stajı	İstinye Devlet Hastanesi, Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı	2005

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi
Adobe Photoshop	İyi
Graph Pad Prism	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

1. Seckin I, Uzunalan M, Pekpak M, Kokturk S, Sonmez H, Oztürk Z, Demirci S, Yaprak E. Experimentally induced puromycine aminonucleoside nephrosis (PAN) in rats: evaluation of angiogenic protein platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) expression in glomeruli. 2012. *J Biomed Sci.* Feb 16;19:24.
2. Tanriverdi G, Kaya-Dagistanli F, Ayla S, Demirci S, Eser M, Unal ZS, Cengiz M, Oktar H. Resveratrol can prevent CCl₄-induced liver injury by inhibiting Notch signaling pathway. 2016. *Histol Histopathol.* Jan 8:11720.

Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Demirci Delipinar S, Sonmez H, Ekmekci H, Erozcenci LA, Seckin I. The Effects Of Different Inhibitory Pathways Of Prostaglandin E₂ Biosynthesis On Renomedullary Interstitial Cells In Rats: A Multidisciplinary Study. 2017. *J Histol Histopathol.* doi: 10.7243/2055-091X-4-13

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. S. Deveci, M. Acikel Elmas, D. Yucel, M.S. Keskin, S. Demirci Delipinar, I. Seckin, A. Sahin, S. Arbak. The Effect Of Administration Of Nanoparticles On Testis Structure. (Poster Sunumu:). 15. Uluslararası Histokimya ve Sitokimya Kongresi. 18-21 Mayıs 2017. Antalya, Türkiye.
2. Coskun, C. Yegen, I. Seckin, O. Günal, W. Attaallah, S. Arbak, B. Cetiner, Z. Yıldırım, Y. Erdemgil, M. A. Elmas, S. Demirci, O. Can, M. Serteser, A.

- Ozpinar, G. Basdemir, A. Belce, I.Unal. The Effect of Modified University of Wisconsin Solution on Kidney Preservation Time. (Poster Sunumu). 16. Avrupa Mikroskopi Kongresi. 28.Ağustos-2.Eylül.2016. Lyon/Fransa.
3. Coskun, C. Yegen, I. Seckin, O. Günel, W. Attaallah, S. Arbak, B. Cetiner, Z. Yıldırım, Y. Erdemgil, M. A. Elmas, S. Demirci, O. Can, M. Serteser, A. Ozpinar, G. Basdemir, A. Belce, I.Unal. Modified University of Wisconsin Solution With Melatonin and the Its Efficacy of Kidney Preservation Time. (Poster Sunumu). 16. Avrupa Mikroskopi Kongresi. 28.Ağustos-2.Eylül.2016. Lyon/Fransa.
 4. Gorgulu, O. Ocakoglu, I. Seckin, S. Demirci Delipinar, T. Ekiz Yilmaz, B. Kaleci. The Effects of Polyquad-Preserved Travoprost, Benzalkonium Chloride (BAC)-Preserved Latanoprost, Purite- Preserved Brimonidine and Preservative-Free Tafluprost on Ocular Surface: A Rabbit Ocular Surface Study. (Poster Sunumu). 12. Avrupa Glokom Derneği Kongresi. 19-22.Haziran.2016. Prag, Çek Cumhuriyeti.
 5. A. Coskun, C. Yegen, I. Seckin, O. Günel, W. Attaallah, S. Arbak, B. Cetiner, Z. Yıldırım, Y. Erdemgil, M. A. Elmas, S. Demirci, O. Can, M. Serteser, A. Ozpinar, G. Basdemir, A. Belce, I.Unal. Effects Of Melatonin On The Efficacy Of University Of Wisconsin Solution During Kidney Preservation. (Poster Sunumu). 12. Çok Uluslu Mikroskopi Kongresi. 23-28.Ağustos.2015. Eger, Macaristan.
 6. İ. Seckin, M. Uzunalan, M. Pekpak, S. Kokturk, H. Sonmez, Z. Ozturk, S. Demirci, E. Yaprak. Experimentally Induced Puromycine Aminonucleoside Nephrosis (PAN) In Rats. (Poster Sunumu). 18. Uluslararası Mikroskopi Kongresi. 7-12.Eylül.2014. Prag, Çek Cumhuriyeti.
 7. I.Seckin, L.A.Erözenci, M. Popovici and S. Demirci. The effects of different inhibitory pathways of prostaglandin E₂ (PGE₂) biosynthesis on renomedullary interstitial cells in rats. (Poster Sunumu-En iyi poster 2.lik ödülü). 4. Uluslararası Genç Doktorlar ve Öğrenciler Tıp Kongresi. 17-19.Mayıs.2012. Moldova Cumhuriyeti.
 8. G.Tanrıverdi, H.Oktar, S.Ayla, M. Eser, S.Demirci, Z.S. Genç, M. Cengiz, F.K.Dağıştanlı, G.Can. Research of protective effects of resveratrol on experimental liver damage. (Poster Sunumu). 3. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi. 22-25.Nisan.2009. Antalya, Türkiye.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Ayla S, Oktar H, Tanrıverdi G, Cengiz M, Ozkılıc Ac, Can G, Ozucer B, Eser M, Demirci S, Batur S. (Protective) Effect Of Nicotinamide On Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity In Rats. 2009. *Anadolu Universitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*;10(1): 229-238.
2. Gorgulu Sahin B, Ocakoglu O, Seckin I, Demirci Delipinar S, Ekiz Yılmaz T, Kaleci B. The Effects of Polyquad-Preserved Travoprost, Benzalkonium

Chloride-Preserved Latanoprost, Purite-Preserved Brimonidine and Preservative-Free Taflufrost on Ocular Surface: A Rabbit Ocular Surface Study. 2017. *Turkiye Klinikleri J Ophthalmol*;26(3):149-61.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. A. Coskun, C. Yegen, I. Seckin, O. Günal, W. Attaallah, S. Arbak, B. Cetiner, Z. Yıldırım, Y. Erdemgil, M. A. Elmas, S. Demirci, O. Can, M. Serteser, A. Ozpınar, G. Basdemir, A. Belce, I.Unal. Effects Of Melatonin On The Efficacy Of University Of Wisconsin Solution During Kidney Preservation. (Poster Sunumu). 02-04.Eylül.2015. 22. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. İstanbul, Türkiye.
2. S. Demirci, H. Sönmez, H. Ekmekçi, A. Erozenci, M. Popovici, İ. Seçkin. Examination of the inhibition of different prostaglandine E₂ pathways on renomedullary interstitial cells in rats. (Sözlü Sunu-Yener Aytekin Türkçe Bilim Dili 1.lik Ödülü). 28-31.Mayıs.2013. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Mersin, Türkiye.
3. Seckin, M. Uzunalan, M. Pekpak, S. Kokturk, H. Sonmez, Z. Ozturk, S. Demirci, E. Yaprak. Experimentally induced puromycine aminonucleoside nephrosis in rats. (Poster Presentation). 28-31.Mayıs.2013. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Mersin, Türkiye.
4. İsmail Seçkin, Mümin Uzunalan, Meltem Pekpak, Sibel Köktürk, Bülent Uruluer, Hüseyin Sönmez, Zeynep Öztürk, Elif Yaprak, Aslı Gümüsel, Sibel Demirci. Deneysel Kronik Puromisin Nefroz Uyarılı Sıçan Glomerüllerinde TGF-β1 Ekspresyonu ve Mezengiumdaki değişiklikler' başlıklı poster bildirisi. Uluslararası Katılımlı XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 16-19 Mayıs 2012 (Denizli)
5. S.Ayla, H.Oktar, G.Tanrıverdi, M. Cengiz, A.Ç.Özkılıç, G.Can, B.Özüçer and S.Demirci. Effect of nicotinamide on doxorubicin induced hepatotoxicity. 26-29.Ağustos.2007. 18. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Eskişehir, Türkiye.
6. G. Tanrıverdi, H.Oktar, S Ayla, M. Eser, S. Demirci, M. Cengiz, A.Ç. Özkılıç, F.K Dağistanlı, S. Batur. The protective effects of Curcumin on CCl₄ induced experimental hepatic injury". Uluslararası Katılımlı 9. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 20-23.Mayıs.2008. Malatya, Türkiye.

ÖDÜLLER

1. Biyolojik Bilimler Özel Ödülü: Tanrıverdi G, Kaya-Dagistanli F, Ayla S, Demirci S, Eser M, Unal ZS, Cengiz M, Oktar H. Resveratrol can prevent CCl₄-induced liver injury by inhibiting Notch signaling pathway. 19-21 Mayıs,2017. 23. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Antalya, Türkiye.

2. Yener Aytekin, Türkçe Bilim Dili 1.lık Ödülü: S. Demirci, H. Sönmez, H. Ekmekci, A. Erozcü, M. Popovici, İ. Seçkin. Sıçanlarda, prostaglandin E₂ üretim yollarının farklı basamaklarda baskılanmasının, böbrek medullasındaki ara doku hücrelerinin işlevleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi. 28-31.Mayıs.2013. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Mersin, Türkiye.
3. En İyi Poster 2.lık Ödülü: I.Seçkin, L.A.Erozcü, M. Popovici and S. Demirci. The effects of different inhibitory pathways of prostaglandin E₂ (PGE₂) biosynthesis on renomedullary interstitial cells in rats. 17-19.Mayıs.2012. 4. Uluslararası Genç Doktorlar ve Öğrenciler Tıp Kongresi. 17-19.Mayıs.2012. Moldova Cumhuriyeti.
4. En İyi Poster 1.lık Ödülü: G.Tanrıverdi, H.Oktar, S.Ayla, M. Eser, S.Demirci, Z.S. Genç, M. Cengiz, F.K.Dağıştanlı, G.Can. Research of protective effects of resveratrol on experimental liver damage. 22-25.Nisan.2009. 3. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi. Antalya, Türkiye.

SERTİFİKALAR

- 3-6/02/2015** : Nöron Kültürü Kursu, Medipol Üniversitesi. İstanbul, Türkiye.
- 13-24/05/2013**: İnsan Patolojisinde Moleküler Tanı için Klasik ve Modern Metodlar Kursu, Erasmus Programı. Braşov,Romanya.
- 11-22/03/2013**: Deney Hayvanları Kullanım Kursu, İ.Ü.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE). İstanbul, Türkiye.
- 24/09/2011** : Türk Elektron Mikroskopi Derneği (TEMD)-Mikroskop Okulu, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Antalya, Türkiye.
- 24-25/06/2011** :Tüba-2. Kök Hücre Kursu ve 6. Kök Hücre Sempozyumu, Hacettepe Üniversitesi. Ankara, Türkiye.
- 20-22/04/2010** :Biyolojik Bilimler İçin Uygulamalı Elektron Mikroskopi Teknikleri Kursu, Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Araştırma Merkezi (BİBAM). Eskişehir, Türkiye.
- 14-27/05/2007** :1. Uygulamalı Moleküler Teknikler ve Gamet Biyolojisi Kursu, Akdeniz Üniversitesi. Antalya, Türkiye.