

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

**POLİKİSTİK OVER SENDROMU OLUŞTURULMUŞ  
SIÇANLARDA ZONA PELLUSIDA GLİKOPROTEİNLERİNİN  
EKSPRESYONU VE İNCE YAPISININ İNCELENMESİ**

**Hülya DERVİŞOĞLU**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ**

**MERSİN-2015**

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

**POLİKİSTİK OVER SENDROMU OLUŞTURULMUŞ  
SIÇANLARDA ZONA PELLUSIDA GLİKOPROTEİNLERİNİN  
EKSPRESYONU VE İNCE YAPISININ İNCELENMESİ**

Hülya DERVİŞOĞLU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından BAP-SBE  
THEB (HD) 2013-2 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:273

MERSİN-2015

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tez Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Sıçanlarda Zona Pellusida Glikoproteinlerinin Ekspresyonu ve İnce Yapısının İncelenmesi" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi  
26/12/2014



Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ..05.01.2015.....tarih ve..2015/117.. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



## TEŞEKKÜR

Lisanüstü eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocalarım Prof. Dr. Banu Coşkun YILMAZ'a ve Doç. Dr. Savaş AKTAŞ'a tezimin hazırlanması boyunca gösterdikleri titizlik, özveri, sabır ve bilimsel katkıdan dolayı çok teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a ve Doç. Dr. Ebru BALLI'ya yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve özellikle Yüksek Lisans tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Tuba ÖZCAN'a, aramıza yeni katılan ancak tez çalışmalarımda destek olan Arş. Gör. Hatice ORUÇ'a ve tez dönemim süresince bildiklerini tüm şeffaflığıyla aktaran Biy. İsmail ARIKUŞU'na ve Anabilim Dalımızda görev yapan tüm çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Biyostatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Didem DERİCİ'ye tez çalışmam sırasında yaptığı istatistiksel analizler ile gösterdiği katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Nail Can ÖZTÜRK'e, akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Biyokimya Anabilim Dalı Arş. Gör. Ayşegül GÖRÜR'e tez çalışmalarım sırasında gösterdiği katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Biyofizik Anabilim Dalı Arş. Gör. Fatma SÖĞÜT'e Yüksek Lisans Tez çalışmalarım sırasında gösterdiği manevi destekten dolayı teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük katkısı olan ve tüm fedakarlığı ile hep yanımda bulunan annem Jale GÜROCAK'a, yüksek lisanas eğitimim boyunca maddi ve manevi destekte bulunan, tez çalışmalarım süresince büyük sabır ve anlayış gösteren sevgili eşim Sait DERVİŞOĞLU'na, her sabah uyandığında usanmadan "bugün de okula gidecek misin, anne?" diye soran, küçüçük aklı ile bana kocaman anlayış gösteren canım oğlum Emir DERVİŞOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Saygılarımla

Hülya DERVİŞOĞLU

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b>	ii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>ÖZET</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Polikistik Over Sendromu	3
2.2. Normal Follikülogenezis	4
2.2.1. Primordiyal Folliküllerin Primer Folliküllere Gelişimi	5
2.2.2. Primer Folliküllerin Sekonder Folliküllere Gelişimi	6
2.2.3. Sekonder Folliküllerin Tersiyer Folliküllere Gelişimi	6
2.3. Zona Pellusida'nın Yapısı	7
2.4. PKOS'ta Follikülogenezis	9
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	11
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı	11
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	11
3.3. Overlerin Elde Edilmesi ve Fiksasyonu	12
3.4. İmmünofloresan İşaretleme Protokolü	12
3.5. İmmünofloresan İşaretlemenin Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi	13
3.6. Elektron Mikroskopik Doku Takibi Protokolü	14
3.7. Elektron Mikroskopik Doku Değerlendirilmesi	15
3.8. İstatistiksel Analiz	15
<b>4. BULGULAR</b>	16
4.1. Vajinal Smear Bulguları	16
4.2. Stereo Mikroskopik Bulgular	17
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular	18

4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular	21
<b>5.TARTIŞMA</b>	28
<b>6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	32
<b>7. KAYNAKLAR</b>	33
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	38

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Ovaryumun şematik yapısı.	4
<b>Şekil 2.2.</b> Zona Pellusida'nın şematik yapısı.	8
<b>Şekil 4.1.</b> Kontrol, Taşıyıcı, PKOS gruplarının Östrus sikluslarının karşılaştırılması.	17
<b>Şekil 4.2.</b> Overlerin stereo mikroskopik görünümü.	18
<b>Şekil 4.3.</b> Folliküler gelişim evrelerinde ZP tabakasında ZP2 immün işaretleme yoğunluklarının grafiksel olarak gruplar arası karşılaştırılması.	20
<b>Şekil 4.4.</b> Folliküler gelişim evrelerinde granüloza hücrelerinde ZP2 immün işaretleme yoğunluklarının grafiksel olarak gruplar arası karşılaştırılması.	20
<b>Şekil 4.5.</b> ZP2 immün işaretleme yoğunluklarının gruplar arası karşılaştırılması.	21
<b>Şekil 4.6.</b> Kontrol grubu, Unilaminer ve Multilaminer primer follikül evreleri.	23
<b>Şekil 4.7.</b> Tüm folliküller evrelere ait ZP kalınlıklarının grafiksel olarak gruplar arası karşılaştırılması.	23
<b>Şekil 4.8.</b> Kontrol, Taşıyıcı ve PKOS gruplarında multilaminer primer follikül evrelerinin elektron mikroskopik karşılaştırılması.	24
<b>Şekil 4.9.</b> Kontrol, Taşıyıcı ve PKOS gruplarında sekonder follikül evrelerinin elektron mikroskopik karşılaştırılması.	25
<b>Şekil 4.10.</b> Kontrol ve PKOS gruplarında tersiyer folliküllerin elektron mikroskopik karşılaştırılması.	26
<b>Şekil 4.11.</b> Kontrol ve PKOS gruplarında tersiyer folliküllerin elektron mikroskopik karşılaştırılması.	27
<b>Şekil 4.12.</b> Kontrol, Taşıyıcı, PKOS gruplarında bazal laminanın elektron mikroskopik karşılaştırılması.	27
<b>Şekil 4.13.</b> Kontrol, Taşıyıcı, PKOS gruplarında dejenere folliküller.	28

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMH</b>	: Anti-mülleryen hormon
<b>BSA</b>	: Sığır serum albumini
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DHEA</b>	: Dehidroepiandrosteron
<b>FSH</b>	: Follikül sitümüle edici hormon
<b>FSHR</b>	: Follikül sitümüle edici hormon reseptörü
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>GDF-9</b>	: Büyüme farklılaşma faktörü
<b>KL</b>	: Kit Ligand
<b>LH</b>	: Luteinleştirici hormon
<b>MCM 2</b>	: Minichromosome meintenance protein 2
<b>mRNA</b>	: Haberci ribonükleik asit
<b>PBS</b>	: Fosfatlı tuz tamponu
<b>PKO</b>	: Polikistik Over
<b>PKOS</b>	: Polikistik over sendromu
<b>TEM</b>	: Geçirmeli (Transmisyon) Elektron Mikroskobu
<b>ÜYT</b>	: Yardımcı üreme teknikleri
<b>ZP</b>	: Zona pellusida



## ÖZET

### Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Sıçanlarda Zona Pellusida Glikoproteinlerinin Ekspresyonu ve İnce Yapısının İncelenmesi

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık yaşındaki kadınların yaklaşık %6-10'unda görülen ve farklı nedenlerden dolayı ortaya çıkan bir endokrin sistem bozukluğudur. Hastalarda primer olarak ovaryan hiperandrojenizm, artan luteinleştirici hormon sekresyonu, menstrual fonksiyon bozukluğu ve infertilite gözlenmektedir. PKOS'ta görülen infertilitede zona pellusida glikoproteinlerinin rolü olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada PKOS oluşturulmuş sıçanlarda, zona pellusida glikoproteinlerinden olan ZP2 glikoproteininin follikülogenezis süresince ekspresyonunun değerlendirilmesi ve ince yapı düzeyinde yapısal özelliklerinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada 36 adet Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı ve sıçanlar kontrol grubu, taşıyıcı grup ve PKOS grubu olarak 3 gruba (n=12) ayrıldı. Deneklerin overlerinden elde edilen kesitlerde ZP2 glikoproteini ile immün işaretleme yapılırken, 4 deneğin sol overi elektron mikroskopik inceleme için kullanıldı.

Kontrol grubunda ve taşıyıcı grupta primer, sekonder ve tersiyer follikül aşamalarında ve granüloza hücrelerinde ZP2 immün işaretleme yoğunluğunun benzer olduğu, PKOS grubunda ise anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0,001$ ). Tüm grupların elektron mikroskopik olarak çekilen mikrografların ZP kalınlıkları ölçüldü ve anlamlı bir farklılık saptanmadı. PKOS grubunda multilaminar primer ve sekonder folliküllerin bir kısmında granüloza hücrelerinde apoptozisin arttığı, granüloza hücrelerinin bazal laminalarında kalınlaşma ve düzensizlik olduğu görüldü. Ayrıca tersiyer folliküllerde daha belirgin olmak üzere ZP'de düzensizlik, elektron dansitesinde artış, vakuolizasyon ve granüler yapı birikimleri gözlemlendi.

Sonuç olarak PKOS'ta follikülogenezin primer follikül aşamasından itibaren ZP2 ekspresyonunun azalmasının ve zona pellusida da yapısal değişikliklerin görülmesinin normal follikülogenezis ve fertilizasyon sürecini bozabileceği ve kadınlarda subfertilite veya infertiliteye yol açabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Polikistik over sendromu, follikülogenezis, zona pellusida, oosit, granüloza hücreleri.

## **ABSTRACT**

### **Zona Pellusida Glycoprotein Expression and Ultrastructure in Rats with Polycystic Ovary Syndrome**

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder of women in their reproductive ages with a prevalence between 6 and 10%. Primarily, the patients observed had problems like ovarian hyperandrogenism, increasing luteinizing hormone secretion, menstrual problems and infertility. It is unknown whether zona pellusida glycoproteins have roles in the infertility experienced because of PCOS. In this study, the aims are to identify the structural properties of ZP2 glycoprotein, which is one of the zona pellusida glycoproteins, as a ultrastructure and to evaluate its expression during folliculogenesis of the rats with PCOS.

In this current study, totally 36 female rats, of which species is Wistar, have been used, and they have been seperated into groups as control, PCOS and carriers (n=12 for each group). With the sections from the ovaries of the rats, immune identification has been done via ZP2 glycoprotein. Left ovaries of the four rats have been used for microscopic examination.

In the control and carrier groups, the density of identification have been found out to be same in primary, secondary and tertiary follicular stages; however, it has been found out that it has decreased significantly in PCOS group ( $p<0,001$ ). In the micrographs of all groups at the ultra structural level, the thickness of ZPs has also been measured, and there have not been found a statistically significant difference between them. In PCOS group, multilaminar primary and secondary follicles have experienced an increase in apoptozis of granulosa cells. There have been thicknesses and disorders in basal laminas. Furthermore, there have been observations such as disorders of ZP, increase in electron density, vacuolization, granular structure accumulations, which are particularly distinct in tertiary follicles.

Consequently, it has been concluded that the decrease in ZP2 expression, since the follicular stages of folliculogenesis, as well as the structural changes in zona pellusida may lead to problems in normal folliculogenesis and fertilization processes; and thus, they may lead to subfertility or infertility.

**Key Words:** Polycystic ovary syndrome, folliculogenesis, zona pellucida, oocyte, granulosa cells.

# 1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık yaşındaki kadınların yaklaşık %6-10'unda görülen ve farklı nedenlerden dolayı ortaya çıkan bir endokrin sistem bozukluğudur (1, 2, 3). PKOS'un fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, hastalarda ovaryan hiperandrojenizm, hiperinsülinemi, artan luteinleştirici hormon (LH) sekresyonu, menstrual fonksiyon bozukluğu, hirsütizm ve infertilite gözlenmektedir (1, 4, 5). PKOS'lu anovulatuvar kadınlarda, endokrin sistem değişikliğinden dolayı folliküler gelişimde bozukluk gözlenmektedir (3, 4). Yardımcı üreme teknikleri tedavileri süresince PKOS'lu hastalarda tipik olarak, toplanan oosit sayısında azalma olduğu belirtilmektedir. Bu hastalarda oositlerin kalitesi bozulmakta, fertilizasyon ve implantasyon oranı düşmekte, buna bağlı olarak düşük yapma oranı artmaktadır. Ovaryan faktörlerdeki herhangi bir düzensizlik, oogenezi, oositi çevreleyen granüloza hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi ve embriyonik gelişimi negatif olarak etkilemektedir (1, 6).

Yapılan çalışmalarda PKOS'lu hastalarda özellikle androjen hormonuna bağlı olarak follikül içi mikroçevrenin bozulduğu ve bu nedenle oosit gelişiminin olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir (7). Anovulatuvar PKOS'ta granüloza hücrelerinde anormal çoğalma, oosit ve çevresindeki granüloza hücrelerinin büyümesinde bozulma gözlenmiştir. Bu durumda oosit ile granüloza hücreleri arasındaki normal etkileşimin değiştiği belirtilmiştir (8).

Oogenez sırasında, oosit maturasyonu ve fonksiyonunda rol alan birçok protein sentezi gerçekleşmektedir. Zona pellusida (ZP) tabakasını oluşturan glikoproteinler bunlardandır. Bu tabaka fertilizasyon süresince spermin oosite bağlanmasında ve çeşitli moleküler değişimlerde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda ZP fertilizasyon sırasında polispermiye engel olmakla birlikte oositin ve implantasyon öncesi endometriyumda blastosistin etrafında koruyucu bir bariyer görevi görmektedir (9, 10, 11). İnsan primordial folliküllerinde hem oosit hem de granüloza hücreleri tarafından ZP glikoproteinlerinin sentezlendiği bildirilmiştir (10, 12).

PKOS'lu hastalarda karşılaşılan temel sorun olan hücreler arasındaki etkileşimin bozulması nedeni ile ZP glikoproteinlerinin de sentez mekanizmasının aksayacağı

düŖünölmektedir. Literatürde PKOS'lu hastalarda, oogenez süresince, PKOS'un ZP glikoproteinlerine etkileri ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, günümüzde kadın infertilitesinde önemli bir neden olarak görölen PKOS'un, fertilizasyon ve embriyo gelişiminde büyük rolü olan ZP'de meydana getireceği olası yapısal değişikliklerin ve ZP2 glikoproteininin ekspresyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık yaşındaki kadınlarda, prevalansı %6-10 oranında görülen ve farklı nedenlerden dolayı oluşan bir endokrin sistem bozukluğudur. PKOS'lu hastalarda, karakteristik olarak oligo ya da anovulasyon, büyük polikistik overler, ovaryan hiperandrojenizm gözlenmektedir. PKOS'lu hastalardaki fenotipik ifadenin çeşitliliği klinik çalışmaları zorlaştırmaktadır ve bu nedenle sendromun etiyojisi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (13).

PKOS'lu hastalarda oligo ya da anovulasyon, kistik overler ve hiperandrojenizmin yanı sıra hiperinsülinemi, artan luteinleştirici hormon (LH) sekresyonu, menstrual fonksiyon bozukluğu, hirsütizm ve kısırlık gözlenmektedir. PKOS'lu anovuluar kadınlarda, endokrin sistemdeki dengenin bozulması nedeniyle folliküler gelişim durur (14). Yardımcı üreme teknikleri (ÜYT) tedavileri süresince PKOS'lu hastalarda tipik olarak, toplanan oosit sayısında azalma gözlenmekte, fazla sayıda follikül oluşmakta, fakat gelişen folliküllerin olgunlaşması erken evrede duraksamaktadır (15, 16). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, PKOS'lu hastalardan toplanan oositlerin kalite değerleri düşüktür. Buna bağlı olarak fertilizasyon ve implantasyon oranları PKOS'lu olmayan kadınlara göre azalmaktadır (15).

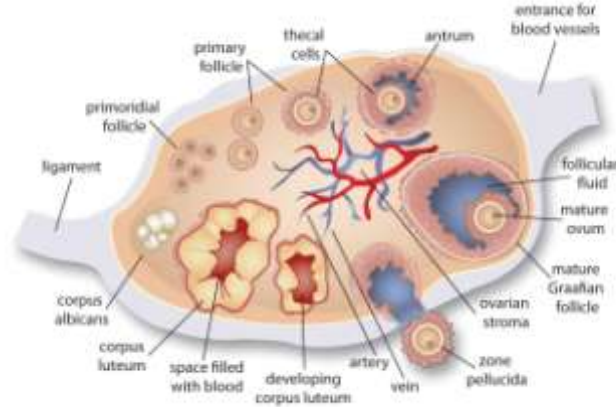
PKOS'lu hastalarda follikül gelişimindeki düzenleyici mekanizmalar bozulmaktadır (17). Ovaryan faktörlerdeki herhangi bir düzensizlik, oositi çevreleyen granüloza hücreleri ve oosit arasındaki iletişimi, oositin olgunlaşmasını, embriyonik gelişimi negatif olarak etkilemektedir. ÜYT tedavisi gören PKOS'lu hastalarda bu durum gözlenmiştir. Bunun sebebinin PKOS'lu hastalardaki yüksek östrojen seviyesi olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda LH seviyesinin de yüksek olması oosit olgunlaşmasını ve fertilizasyon oranını düşürürken, embriyo kalitesini bozar, doğum oranının azalmasına ve düşüklerin artmasına sebep olur (14, 15). PKOS'lu hastalarda LH hormonunun fazla salgılanması follikül stimüle edici hormonunun (FSH) işlevini baskılar ve bu da granüloza hücreleri ile oosit arasındaki etkileşimi bozarak folliküllerin olgunlaşmadan dejenere olmasına ve oluşan antral folliküllerin de küçük kalmasına sebep olur (18).

PKOS, kadınlarda sekonder olarak obesiteye, metabolik hastalıklara, insülin direnç bozukluğuna, kardiovasküler hastalıklara ve diyabete sebep olmaktadır (16, 19).

## 2.2. Normal Follikülogenezis

Oogenezis, oogonya denilen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesi ile gerçekleşen olaylar dizisidir. Hücrelerdeki bu olgunlaşma süreci doğumdan önce başlar, puberte sonrasında tamamlanır. Puberteden başlayarak, üreme yaşamı boyunca kadınlar devamlı olarak aylık üreme siklusuna girer ve bu siklus hipotalamus, hipofiz, ovaryumlar, uterus, uterin tüpler, vajina ve meme bezlerini ilgilendirir (20).

Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizde üretilen FSH ve LH'ı uyararak ovaryum üzerindeki etkisini başlatmış olur. Temel olarak FSH ovaryum follikülünün gelişimini ve follikül hücrelerinden östrojen salınımını sağlarken, LH ovulasyonu tetikler, follikül hücreleri ve korpus luteumu uyararak progesteron üretimini sağlar (19, 21). Follikülogenezis ise follikül havuzundan seçilen folliküllerin büyüme fazına girmesiyle başlar. Erken evrelerinden itibaren, hücresel çoğalma ve farklılaşma aşamalarından geçer ve bir çoğu olgunlaşmasını tamamlayamadan atreziye uğrar (16, 22). Pubertede gonadotropinlerin etkisiyle primordial folliküller, primer follikülleri oluşturur (20) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Ovaryumun şematik yapısı (23).

### 2.2.1. Primordiyal Folliküllerin Primer Folliküllere Gelişimi

Primordial follikül yıllarca dinlenme evresinde kalabilmektedir. Follikülün, primer folliküle gelişimi için gereken sinyaller henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (24). Fakat, gonadotropinlerin büyük etkisi olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra oosit ve granüloza hücreleri tarafından üretilen bazı faktörler primordiyal follikülü aktifleştirmekte ya da bu hücreleri inhibe edebilmektedir (22). Her primordial follikül profaz I'in diploten evresinde bekleyen bir oosit içermektedir ki, bu follikül yassı granüloza hücreleri ile çevrelenmiştir (23, 25). Öncelikle oositte mRNA sentezlenmeye başlar. Follikül, primordial evreyi terk ederken büyüme aşaması başlar, oositte ve granüloza hücrelerinde birçok özel değişiklikler meydana gelir. Granüloza hücreleri yassıdan kübik forma değişir, teka hücre formasyonu oluşur (26). Aynı zamanda bu aşamada Zona Pellusida (ZP) belirir (25). Ayrıca, granüloza hücrelerinde, Anti-mülleryen hormon (AMH) sentezi primer follikül evresinde başlamaktadır. Böylece geride kalan primordial folliküllerin gelişimini etkileyerek dinlenme salonunu terk etmelerini engeller. AMH'nin üretimi oosit kaynaklı faktörlere de cevap olmakta ve primer follikül gelişimini engelleyerek gerekenden fazla follikülün olgunlaşmasını engellemektedir (15, 27).

Primer folliküldeki teka hücre tabakası oluşumu kritik olarak, oosit kaynaklı büyüme-farklılaşma faktörü (GDF-9) ve granüloza hücresi kaynaklı Kit Ligand (KL) faktörüne bağlıdır. KL, integral transmembran proteini olup hematopoetik büyüme faktörüdür (25). Bunlara ek olarak GDF-9 teka hücrelerinin androjen üretimini düzenleyerek androjen miktarını artırır. Teka hücreleri kaynaklı androjen, FSH reseptörünün artmasını sağlamaktadır (22). İnsan ve fare primer follikülünde androjen reseptörleri bulunmaktadır ve farelerle yapılan çalışmalar göstermektedir ki bu reseptörlerin yapısı bozulursa FSH reseptörünün de ekspresyonu azalmakta, follikülogenezis bozulmakta ve prematür ovaryan başarısızlığı gerçekleşmektedir (28, 29). Dahası, androjen reseptörü kaybı hedef alınırsa, murin preantral ve antral granüloza hücrelerinde verimlilik azalmakta, folliküler atrezi oluşmakta ve oositin fertilizasyonu olumsuz olarak etkilenmektedir (30).

### **2.2.2. Primer Folliküllerin Sekonder Folliküllere Gelişimi**

Sekonder follikül gelişimi sırasında folliküller, ek olarak steroid reseptörler kazanmakta ve gap junction miktarı artmaktadır. Sekonder follikül, gelişimi sırasında gonadotropinlere daha bağımlı hale gelmektedir. Bunun sebebi ise reseptör aktivitesinin ve düzeyinin değişmesidir (25). Granüloza hücreleri artmakta, antrum oluşmakta, granüloza hücreleri ve teka hücreleri folliküldeki yerlerini almakta ve çeşitli faktörler salgılanmaktadır (31). Asıl bu dönemin karakteristik özelliği granüloza hücre tabakaları arasında sıvı dolu boşlukların oluşup birleşerek antral boşluğu oluşturmalarıdır (20). AMH, granüloza hücrelerinden sentezlenmektedir ve primer follikül oluşumunu kontrol etmektedir, aşırı miktarda primer follikül oluşumuna FSH ile birlikte engel olmaktadır. Normal AMH düzeyi granüloza hücrelerindeki FSH etkisini negatif yönde etkilemekte ve prematür maturasyonu engellemektedir. FSH dominant follikül seçiminde anahtar rol oynamaktadır (28, 32).

LH reseptörü ise küçük sekonder folliküllerin (primer follikülde yok) teka hücrelerinde bulunurken, granüloza hücrelerinde bulunmamaktadır (21). LH reseptörünü uyaran faktörler net olarak bilinmemektedir, fakat bunlardan birinin GDF-9 ve diğerinin oosit ve granüloza hücre kaynaklı faktörler olduğu düşünülmektedir (29).

### **2.2.3. Sekonder Folliküllerin Tersiyer Folliküllere Gelişimi**

Tersiyer follikül gelişimi, oosit büyümesinin yavaşlaması, granüloza hücre farklılaşması, ekstraselüler sıvı birikimi ve antrumun büyümesi ile karakterizedir (27). Bu dönemde oositin maksimum çapı 140 µm olmaktadır. Bu aşamadan sonra gelişen folliküller arasından dominant follikül seçimi gerçekleşmektedir (31). Tersiyer follikül oluşumunun erken evrelerinde FSH daha etkindir. Follikül büyüklüğü 6-8 mm'ye ulaştığında granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesi başlar, teka kaynaklı androjen üretimine izin verir ve FSH tarafından uyarılan granüloza hücreleri östrojen öncüllerini östrojene çevirmeye başlamaktadır (16). LH tarafından uyarılan teka hücrelerinden ise androjen sentezlenmektedir (21). Folliküller antrumu dolduran sıvı kan damarlarından plazmanın sızmasıyla oluşup bölgesel salgılar ve metabolizma ürünleri ile modifiye hale gelir (26). Antrum sıvısı, hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir (25).



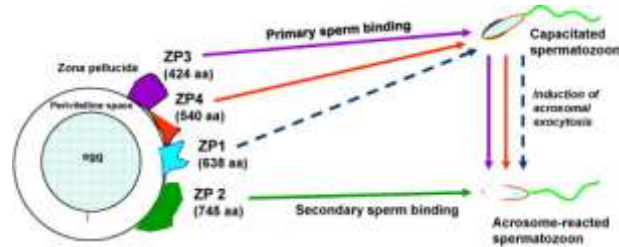
### 2.3. Zona Pellusida'nın Yapısı

Zona Pellusida (ZP), oositin ve implantasyon öncesi blastosistin etrafını çevreleyen, fertilizasyon süresince ve erken embriyonik dönemde birçok önemli işlevi olan bir tabakadır (10,34). Bu yapı fertilizasyon süresince spermin oosite bağlanmasında ve çeşitli moleküler değişimlerde önemli rol oynamaktadır. ZP dölleme sırasında polispermiye engel olmakla birlikte, oositin ve implantasyon öncesi endometriyumda blastosistin etrafında koruyucu bir bariyer görevi de yapmaktadır (36). İlk olarak farelerde tanımlanmış olan ZP glikoproteinleri; ZP1, ZP2 ve ZP3'tür. Daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki; insanda, sıçanlarda, bir tür maymunda ve atlarda ZP4 glikoproteini de bulunmaktadır ve bu dört protein ZP tabakasının üç boyutlu yapısını oluşturmaktadır (34, 36). Türler arasında ZP tabakası benzerlik göstermektedir (11). Fakat, buna rağmen farklı gametlerin etkileşimine engel olmaktadır (38). ZP glikoproteinleri follikülogenezis boyunca salgılanmaktadır, fakat kökeni hala tartışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, insan primordial folliküllerinde, hem oosit hem de granüloza hücreleri tarafından ZP sentezlendiği bildirilmektedir. Granüloza hücrelerindeki ZP boyanmalarındaki farklılığın follikül gelişiminin evreleriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (37).

ZP proteinleri filaman yapısında ekstraselüler ürünler olarak oosit ve granüloza hücrelerinden sentezlenmeye başlar. Bu parçalar follikülogenezis süresince birleşerek zona tabakasını oluşturur (38). ZP tabakası iç içe bağlanmış filamanlardan oluşmaktadır. ZP2 ve ZP3, 140 Å aralıklarla yerleşim göstermektedir. Filamanları birbirine çapraz olarak bağlayan ZP1 glikoproteini ise tabakanın stabilite ve yapısal bütünlüğünü sağlayarak, ZP'ye üç boyutlu yapı kazandırır (39, 40). Fertilizasyon sırasında sperm ZP3'te bulunan oligosakkarit zincirlerinde serine-threonine bölgelerini tanır ve bu bölgelere bağlanır (10). Bu bölgeler türlere özgü bölgelerdir. Bundan dolayı oligosakkaritlerdeki yapısal farklılıklar, türler arasındaki özgünlük derecesini belirler çünkü farklı türlerin gametleri arasındaki etkileşim kültür ortamında gözlenmiş ve fertilizasyonun gerçekleşmediği görülmüştür (36).

Tam kapasite olmuş bir sperm ZP'ye ulaşmadan önce birçok granüloza hücre tabakasından oluşan kumulus ooforusdan geçer. Sperm ve oositin ilk birleşmesi zayıftır ve gametler arasında spesifik olmayan bir birleşme gözlenir (38). Bunu takiben daha sıkı bir bağlanma görülür ki, bu ZP ve sperm yüzeyinde bulunan reseptörler sayesinde

türe özgü bir bağlanmadır (38). İlk bağlandığında sperm akrozom reaksiyonu gösterir ve hidrolitik enzimleri dışarı salınır (39). Birçok enzimatik reaksiyon ve sperm kuyruğunun güçlü itmesi ile sperm ZP tabakasının içine girer. ZP3 primer sperm bağlama reseptörüdür ve spermdeki akrozom reaksiyonunu tetikler (41). ZP3 ve ZP4, sperm akrozom reaksiyonundan sonra spermin oosite bağlanmasını sağlamaktadır. Fakat yapılan çalışmalar göstermektedir ki ZP4 primer sperm reseptörü değildir ve sperm-oosit etkileşimi sırasında ZP3 gibi etkin rolü bulunmamaktadır (42). Bu süre zarfında akrozom reaksiyonu gerçekleştiren spermiler sekonder bağlanma mekanizması ile ZP2 glikoproteinine bağlanır (39). İnsan ZP2 glikoproteini akrozom reaktif sperme bağlanır, görevi ise sekonder sperm reseptörü olmaktır ve aynı zamanda akrozom reaksiyonu gösteren sperme ZP'nin bağlanmasını ve bu durumun devamlılığını sağlar (43). Sonuç olarak sperm perivitellin boşluğa ulaşır, boşluğu geçer ve oosit plazma membranına penetre olarak fertilizasyonu gerçekleştirir. İlk spermin perivitellin boşluğa gelmesi ile oositte hemen kortikal reaksiyon başlar ve kortikal granüller salınır (44). Bu granüller oosit membranı ve ZP'nin yapısını değiştirerek başka bir spermin girişine engel olur ve polispermiyi önler (34). Kortikal granüller içerisinde bulunan proteolitik enzim özelliğindeki ovastasin proteini sayesinde ZP2 yapısı değişime uğrar ve ZP'ye başka bir spermin bağlanması engellenir (44). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki ZP2, embriyonal dönemde, embriyonun gelişimi ve devamlılığı açısından oldukça büyük bir rola sahiptir (43, 46).



Şekil 2.2. Zona Pellusida'nın şematik yapısı (38).

## 2.4. PKOS'ta Follikülogenezis

Follikülogenezis oldukça karmaşık bir süreçtir. Endokrin sistem ile overler arasındaki iletişim follikül içi mikro çevreyi oluşturur ve oosit gelişimi için uygun ortam yaratır. Mikro çevre, kumulus hücreleri ve oosit arasındaki iletişimi direk olarak etkiler, mayozun tamamlanması, fertilizasyonun gerçekleşmesi, embriyo gelişimi ve

tamamlanması için gerekli olan birçok molekül bu sayede aşamalı olarak sentezlenir (17). PKOS'un en temel özelliği hastalarda hiperandrojenizmin görülmesidir (45). Yapılan çalışmalar, sıçanlarda da artan androjen miktarının fertilizasyonu düşürdüğünü göstermektedir (46). Sıçanlarda gebeliğin erken evrelerinde androjen miktarının arttırılması ile doğacak olan dişi yavruların gelişmekte olan overlerinde morfolojik ve fonksiyonel bozukluklara sebep olduğu gösterilmiştir (47). PKOS hiperandrojenizm, hirsütizm, anovulasyon, hiperinsulinemi ve insülin direnç bozukluğu gibi hastalıklarla karakterizedir (13). PKOS'lu hastalarda fazla sayıda follikül oluşmakta, fakat gelişimin erken evrelerinde duraksamakta ve olgunlaşmamaktadır (16). Antral follikülün büyümesinin duraksaması, anormal endokrin çevrenin oluşması ile ilişkilidir (48). LH ve insülin sentezi artmaktadır. İkincil etki ise FSH'nin baskılanmasıdır ki bu durum oositin olgunlaşmasını engellemektedir. PKOS'ta anovulasyon sırasında granüloza hücrelerinde anormal çoğalma ve oosit ile aralarında farklı büyüme evreleri gözlenmektedir (49). Bu durumda oosit ile granüloza hücreleri arasındaki normal etkileşimi değiştirir. Follikül gelişiminin erken evrelerinde gözlenen bu önemli anormallikler, PKOS'ta anovulasyonun temel sebeplerinden olabilir (18).

FSH follikül gelişimini uyaran bir faktördür ve follikülogeneziste yaşamsal önemi bulunmaktadır. İnsanlarda antral follikül 2-5 mm arasındayken follikül FSH'a karşı duyarlılık kazanır ve 6-8 mm çapındaki antral follikül evresinde ise aromataz aktivitesi kazanır ve östrojen düzeyi artmaya başlar (25). Östrojene İnhibin B eşlik eder ve daha sonra geç folliküler fazda FSH seviyesi düşmeye başlar ve sonuç olarak ovulasyona devam edecek olan dominant follikül seçilir. Luteal fazın sonunda da FSH düzeyinde yavaş bir artış olur bu durum bir sonraki ovulasyon siklusu için oldukça önemlidir (50). Bunun tersine PKOS hastalarının normal sikluslarında düşük FSH seviyesi görülür. Sonuç olarak da, FSH eksikliği antral folliküllerin 2-8 mm büyüklüğünde birikmesini neden olur. Dolayısıyla dominant tersiyer follikül seçimi gerçekleşmez (25). ÜYT'ye başvuran PKOS'lu kadınlarda yüksek östrojen seviyesi, fazla sayıda oosit oluşumuna, düşük fertilizasyon oranına, embriyoda fragmantasyon artışına, düşük kalitede blastosist gelişimine ve implantasyon başarısızlığına sebep olmaktadır (18).

PKOS'lu hastalardaki yüksek LH seviyesi, oosit maturasyonunu, fertilizasyon oranını, embriyo kalitesini, gebelik oranını düşürmekte, düşük oranını arttırmaktadır.

Yüksek LH, FSH fonksiyonunu baskılamaktadır. Ayrıca, granüloza hücre luteinizasyonu, folliküler atrezi ve küçük antral follikül oluşumuna sebep olmaktadır (15). LH, prematür oosit nükleusunu etkileyerek mayotik sürece zarar verir ve hücre apoptozuna neden olur. Mayozun üzerindeki endokrin kontrolün bozulması ile kromozomal anomaliler ya da embriyonik anöploidi görülebilmektedir (21).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneş Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deneş Planı

Deneş protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneşleri Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneş Hayvanları Laboratuvarından elde edilen 36 adet 21 günlük Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı. Denekler deneş boyunca, sıcaklığı  $23\pm 1$  °C, nem oranı %45-65 ve 12 saat gündüz, 12 saat gece koşulları sağlanan laboratuvar ortamında, Euro tip, 1820 cm<sup>3</sup>, standart kafeslerde barındırıldı ve her kafeste 7 adet sıçan olacak şekilde yerleştirildi. Deneklerin su ve yemi *ad libitum* olarak verildi. Deneklere ilaç uygulaması her gün saat 13:30-14:00 arasında yapıldı.

#### 3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Denekler, Kontrol grubu (n=12), Taşıyıcı grup (n=12) ve PKOS grubu (n=12) olmak üzere üç gruba ayrıldı.

Kontrol grubundaki deneklere hiç bir işlem uygulanmadı ve 42 günlük denekler sakrifiye edildi.

Taşıyıcı gruba 20 gün boyunca 0,1 ml susam yağı (SigmaAldrich®, katalog no: 85067) subkutan olarak enjekte edildi ve 42 günlük denekler sakrifiye edildi. PKOS grubundaki deneklere 60 mg/kg dehidroepiandrosteron (DHEA, MerckMillipore®, katalogno: 252805) 0,2 ml susam yağında çözdürülerek 20 gün süresince subkutan enjeksiyon yapıldı ve 42 günlük denekler sakrifiye edildi.

Tüm grupları oluşturan deneklerin siklus takibi günlük vajinal smear alınarak yapıldı.

#### 3.3. Overlerin Elde Edilmesi ve Fiksasyonu

Deneş süresi sonunda tüm deneklere ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (100 mg/ml) anesteşileri intraperitoneal olarak uygulandı ve denekler uyutuldu. Deneklerin ağrılı uyarılara yanıt vermediği anlaşıldıktan sonra abdominal bölgeleri açıldı. Deneklerin sağ overleri ışık mikroskobik immünfloresan işaretleme için %4'lük paraformaldehit solüsyonuna alınırken, 4 deneşin sol overi elektron mikroskobik

inceleme için %2,5'lik gluteraldehit solüsyonuna alındı. Tüm gruplardan alınan overler stereo mikroskop ile incelendi ve mikroskoba monte edilen dijital kamera (Nikon® coolpix5000, Tokyo, Japonya) ile fotoğrafları çekildi.

### **3.4. İmmünofloresan İşaretleme Protokolü (50)**

Bütün çalışma gruplarında, ZP'de bulunan ZP2 glikoproteininin ekspresyonunu inceleyebilmek amacıyla immünofloresan işaretleme yapıldı. Bu işaretleme için dokular, aşağıdaki aşamalardan geçirildiler:

1. Paraformaldehit içerisindeki dokular 1 gece buzdolabında (+4 °C) bekletildi.
2. Dokular % 20'lik sükröz solüsyonunda 12 saat bekletildi (+4 °C). Daha sonra %30'luk sükröz ve %0,1'lik sodyum azid içeren solüsyonda 12 saat bekletildi (+4 °C).
3. Dokular kriyostat (Leica® CM1900) kabini içerisinde gömme mediumu (OCT) ile kaplanarak donduruldu ve 10 µm kalınlığında kesitler adheziv kaplı lamlara (Superior Marienfeld-Histobond®) alındı. İşlemlerden önce dokuların etrafı pappen ile çevrildi.
4. Kesitler fosfatlı tuz tamponunda (PBS, pH: 7,4) 3 kez 5'er dakika yıkandı.
5. Zemin boyanmasını engellemek için PBS içinde hazırlanmış %10'luk normal serum (sekonder antikor ile uyumlu) ile 30 dakika, 37 °C'de inkübe edilerek bloklama yapıldı.
6. Kesitler üzerinden blok solüsyon uzaklaştırıldı. %0,5'lik sığır serum albumin içeren PBS (PBS-BSA) ile 1/50 oranında sulandırılmış primer antikor (ZP2; sıçandan elde edilmiş monoklonal antikor, Santa Cruz Biotechnology®, katalog no:-32752) damlatıldı. Negatif kontrol için ise kesitlere sadece %0,5'lik PBS-BSA damlatıldı. Tüm kesitler nemli ortamda 90 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
7. Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
8. Kesitlerin üzerine karanlık ortamda, %0,5'lik PBS-BSA ile 1/200 oranında sulandırılarak hazırlanan sekonder antikor (ZP2 için keçiden elde edilmiş anti sıçan IgG-FITC konjuge sekonder antikor, Santa Cruz Biotechnology®, katalog no: sc-2011) damlatıldı. Kesitler nemli ve karanlık ortamda 45 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
9. Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.

10. Kesitler kurulandıktan sonra hücre çekirdeklerinin boyanması için 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içerikli kapatma medyumu ile kapatıldı. Lam ile lamelin etrafı, kesitlerin hava almasını engellemek için tırnak cilası ile çevrelendi.

### **3.5. İmmüno Floresan İşaretlemenin Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi**

Hazırlanan kesitler Nikon Eclipse Ti-S floresan mikroskop (Nikon©, Japonya) ile görüntüledi ve mikroskoba monte edilmiş dijital kamera ile fotoğraflandı.

İşaretlenmiş kesitlerdeki primer, sekonder, tersiyer folliküller ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme yoğunluğu semi-kantitatif olarak aşağıdaki gibi değerlendirildi:

- 0: Hiç işaretlenme yok
- 1: Az işaretlenme var
- 2: Orta düzeyde işaretlenme var
- 3: Kuvvetli işaretlenme var
- 4: Çok kuvvetli işaretlenme var

### **3.6. Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü (51)**

Bütün çalışma gruplarında, ZP'nin yapısını ve kalınlığını değerlendirmek için dokular elektron mikroskop ile incelendi. Elektron mikroskopik doku takibi için alınan dokular yaklaşık 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalara bölündü. %2,5'lik gluteraldehit solüsyonunda 4-6 saat fikse edildi. PBS ile yıkanan dokular rutin elektron mikroskopik doku takibi protokolü ile hazırlandı.

- 1. %1'lik osmium tetra oksit, 1 saat
- 2. PBS 3 kez 5'er dakika
- 3. %50 etil alkol, +4 °C 15 dakika
- 4. %60 etil alkol, +4 °C 15 dakika
- 5. %70 etil alkol, +4 °C 15 dakika
- 6. %80 etil alkol, +4 °C 15 dakika
- 7. %96 etil alkol, +4 °C 15 dakika
- 8. %100 etil alkol, +4 °C 15 dakika
- 9. %100 etil alkol, +4 °C 15 dakika

10. %100 etil alkol, +25 °C 15 dakika
11. Propilen Oksit, +25 °C 15 dakika
12. Propilen Oksit, +25 °C 15 dakika
13. Propilen Oksit, + Epoksi Rezin +25 °C 30 dakika
14. Propilen Oksit, + Epoksi Rezin +25 °C 30 dakika
15. Epoksi Rezin, +25 °C 16-24 saat

Deney protokolü bitiminde dokular epoksi rezine gömülerek 60 °C'lik etüvde 24 saat süre ile polimerize edildi. Hazırlanan rezin bloklardan ultramikrotom (Leica® Ultracut UCT125, Leica Viyana-Avusturya) ile 70 nm kalınlığında 300 gözenekli bakır gridlere alınan kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı.

- Kesitler uranil asetatta 5 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkandı.
- Kurşun sitratta 5 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkandı.
- Kurutma kağıdı ile kurutuldu.

### **3.7. Elektron Mikroskopik Değerlendirme**

Elde edilen kesitler Geçirmeli (Transmisyon) Elektron Mikroskobu (TEM) (Jeol JEM1011, Japonya) ile incelendi ve ZP yapıları değerlendirildi. Mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Germany) ile fotoğrafları çekildi. Değerlendirilen her follüküle ait ZP'nin 4 farklı bölgesini yansıtacak şekilde 7500 büyütmede 4 fotoğraf çekildi. Bu fotoğraflardan, ticari olarak elde edilebilir yazılım programı iTEM 00000 (Olympus GmbH, Germany) ile kalınlık ölçümü yapıldı ve kaydedildi.

### **3.8. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel olarak, değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Dağılım varsayımı sağlandığı durumda sürekli değişkenler ortalama±standart sapma, sağlanmadığı durumda medyan [min.-max.] cinsinden özetlenmiştir. İkidenden fazla grup karşılaştırmasında dağılım varsayımı sağlandığı durumda ANOVA, sağlanmadığı durumda Kruskal Wallis testinden yararlanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığın kaynağını bulmak için gerekli post hoc



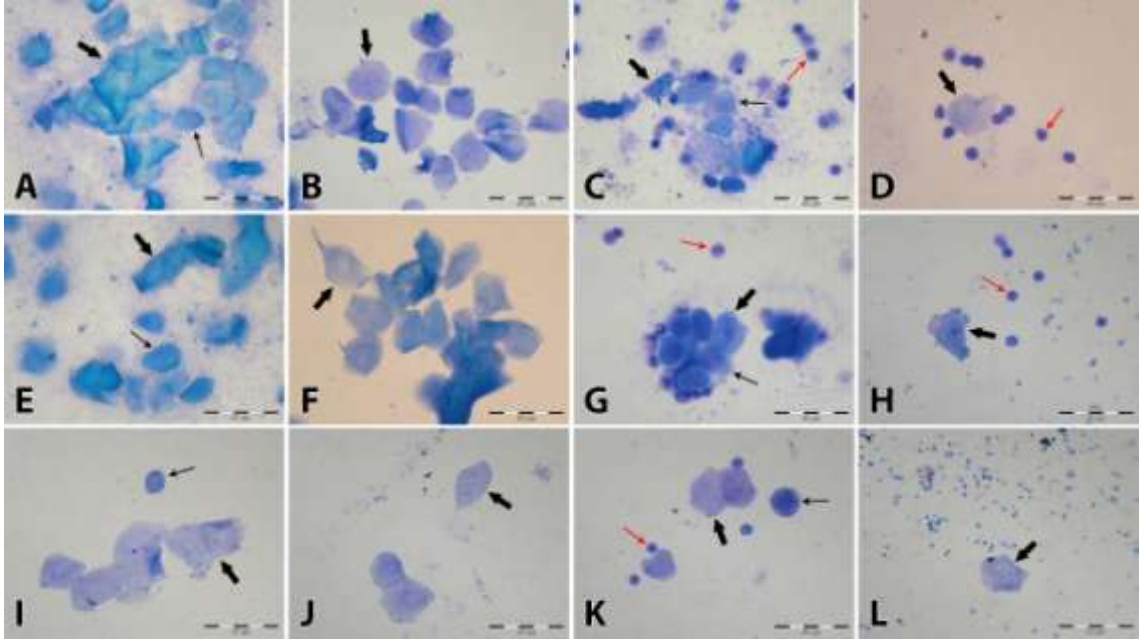
testleri uygulanmıştır. İkiiden fazla bağımlı ölçümlerin karşılaştırılmasında tekrarlanan ölçümlü varyans analizi uygulanmıştır. Analizler SPSS v.11.5 ve MedCalc v.12.3.0 programları ile yapılmıştır.  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Vajinal Smear Bulguları

Kontrol grubu ve taşıyıcı grupta östrus sikluslarının tüm aşamaları benzerlik göstermekteydi. Proöstrus aşamasında, her alanda yüzeysel epitel hücreleri ve kornifiye epitel hücreleri görüldü (Şekil 4.1.A ve 4.1.E). Östrus aşamasında, gruplar oluşturmuş çok sayıda kornifiye epitel hücreleri bulunmaktaydı (Şekil 4.1.B ve 4.1.F). Metaöstrus aşamasında, dağınık halde bulunan yüzeysel ve kornifiye hücreler arasında lökositler gözlemlendi (Şekil 4.1.C ve 4.1.G). Diöstrus aşamasında ise her alanda çok sayıda lökosit görülürken bunlar arasında kornifiye hücrelere rastlandı (Şekil 4.1.D ve 4.1.H).

PKOS grubunda ise proöstrus aşamasında, her alanda yüzeysel epitel hücreleri ve kornifiye epitel hücreleri görüldü, fakat bu hücreler kontrol ve taşıyıcı gruba göre oldukça az sayıda gözlemlendi (Şekil 4.1.I). Östrus aşamasında, gruplar oluşturmuş az sayıda kornifiye epitel hücreleri bulunmaktaydı (Şekil 4.1.J). Metaöstrus aşamasında, dağınık halde bulunan yüzeysel ve kornifiye hücreler arasında lökositler gözlemlendi (Şekil 4.1.K). Diöstrus aşamasında ise her alanda çok sayıda lökosit görülürken bunlar arasında az sayıda kornifiye hücrelere rastlandı (Şekil 4.1.L). Ayrıca PKOS grubunda siklus düzensizlikleri ve siklus sürelerinde uyumsuzluk gözlemlendi. Proöstrus, östrus ve metaöstrus aşamaları diğer gruplara göre daha uzun olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra PKOS grubundaki bireylerde diöstrus aşaması ya daha kısa sürdüğü, ya da bazı sikluslarda hiç olmadığı gözlemlendi.



**Şekil 4.1.** Kontrol, Taşıyıcı ve PKOS gruplarının östrus sikluslarının karşılaştırılması. A) Kontrol grubu proöstrus, B) östrus, C) metaöstrus ve D) diöstrus aşamaları. E) Taşıyıcı grup proöstrus, F) östrus, G) metaöstrus ve H) diöstrus aşamaları. I) PKOS grubu proöstrus, J) östrus, K) metaöstrus ve L) diöstrus aşamaları. Yüzeysel hücreler (ince oklar), kornifiye hücreler (kalın oklar), lökositler (kırmızı oklar). (Toluidin mavisi x 1200).

#### 4.2. Stereo Mikroskobik Bulgular

Kontrol grubu ve taşıyıcı grupta incelenen overlerin boyutları normal sınırlarda ve over yüzeylerinin görünümünün normal olduğu saptandı (Şekil 4.2.A ve Şekil 4.2.B). PKOS grubunda ise diğer gruplara göre over boyutunun arttığı ve over yüzeyinden izlenen çok fazla sayıda sekonder ya da tersiyer follikülün bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.C).



**Şekil 4.2.** Overlerin stereo mikroskobik görünümü. A) Kontrol grubu ve B) Taşıyıcı grupta normal boyutlarda ve düzgün yüzeyli over görünümü. C) PKOS grubunda ise over yüzeyinde sekonder ya da tersiyer folliküllerin boyutlarında artış ve kistik yapılar (ok başları). (x45).

### 4.3. Işık Mikroskobik Bulgular

Foliküler gelişimin erken evrelerinden itibaren primer, sekonder ve tersiyer follikül aşamalarında ZP ve oositi çevreleyen granüloza hücrelerinde immün işaretleme yoğunlukları incelenmiştir.

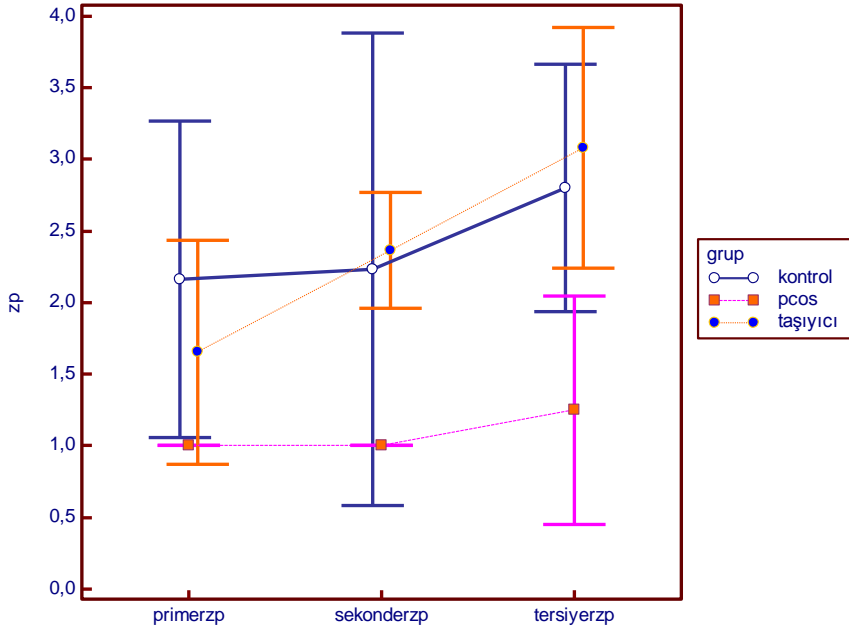
Kontrol ve taşıyıcı grupları arasında ZP boyanma yoğunluğu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,909$ ) (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4.A, 4.5.B, 4.5.C, 4.5.D, 4.5.E, 4.5.F). Her iki grupta ZP değerleri bakımından, primer ile tersiyer folliküller arasında anlamlı bir farklılık ( $p=0,009$ ) vardır ve tersiyer folliküllerde ZP2 boyanma yoğunluğu artmıştır (Şekil 4.3). Her iki grup içinde sekonder ile tersiyer folliküller ( $p=0,041$ ) arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ve tersiyer folliküllerin ZP2 boyanma yoğunluğu sekonder folliküllere göre fazladır (Şekil 4.3). Fakat kontrol grubu ve taşıyıcı grupta primer ile sekonder folliküller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,217$ ) (Şekil 4.3).

PKOS grubu ise ZP boyanma değerleri bakımından kontrol grubundan ve taşıyıcı gruptan istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=0,001$ ) (Şekil 4.3). PKOS grubunda, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde ZP2, kontrol ve taşıyıcı grupların tüm folliküler aşamalarına göre daha az işaretlenmiştir (Şekil 4.5.G, 4.5.H, 4.5.I). Bununla birlikte yine PKOS grubunda da, primer ve sekonder folliküllerin ZP2 işaretlenme yoğunluklarında anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,217$ ), primer ve tersiyer ( $p=0,009$ ) ve sekonder ve tersiyer folliküller ( $p=0,041$ ) arasında ise anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (Şekil 4.3).

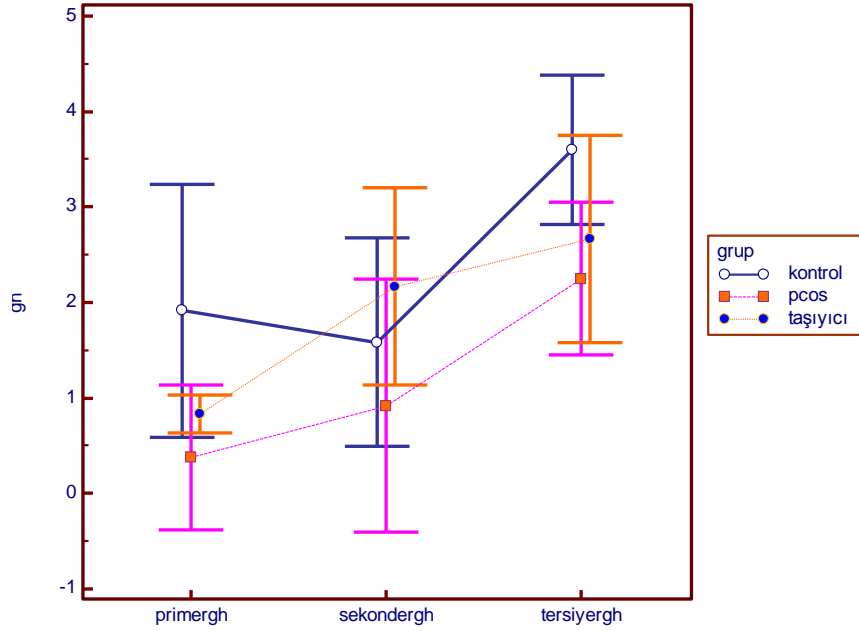
Kontrol ve taşıyıcı grupları arasında granüloza hücrelerinde boyanma yoğunluğu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,129$ ) (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5.A, 4.5.B, 4.5.C, 4.5.D, 4.5.E, 4.5.F). Her iki grupta granüloza hücre değerleri bakımından, primer ile tersiyer folliküller arasında ( $p<0,001$ ) anlamlı bir farklılık vardır ve tersiyer folliküllerde ZP2 boyanma yoğunluğu artmıştır (Şekil 4.4). Her iki grup içinde sekonder ile tersiyer folliküller ( $p=0,002$ ) arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ve tersiyer folliküllerin ZP2 boyanma yoğunluğu sekonder folliküllere göre fazladır (Şekil 4.4). Fakat kontrol grubu ve taşıyıcı grupta primer ile sekonder folliküller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,086$ ) (Şekil 4.4).

PKOS grubu ise granüloza hücreleri boyanma değerleri bakımından kontrol grubundan ( $p=0,003$ ) ve taşıyıcı gruptan ( $p=0,034$ ) istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (Şekil 4.5.G, 4.5.H, 4.5.I). PKOS grubunda, primer, sekonder ve tersiyer follikül evrelerinde, ZP2, kontrol ve taşıyıcı grupların tüm folliküler aşamalarına göre daha az işaretlenmiştir (Şekil 4.4). Bununla birlikte yine PKOS grubunda da primer ve sekonder folliküllerin ZP2 işaretlenme yoğunluklarında anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0,086$ ), primer ve tersiyer ( $p<0,001$ ) ve sekonder ve tersiyer folliküller ( $p=0,002$ ) arasında ise anlamlı bir farklılık saptanmıştır (Şekil 4.4).

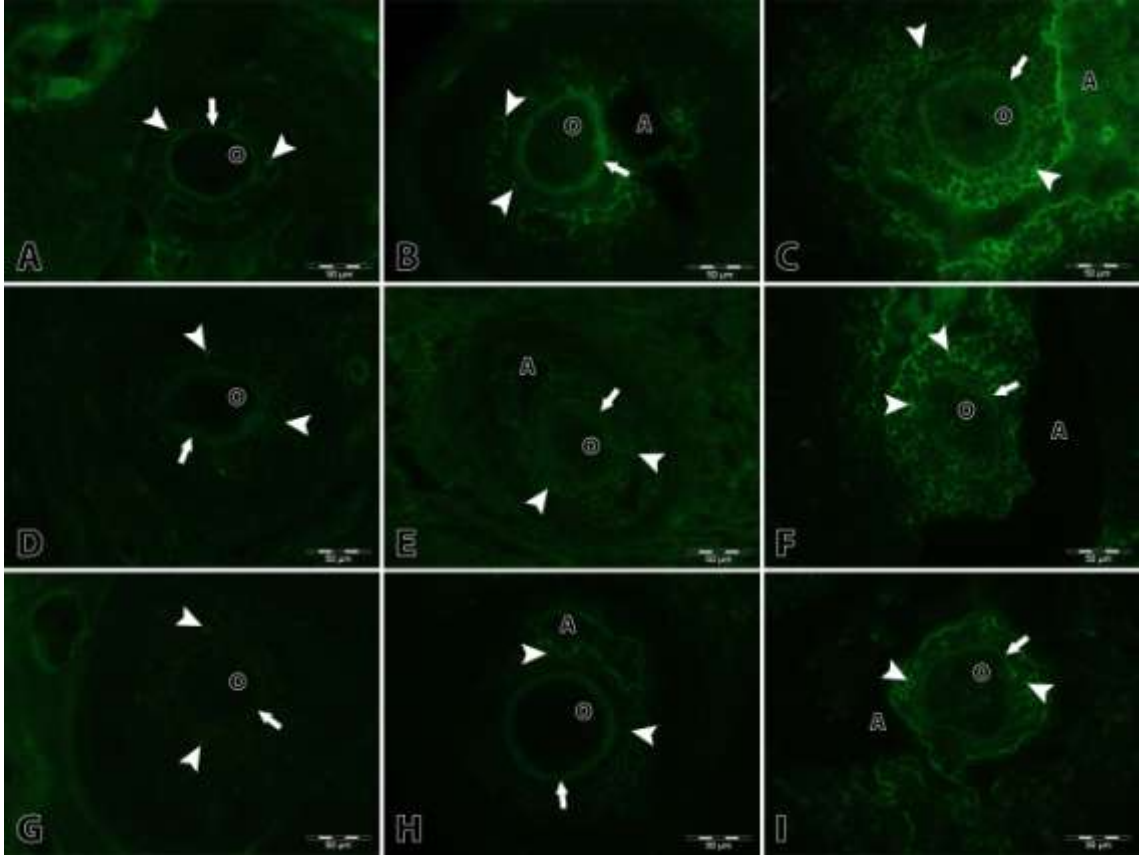
ZP2 primer antikoru ile yapılan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir immün işaretleme gözlenmemiştir.



**Şekil 4.3.** Folliküler gelişim evrelerinde ZP tabakasında ZP2 immün işaretleme yoğunluklarının grafiksel olarak gruplar arası karşılaştırılması.



**Şekil 4.4.** Folliküler gelişim evrelerinde granüloza hücrelerinde ZP2 immün işaretleme yoğunluklarının grafiksel olarak gruplar arası karşılaştırılması.



**Şekil 4.5.** ZP2 immün işaretleme yoğunluklarının gruplar arası karşılaştırılması. Kontrol (A, B, C), Taşıyıcı (D, E, F) ve PKOS (G, H, I) gruplarında primer folliküllerde (A, D, G) granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve ZP tabakasında immün işaretleme, sekonder folliküllerde (B, F, H) granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve ZP tabakasında immün işaretleme, tersiyer folliküllerde (C, F, I) granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve ZP tabakasında immün işaretleme (FITC $\times$ 400).

#### 4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular

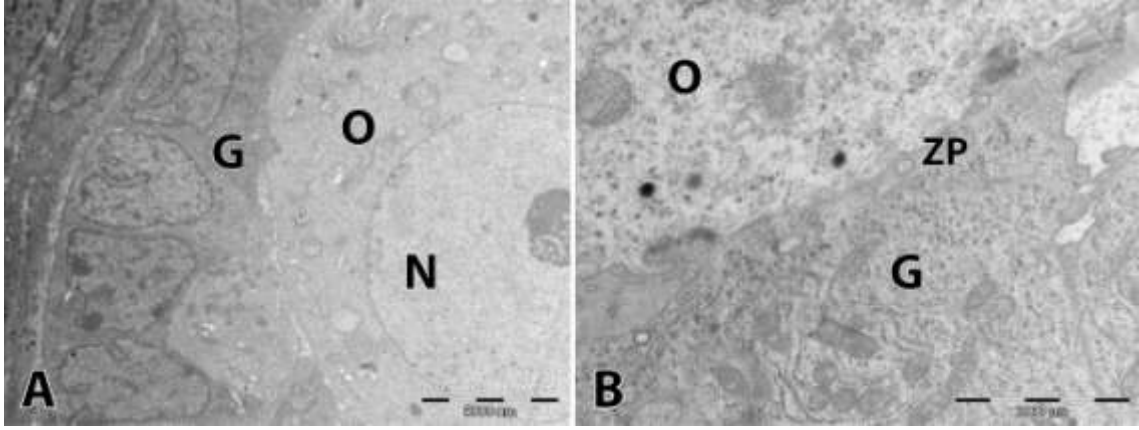
Bütün gruplarda follikülogenezisin farklı aşamalarındaki folliküller incelendi. Kontrol grubunda unilaminar primer follikül evresinde granüloza hücrelerinin tek katlı yassı formda olduğu ve Zona formasyonunun henüz şekillenmediği görülürken (Şekil 4.6.A), Multilaminar primer follikül evresinde Zonanın oluşmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.6.B). Bütün gruplarda her follikül evresine ait zona kalınlığı ölçüldü. Tüm gruplarda ZP kalınlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.7). Kontrol grubunda ve taşıyıcı grupta benzer bulgulara rastlandı. Her iki grupta da folliküler hücrelerin ve ZP'nin normal ultrastrüktürel yapıda olduğu görüldü. Primer folliküllerde oositi çevreleyen granüloza hücreleri düzenli ve normal yapıda gözlemlendi

(Şekil 4.8.A, 4.8.B, 4.8.C, 4.8.D, 4.8.E, 4.8.F). Multilaminer primer follüküllerde granüloza hücreleri ve follükülü çevreleyen teka hücreleri normal yapıdaydı. Sekonder ve tersiyer follüküllerde ZP'nin normal ultrastrüktürel yapıda olduğu, granüloza hücrelerinin ve teka hücrelerinin normal yapıda olduğu saptandı (Şekil 4.9.A, 4.9.B, 4.9.C, 4.9.D, 4.9.E, 4.9.F ve Şekil 4.10.A, 4.10.B, 4.10.C). Granüloza hücrelerinin bazal laminasının da ince yapı düzeyinde normal olduğu saptandı (Şekil 4.12.A, 4.12.B). Oositi çevreleyen granüloza hücrelerinin bazılarında lipid vakuolü olduğu gözlemlendi. Tüm follüküler aşamalarda oositler ve ZP yapısı normaldi. Oosite ait mitokondrilerin bazılarında krista kaybı gözlemlense de, genel olarak mitokondriler, Golgi aparatı ve diğer organellerin yapısı normal olarak izlendi. ZP'de oosit ve granüloza hücrelerinin çok sayıda sitoplazmik uzantısı görüldü.

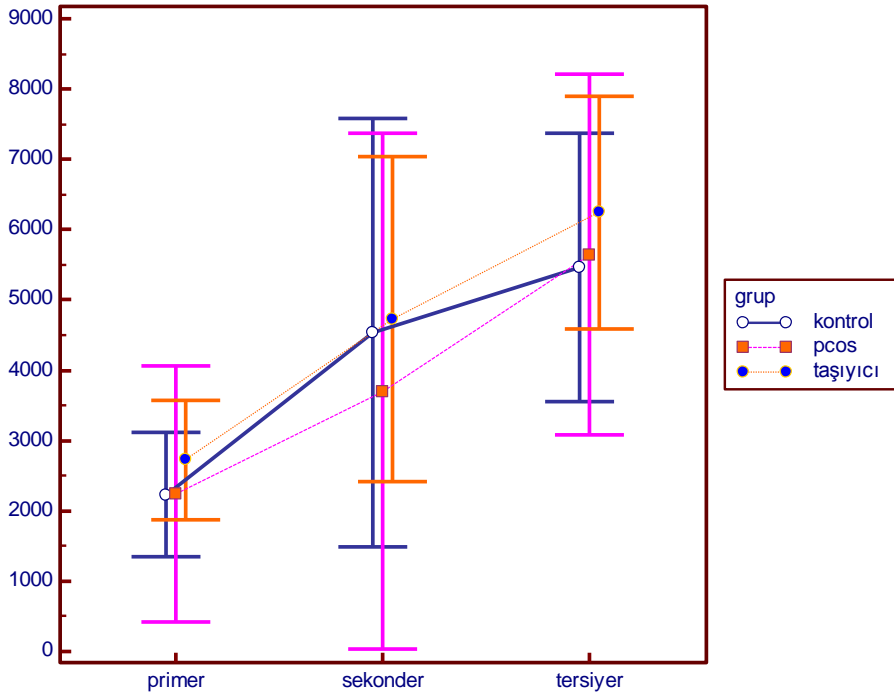
PKOS grubunda primer, sekonder ve tersiyer follüküllerdeki ZP yapılarında belirgin bir dansite artışı ve bazı bölgelerde düzensizlik görüldü. Bütün follüküllerdeki ZP yapısı boyunca yer yer granüler yapılar ve çok sayıda küçük ve orta çaplı vakuol dikkati çekti (Şekil 4.8.G, 4.8.H, 4.8.I, Şekil 4.9.G, 4.9.H, 4.9.I, 4.9.J, 4.9.K, 4.9.L, Şekil 4.10.D, 4.10.E, 4.10.F ve Şekil 4.11.D, 4.11.E, 4.11.F). Follükülogenezisin farklı aşamalarındaki follüküler evrelerde, oositi çevreleyen granüloza hücrelerinde lipid vakuollerinde artış olduğu saptandı. Ayrıca granüloza hücrelerinde granüllü endoplazma retikulumu ve Golgi sisternalarında genişlemeler görüldü. Bazal laminada ise birçok alanda kalınlaşma ve bazal lamina üzerinde düzensizlikler olduğu saptandı (Şekil 4.12.C). Oosit sitoplazmasında mitokondrilerde krista kaybının sayısının artmış olduğu gözlemlendi ve mitokondrilerde şişkinlik belirlendi.

Tüm gruplarda yapılan ultrastrüktürel incelemelerde ve ZP ölçümlerinde dejenerer follüküller analiz dışında bırakıldı (Şekil 4.13.A, 4.13.B, 4.13.C).

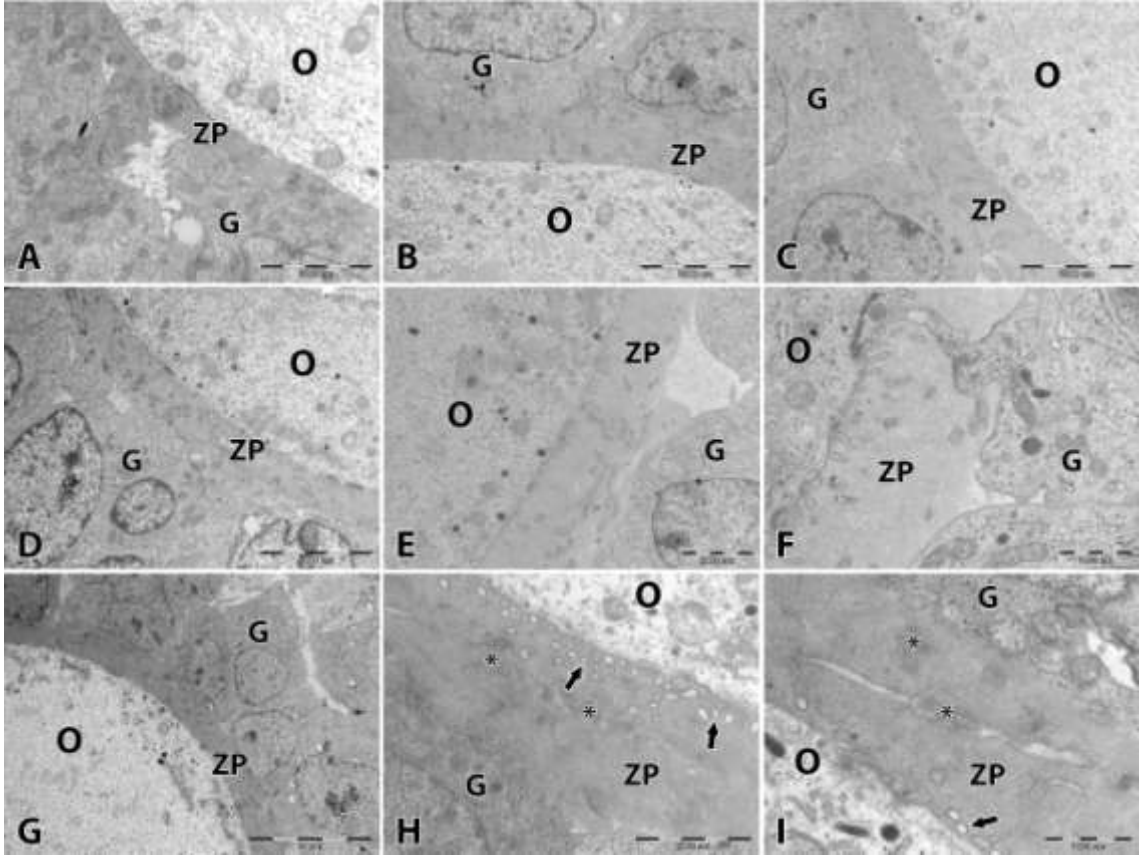




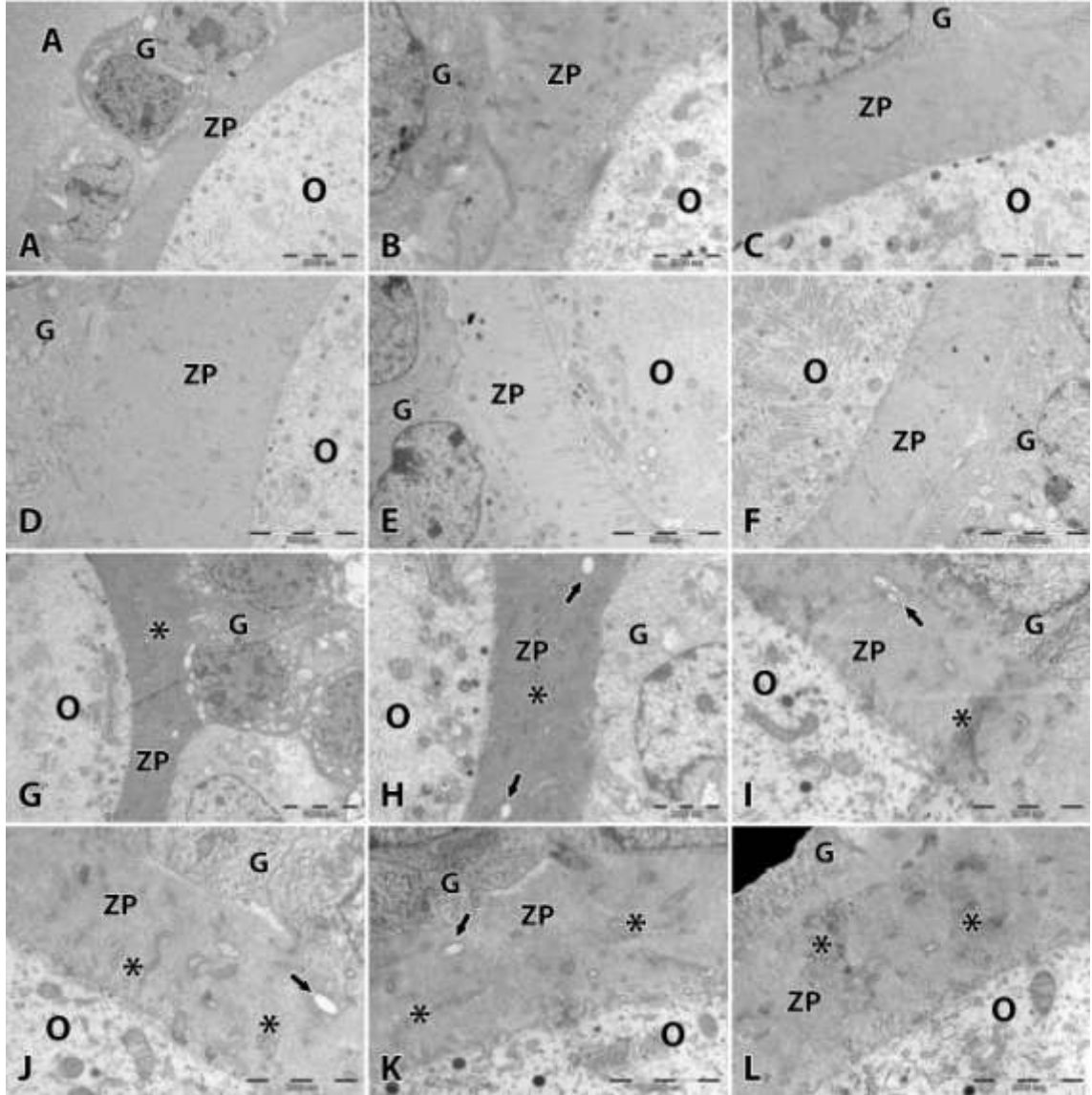
**Şekil 4.6.** Kontrol grubu, unilaminer ve multilaminer primer follükül evreleri. A) Unilaminer primer follükül (x6000). B) Multilaminer primer follükül (x20000). Zona Pellusida (ZP), oosit (O), granüloza hücreleri (G), nükleus (N) (Uranil asetat-kurşun sitrat).



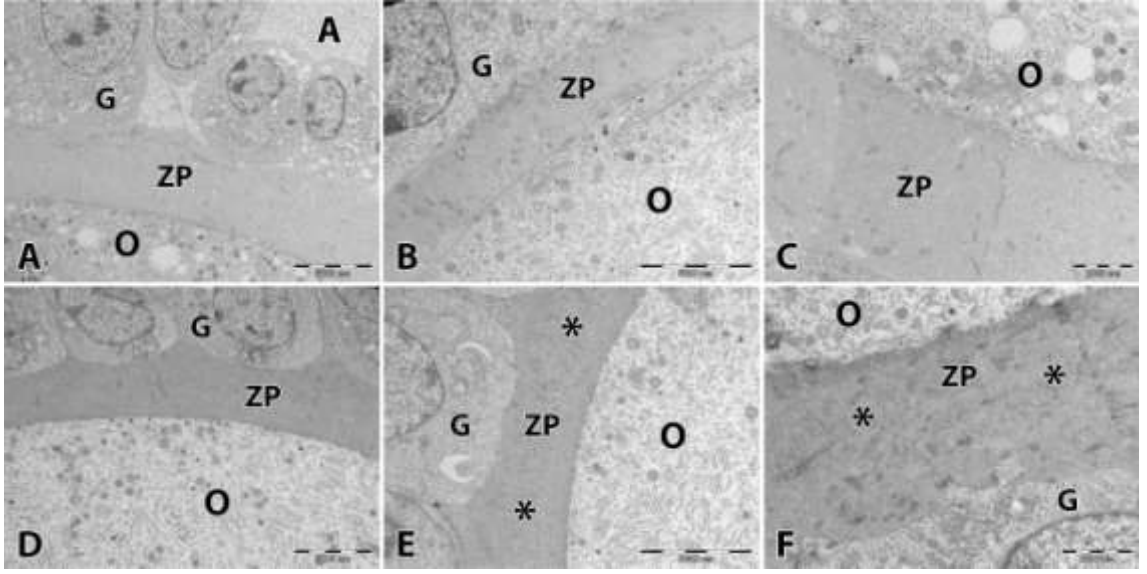
**Şekil 4.7.** Tüm follüküller evrelere ait ZP kalınlıklarının grafiksel olarak gruplar arası karşılaştırılması.



**Şekil 4.8.** Kontrol, Taşıyıcı ve PKOS gruplarında multilaminar primer follikül evrelerinin elektron mikroskopik karşılaştırılması. A) Kontrol multilaminar primer follikül (x7500), B) Kontrol multilaminar primer follikül (x7500), C) Kontrol multilaminar primer follikül (x7500), D) Taşıyıcı multilaminar primer follikül (x7500), E) Taşıyıcı multilaminar primer follikül (x12000), F) Taşıyıcı multilaminar primer follikül (x25000), G) PKOS multilaminar primer follikül (x4000), H) PKOS multilaminar primer follikül (x20000), I) PKOS multilaminar primer follikül (x30000). Zona Pellusida (ZP), oosit (O), granüloza hücreleri (G), zona vakuolleri (ok), granüler-dens yapılar (asterisk). (Uranil asetat-kurşun sitrat).

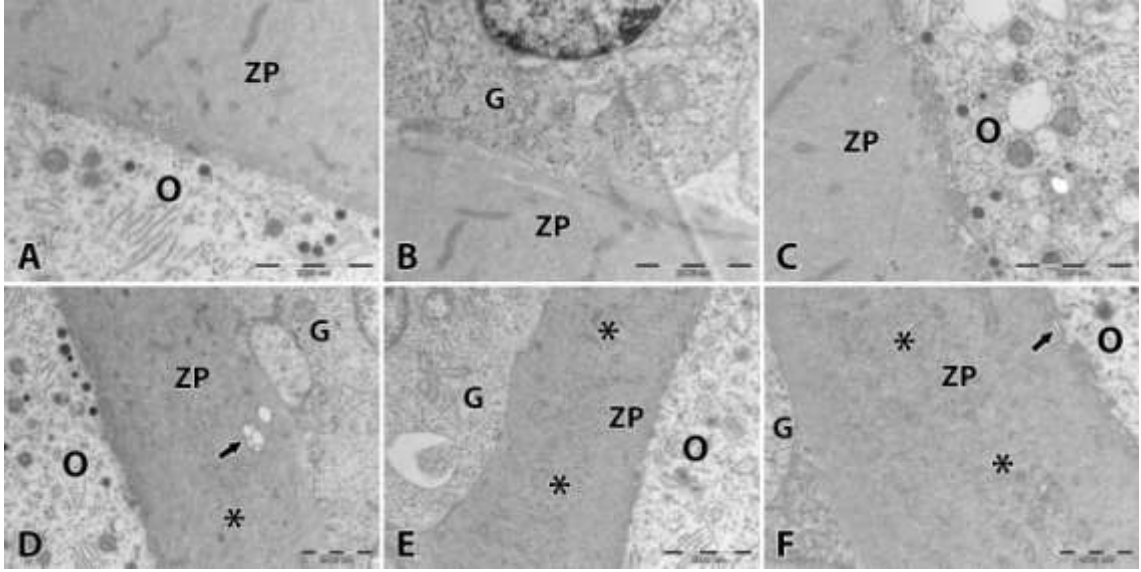


**Şekil 4.9.** Kontrol, Taşıyıcı ve PKOS gruplarında sekonder follükül evrelerinin elektron mikroskopik karşılaştırılması. A) Kontrol sekonder follükül (x5000), B) Kontrol sekonder follükül (x12000), C) Kontrol sekonder follükül (x15000), D) Taşıyıcı sekonder follükül (x7500), E) Taşıyıcı sekonder follükül (x7500), F) Taşıyıcı sekonder follükül (x7500), G) PKOS sekonder follükül (x5000), H) PKOS sekonder follükül (x12000), I) PKOS sekonder follükül (x20000), J) PKOS sekonder follükül (x20000), K) PKOS sekonder follükül (x20000), L) PKOS sekonder follükül (x20000). Zona Pellusida (ZP), oosit (O), granüloza hücreleri (G), zona vakuolleri (ok), granüler-dens yapılar (asterisk). (Uranil asetat-kurşun sitrat).



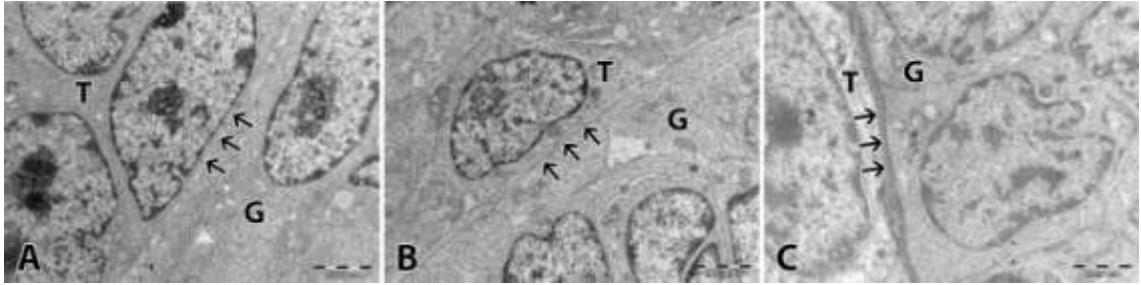
**Şekil 4.10.** Kontrol ve PKOS gruplarında tersiyer follüküllerin elektron mikroskopik karşılaştırılması.

A) Kontrol tersiyer follükül (x5000), B) Kontrol tersiyer follükül (x7500), C) Kontrol tersiyer follükül (x10000), D) PKOS tersiyer follükül (x5000), E) PKOS tersiyer follükül (x7500), F) PKOS tersiyer follükül (x12000). Zona Pellusida (ZP), oosit (O), granüloza hücreleri (G), granüler-dens yapılar (asterisk). (Uranil asetat-kurşun sitrat).



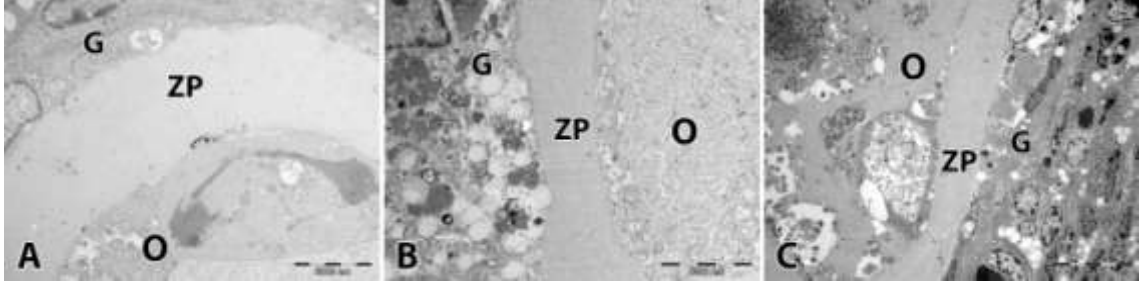
**Şekil 4.11.** Kontrol ve PKOS gruplarında tersiyer folliküllerin elektron mikroskopik karşılaştırılması.

A) Kontrol tersiyer follikül (x5000), B) Kontrol tersiyer follikül (x7500), C) Kontrol tersiyer follikül (x10000), D) PKOS tersiyer follikül (x5000). E) PKOS tersiyer follikül (x7500), F) PKOS tersiyer follikül (x12000). Zona Pellusida (ZP), oosit (O), granuloza hücreleri (G), zona vakuolleri (ok), granüller, dens yapılar (asterisk). (Uranil asetat-kurşun sitrat).



**Şekil 4.12.** Kontrol, Taşıyıcı, PKOS gruplarında bazal laminanın elektron mikroskopik karşılaştırılması.

A) Kontrol, B) Taşıyıcı ve C) PKOS gruplarında, sekonder foliküllerde bazal laminanın elektron mikroskopik karşılaştırılması (Uranil asetat-kurşun sitrat x10000).



**Şekil 4.13.** Kontrol, Taşıyıcı, PKOS gruplarında dejenere folliküller. A) Kontrol dejenere follikül (x5000), B) taşıyıcı dejenere follikül (x6000) ve C) PKOS dejenere follikül (x2500) (Uranil asetat-kurşun sitrat).

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçan overleri ile yapılan ZP2 immün boyama sonucunda PKOS grubunda, kontrol ve taşıyıcı gruba kıyasla, ZP2 ekspresyonunun tüm folliküler aşamalarda, hem granüloza hücrelerinde, hem de ZP tabakasında anlamlı olarak azalmış olduğunu tespit ettik. Sander ve ark. (16) yaptıkları çalışmada, bazı ovaryan faktörler nedeni ile PKOS'lu hastalarda fazla sayıda oluşan folliküllerin, gelişimin erken evrelerinde duraksadığını ve olgunlaşmadığını göstermişlerdir. Biz bu bilgiler ışığında çalışmamızda, follikül içi mikroçevrenin değiştiği PKOS'da, follikülogenezisin primer follikül evresinde, oosit ve granüloza hücreleri tarafından sentezlenen ve zona proteinlerinden biri olan ZP2 glikoproteinini, ekspresyonunu ve ince yapısını göstermeyi planladık.

Follikülogenezis oldukça karmaşık bir süreçtir. Endokrin sistem ile overler arasındaki iletişim follikül içi mikroçevreyi oluşturur ve oosit gelişimi için uygun ortam hazırlar. Mikroçevre, granüloza hücreleri ve oosit arasındaki iletişimi direk olarak etkiler, mayozun tamamlanması, fertilizasyonun gerçekleşmesi ve embriyo gelişimi için gerekli olan birçok molekül bu sayede aşamalı olarak sentezlenir (18). Follikül gelişimindeki bu düzenleyici mekanizmanın bir kısmı oosit tarafından kontrol edilir. PKOS'lu hastalarda bu mekanizma kolaylıkla etkilenmektedir (17).

Çalışmamızda günlük olarak her bir grubun bireylerinden vajinal smear alınmış ve incelenmiştir. Kontrol grubu ve taşıyıcı grubun smear sonuçları benzerlik göstermekte ve menstrual sikluslarının düzenli olduğu saptanmaktadır. Ancak PKOS grubuna ait bireylerin tamamında siklus düzensizlikleri belirlenmiş proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus aşamalarında bulunan hücrelerin sayılarında diğer gruplara göre azalma görülmüştür. Bu durumda bizlere, günlük olarak belirtilen dozda subkutan olarak uygulanan DHEA'nın over gelişimini etkilediğini ve bu durumun vajinal smearde bulunan hücre yoğunluklarına yansımış olduğunu düşündürmektedir. Muarya ve ark. (52) yaptıkları çalışmada da DHEA ile farelerde PKOS modeli oluşturulmuş ve fenotipik olarak polikistik overlere sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Zona proteinleri, follikülogenezis sırasında gelişmekte olan oosit ve granüloza hücreleri tarafından eş zamanlı olarak sentezlenmektedir (38). Bu proteinler, oositin

fertilizasyonundan başlayarak gelişen embriyonun implantasyonuna kadar geçen sürede önemli rol oynamaktadır (10). Zona proteinlerinden herhangi birinin, genetik olarak sentezlenmesinin engellendiği farelerle yapılan çalışmalarda, follikülogenezis ve infertilitede anomaliler gözlenmiştir (38). ZP2'nin eksikliği direk olarak fertilizasyonu engellemektedir (43). Bu durum bizlere; fertilizasyon ve gebelik oranının düşük olduğu PKOS'un, gelişmekte olan oosit ve granüloza hücreleri arasındaki sinyal mekanizmasını etkileyerek zona proteini olan ZP2 ekspresyonunu azaltabileceğini düşündürdü.

Murin model çalışmaları göstermektedir ki, ZP3 primer sperm reseptörü olarak rol oynamakta, kapasite olmuş sperme bağlanmakta ve akrozomal ekzositosun gerçekleşmesini sağlamaktadır. ZP2 ise sekonder sperm reseptörü olarak görev almakta ve akrozom reaksiyonu gösteren spermin ZP'ye bağlanmasını ve devamlılığını sağlamaktadır (39). Rankin ve ark. (53) ZP2 geni olmayan farelerle yaptıkları çalışmada ZP1 ve ZP3 proteinlerinin sentezlendiğini ve ZP tabakasının oluştuğunu gözlemişlerdir. Fakat folikül gelişiminin erken evrelerinde daha ince ZP tabakası gözlenmiş, ayrıca ilerleyen follikül aşamalarında ZP tabakası devamlılık göstermemiştir. Bu çalışmada, PKOS modeli oluşturulmuş sıçanlarda oosit ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimin parakrin ve otokrin faktörlerin değişimi nedeni ile olumsuz olarak etkilendiği düşünülmektedir. ZP2 ekspresyonunun bu nedenle tüm folliküler aşamalarda azaldığı düşünülmektedir. Bu durum, PKOS'un sebep olduğu düşük fertilizasyonun nedenlerinden birinin, bozulan ZP yapısı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda tersiyer follikül aşamasında ZP2 ekspresyonunun oosit ve granüloza hücrelerinde, diğer folliküler aşamalara göre anlamlı olarak azaldığı görülmekteydi. Bu sonuç bize, sekonder sperm bağlama reseptörü olan ZP2 glikoproteininin miktarının azalmasının ZP'nin üç boyutlu yapısını değiştiriyor olabileceğini düşündürmüştür. Aynı zamanda, PKOS'lu vakalarda düşük implantasyon oranında rapor edilmiştir (16). Oosit ve sperm etkileşimi başarıyla gerçekleşse dahi, oluşan embriyoyu implantasyon sürecine kadar koruyan ZP yapısının bütünlüğü, azalan ZP2 glikoproteini nedeni ile bozulacağından, başarılı bir implantasyon gerçekleşmeyebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, kontrol ve taşıyıcı gruplarında, multilaminar primer, sekonder ve tersiyer follikül aşamalarda, oositi çevreleyen ZP yapısının normal ve düzenli olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda oosit ve granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantılarının da ZP üzerinde belirgin bir yapıda olduğu görüldü. Çalışmamızla uyumlu olarak, Shahedi ve



ark. (54) transmisyon elektron mikroskobu ile, infertil hastalardan toplanan normal, matür oositlerde ZP ince yapısının sıkı paketlenmiş fibriller yapıda, normal ve düzenli olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızın PKOS grubunda ise ZP yapısında, oositte ve granüloza hücrelerinde ultrastrüktürel değişikliklere rastlanmıştır. Bu çalışmada, PKOS grubunda multilaminar primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin ZP yapısının kontrol ve taşıyıcı gruplarına göre daha yoğun olduğu ve granüler alanlar içerdiği tespit edildi. Aynı zamanda PKOS grubundaki oositlere ait zonalarda vakuoler yapılar gözlemlendi. Oosit ve granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantılarında sayıca azaldığı belirlendi. Shi ve ark.'nın (55) yapmış olduğu çalışmada, ÜYTE tedavisi için gelen hastalardan toplanmış oositlerden koyu zonaya sahip olanlar TEM ile incelenmiş ve yapılan analizler sonucu koyu ZP üzerinde normal ZP'lere kıyasla çok daha fazla granüler yapı olduğu rapor edilmiştir. Çalışmacılar yüksek yoğunluklu granüler materyallerin varlığının zonanın koyu görünmesine sebep olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca koyu ZP'ye sahip oositlerin fertilizasyon oranlarının değişmediğini, fakat kaliteli embriyo yüzdesinin, implantasyon ve klinik gebelik oranlarının anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Ovaryan faktörlerdeki herhangi bir düzensizlik, oositi çevreleyen granüloza hücreleri ve oosit arasındaki iletişimi bozmaktadır. Bunun sebebinin PKOS'lu hastalardaki yüksek östrojen seviyesi olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda LH seviyesinin de yüksek olması oosit olgunlaşmasını ve fertilizasyon oranını düşürürken, embriyo kalitesini bozar, doğum oranının azalmasına ve düşüklerin artmasına sebep olur (15). Bu bilgiler bize, bozulan bu endokrin çevre nedeniyle, oosit ve granüloza hücreleri tarafından sentezlenen ZP2 glikoproteininin miktarının etkilendiğini ve oluşan ZP yapısının ultrastrüktürel düzeyde anormalliklere sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda PKOS grubunda granüloza hücre bazal laminalarında kalınlaşma ve düzensizliğe rastlandı. Aynı zamanda bazal lamina kalınlaşması gösteren granüloza hücrelerinde lipid vakuollerinde artış görüldü. Irving-Rodgers ve ark. (56) çalışmalarında sağlıklı sığırlardan elde ettikleri folliküllerin bazılarında granüloza hücre bazal laminalarında kalınlaşma ve düzensizlik gözlemlenmiş ve bu folliküllerde, oositlerde maturasyon yetersizliği olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bazal lamina düzensizliği gösteren folliküllerde granüloza hücre çoğalmasında ve antrum genişlemesinde yetersizlik olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bazal laminanın hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli rolleri bulunduğunu belirtmektedir (57). Yapılan bir diğer

çalışmada ise yalnızca poli kistik overe (PKO) sahip hastaların ve sağlıklı kadınların granüloza hücre çoğalması, bölünme siklusunda bulunan, minichromosome maintenance protein 2 (MCM 2) işaretlemesi yapılarak incelenmiş ve anovulatuvar PKO'da granüloza hücre bölünmesinin anlamlı olarak artış gösterdiği belirtilmiştir (58). Yapılan bir diğer araştırmada, PKOS'ta anovulasyon sırasında granuloza hücrelerinde anormal çoğalma ve oosit ile aralarında farklı büyüme evreleri gözlenmektedir. Araştırmacılar bu durumun, oosit ve granüloza hücreleri arasındaki normal etkileşimi değiştirdiğini belirtmektedir. Folikül gelişiminin erken evrelerinde gözlenen bu önemli anormalliklerin, PKOS'ta anovulasyonun temel sebeplerinden biri olabileceği düşünülmektedir (8). Yapılan bu çalışmalar ışığında, PKOS'ta fazla miktarda gözlenen hücre çoğalmasının sebeplerinden birinin de bazal lamina kalınlaşması ve düzensizliği ile beliren bazal lamina anormallikleri olabileceği belirtilmektedir.

Çalışmamızda tüm grupların oosit sitoplazmalarında şişmiş mitokondriyonlar ve bazı mitokondriyonlarda krista kaybına rastlanmıştır. Fakat PKOS grubuna ait oositlerin sitoplazmasında anormal mitokondriyon sayısının artmış olduğu görülmüştür. Koyu zonaya sahip oositler ile yapılan çalışmada anormal mitokondriyon ve çok sayıda vakuol görülürken, diğer organellerin yapısında anormallikler gözlenmemiştir ve koyu ZP'ye sahip oositlerin mitokondriyonlarında krista kaybı, mitokondriyal veziküller ve membran bozuklukları gözlenmiştir (56). Bununla birlikte koyu ZP ile çevrili oositler ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda, farklılaşma, morfoloji ve mitokondriyonlardaki yetersiz geri dağılımın oositin metabolik aktivitesini, fertillizasyon oranının ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (59). Bu bilgilerde bizlere çalışmamızda, PKOS grubunda, tüm folliküler evrelerde artan anormal mitokondriyonların oosit ve granüloza hücreleri arası etkileşimin bozulmasının nedenlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda; PKOS'ta follikülogenezisin primer follikül aşamasından itibaren ZP2 glikoproteininin ekspresyonunun azalmasının ve ZP'de ince yapı düzeyinde anormalliklerin bulunmasının, sperm-oosit penetrasyonunda bozukluklara ve gelişen embriyonun implantasyonunda başarısızlıklara sebep olarak subfertilite ya da infertiliteye yol açabileceği düşünülmüştür. Ayrıca fertillizasyon ve implantasyon süresince tüm ZP glikoproteinleri ile ilgili daha fazla çalışmalar yapılarak PKOS patogenezindeki mekanizmaların ZP'yi ne düzeyde etkilediği araştırılmalıdır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda deneysel PKOS oluşturulmuş sıçan modelinde yapılan immün boyama sonucunda, overde ZP2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre azalmış olduğu bulunmuştur. PKOS'ta otokrin-parakrin faktörlerin değişimi nedeni ile oositi çevreleyen ZP tabakasında bulunan ZP2 glikoproteininin miktarının etkilenmiş olduğu sonucuna varılmıştır. ZP glikoproteinlerinin proteinin miktarlarının belirlenmesi için western blot ya da ELİSA analizleri yapılmalıdır.
2. Yapılan elektron mikroskopik incelemeler sonucunda, PKOS'ta follikülogenezisin erken evrelerinden itibaren oositi çevreleyen zona yapısında anormallikler olduğu saptanmıştır. PKOS'ta bozulan ovaryan mikro çevrenin, follikülogenezisin primer follikül aşamasından itibaren ZP yapısını değiştirdiği saptanmıştır.
3. Çalışmamızda granüloza hücrelerinin bazal laminalarında düzensizlik ve kalınlaşma görülmüştür. PKOS'ta granüloza hücrelerinde aşırı çoğalma görülmektedir ve bu durumun bazal laminada anormalliklere sebep olduğu düşünülmektedir.
4. PKOS'ta tüm folliküler evrelerde oosit sitoplazmasında bulunan mitokondrilerde krista kaybı ve anormal membran yapısının kontrol grubuna göre artmış olduğu saptandı. PKOS'ta değişen hormon dengesinin oosit metabolizmasını etkilediği ve bu durumda mitokondrilerde anormalliklere sebep olduğu düşünülmektedir. PKOS'ta oosit sitoplazmasında mitokondriyal skorlama yapılarak bu durumun daha kapsamlı araştırılması yapılmalıdır.
5. PKOS'ta ZP tabakasında granüloza ve oosit sitoplazmik uzantılarında gözlenen azalmanın, follikülogenezisin erken aşamalarında oosit ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimin bozulması nedeni ile olumsuz yönde etkilendiği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Qiao J, Feng HL.** Extra and intra ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Human Reproduction*, **2011**; 17(1):17-33.
2. **Wang F, Yu B, Yang W, Liu J, Lu Jand, Xia X.** Polycystic ovary syndrome resembling histopathological alterations in ovaries from prenatal androgenized female rats. *Journal of Ovarian Research*, **2012**; 515
3. **Stubbs SA, Stark J, Dilworth SM, Franks S, Hardy K.** Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2007**; 92(11):4418-4426.
4. **Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E.** A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, **2007**; 148(8):3781-3791.
5. **Sander VA, Hapon MB, Sícaro L, Lombardi EP, Jahn GA, Motta AB.** Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2011**; 58-64.
6. **Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF.** Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2006**; 92(2):705-713.
7. **Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH.** Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv*, **2008**; 63(1):39-48.
8. **Franks S, Stark J, Hardy K.** Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, **2008**; 14(4): 367-378.
9. **Izquierdo-Rico MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C, Ballesta J, Avilés M.** Biosynthesis of hamster zona pellucida is restricted to the oocyte. *Theriogenology*, **2011**; 463-472.
10. **Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S.** Three- dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microscopy Research and Technique*, **2006**; 69:415-426.
11. **Margalit M, Paz G, Yavetz H, Yogev L, Amit A, Hevlin-Schwartz T, Gupta SK, Kleiman SE.** Genetic and physiological study of morphologically abnormal human zona pellucida. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2012**.
12. **Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M.** Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Human Reproduction*, **2008**; 23(2):394-402.

13. **Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, Carmina E, Chang J, Yildiz BO, Laven JSE, Boivin J, Petraglia F, Wijeyeratne CN, Norman RJ, Dunaif A, Franks S, Wild RA, Dumesic D, Barnhart K.** Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertility and Sterility*, **2012**; 97(1):0015-0282.
14. **Wood JR, Dumesic DA, Abbott, Strauss JF.** Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2007**; 92(2):705–713
15. **Jie Q, Huai LF.** Extra and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Human Reproduction*, **2011**; 17(1):17–33.
16. **Sandera VA, Haponb MB, Sícároc L, Lombardic, Jahnb GA, Mottaab AB.** Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Argentina Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2011**; 124 :58–64.
17. **Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH.** Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv*, **2008**; 63(1):39–48.
18. **Franks S, Stark J, Hardy K.** Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, **2008**; 14(4):367–378.
19. **Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ.** Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of reproduction*, **2012**; 86(5):149.
20. **Moore KL, Persaud TVN.** *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2009**; 15-39.
21. **Jonard S, Robert Y, Rudelli CC, Pigny P, Decanter C, Dewailly D.** Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Human Reproduction*, **2003**; 18(3):598-603.
22. **Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE.** Roles for Transforming Growth Factor Beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med*, **2009**; 27(1):14–23.
23. Internal Female Reproductive Structures [Ch Part A: Female Bodies]. Erişim: <http://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader>. Erişim tarihi: 12.12.2014.
24. **Sadler TW.** *Langman's Medical Embryology*. 7. Baskı, Ankara: Palme yayıncılık, **1996**; 1-12.
25. **Dumesic DA, Richards JS.** Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **2013**; 100 (1):23-38
26. **Carlson BM.** *Human Embryology and Developmental Biology*. 5. Edition, Philadelphia, Elsevier Inc., **2014**; 24-28.

27. **Hartshorne GM, Lyrakou S, Hamoda H, Oloto E, Ghafari F.** Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? *Molecular Human Reproduction*, **2009**; 15 (12):805–819.
28. **Bonnet A, Cabau C, Bouchez O, Sarry J, Marsaud N, Foissac S, Woloszyn F, Mulsant P, Mandon-Pepin B.** An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. *BMC Genomics*, **2013**; 14(904):1-19
29. **Uzumcu M, Zachow R.** Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reprod Toxicol*, **2007**; 23(3):337–352.
30. **Lei L, Jin S, Mayo KE, Woodruff TK.** The interactions between the stimulatory effect of follicle-stimulating hormone and the inhibitory effect of estrogen on mouse primordial folliculogenesis. *Biology of Reproduction*, **2010**; 82, 13–22.
31. **Larsen WJ.** *Human Embryology*. 2nd. Ed., New York: Churchill Livingstone Inc. **1997**: 1-21.
32. **Gleicher N, Weghofer A, Barad DH.** The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment? *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2011**; 9:116.
33. **Sinowatz F, Pfer-petersen T, Lle SK, Palma G.** Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histo. Embryol*, **2001**; 30, 257-263.
34. **Izquierdo-Ricoa MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C, Ballesta J, Avilésa M.** Biosynthesis of hamster zona pellucida is restricted to the oocyte. *Theriogenology*, **2011**; 463–472.
35. **Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M.** Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Human Reproduction*, **2008**; 23(2):394–402.
36. **Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N.** Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res*, **2012**; 349:665–678.
37. **Rankin T, Soyol S, Dean J.** The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2000**; 163 21–25.
38. **Gupta SK, Bansal P, Ganguly A, Bhandari B, Chakrabarti K.** Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology*, **2009**; 83():50–55.
39. **Peokkylea RM, Lakkakorpi JT, Nuojua-Huttunen SH.** Sequence variations in human ZP genes as potential modifiers of zona pellucida architecture. *Fertility and Sterility*, **2011**; 95(8):2669-2672.

40. **Avella MA, Xiong B, Dean J.** The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Molecular Human Reproduction*, **2013**; :1-11.
41. **Yauger B, Boggs NA, Dean J.** Human ZP4 is not sufficient for taxon-specific sperm recognition of the zona pellucida in transgenic mice. *Reproduction*, **2011**; 141(3): 313–319.
42. **Baibakov B, Boggs NA, Yauger B, Baibakov G, Dean J.** Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *J Cell Biol*, **2012**; 197(7):897–905.
43. **Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jiménez-Movilla M, Dean J.** Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol*, **2012**; 197(1):37–44.
44. **Mannerås L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E.** A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *The Endocrine Society*, **2007**; 148(8):3781–3791.
45. **Walters KA, McTavish KJ, Handelsman DJ.** Subfertile female androgen receptor knockout mice exhibit defects in neuroendocrine signaling, intraovarian function, and uterine development but not uterine function. *Endocrinology*, **2009**; 150(7): 3274-3282.
46. **Wang F, Yu B, Yang W, Liu J, Lu J, Xia X.** Polycystic ovary syndrome resembling histopathological alterations in ovaries from prenatal androgenized female rats. *Journal of Ovarian Research*, **2012**; 7(4):219-231.
47. **Christensen SB, Black MH, Smith N, Martinez MM, Jacobsen SJ, Porter AH, Koebnick C.** Prevalence of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Fertility and Sterility*, **2013**; 100(2):470-477.
48. **Schmidt J, Weijdegard B, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Nilsson L, Brannstrom M.** Differential expression of inflammation related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Molecular Human Reproduction*, **2014**; 20(1):49–58.
49. **McNeilly AS, Duncan WC.** Rodent models of polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2012**; 1-6.
50. **Demir R.** *Histolojik Boyama Teknikleri*. 1. Baskı, Ankara: Palme yayıncılık, **2001**: 296-298.
51. **Hayat MA.** *Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications*. 4th Ed., Cambridge University, **2000**; 85-130
52. **Muarya VK, Sangappa C, Kumar V, Mahfooz S, Singh A, Rajender S, Jha RK.** Expression and activity of Rac1 is negatively affected in the dehydroepiandrosterone induced polycystic ovary of mouse. *Journal of Ovarian Research*, **2014**; 7:32
53. **Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Jurrien D.** Defective zonae pellucidae in ZP2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, **2001**; 128:1119–1126.

54. **Shahedi A, Khalili MA, Soleimani M, Morshedizad S.** Ultrastructure of in vitro matured human oocytes. *Iran Red Cres Med J*, **2013**; 15(12):1-5.
55. **Shi W, Xu B, Wu LM, Ren-Tao J, Hong-Bing L, Li-Hua L, Zhu Q, Johansson L, Yu-Sheng L, Xian-Hong T.** Oocytes with a dark zona pellucida demonstrate lower fertilization, implantation and clinical pregnancy rates in IVF/ICSI Cycles. *Plos One*, **2014**; 9(2):1-7.
56. **Irving-Rodgers HF, Morris S, Collett RA, Peura TT, Davy M, Thompson JG, Mason HD, Rodgers RJ.** Phenotypes of the ovarian follicularbasal lamina predict developmental competence of oocytes. *Human Reproduction*, **2009**;24(4): 936–944.
57. **Irving-Rodgers HF, Mussard ML, Kinder JE, Rodgers RJ.** Composition and morphology of the follicular basal laminaduring atresia of bovine antral follicles. *Reproduction*, **2002**; 123: 97–106.
58. **Stubbs SA, Stark J, Dilworth SM, Franks S, Hardy K.** Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2007**; 92(11):4418–4426.
59. **Blerkom JV.** Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation anddevelopmental competence. *Reproduction*, **2004**; 128:269–280.



## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Mersin'de doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Mersin'de tamamladım. 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım ve 2004 yılında mezun oldum. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2015 yılı Şubat ayında Mersin Üniversitesi Sağlık ve Araştırma Hastanesinde Biyolog olarak göreve başlamış bulunmaktayım.