

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

**POLİKİSTİK OVER SENDROMU OLUŞTURULMUŞ FARE OVER  
DOKUSUNDA, GDF-9 VE BMP-15 EKSPRESYONLARININ VE İNCE  
YAPI DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Meryem İlkay KOÇ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ**

**MERSİN – 2012**

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

**POLİKİSTİK OVER SENDROMU OLUŞTURULMUŞ FARE OVER  
DOKUSUNDA, GDF-9 VE BMP-15 EKSPRESYONLARININ VE İNCE  
YAPI DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Meryem İlkay KOÇ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ

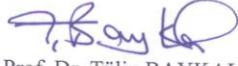
Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP- SBE THEB  
(MİK) 2012-4 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:237  
MERSİN – 2012

**Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Fare Over Dokusunda, GDF-9 ve BMP-15 Ekspresyonlarının ve İnce Yapı Değişikliklerinin İncelenmesi" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 26/12/2012



Prof. Dr. Tülin BAYKAL

Mersin Üniversitesi

Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ebru BALLI

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 27.12.2012 tarih ve 2012/410 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ülke ÇÖMELEKOĞLU



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni pek çok konuda aydınlatan, her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm bana sabırla yol gösteren başta tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tülin BAYKAL'a, Prof Dr. Banu CoŐkun YILMAZ'a, Doç. Dr. Ő. Necat YILMAZ'a ve Doç. Dr. Ebru BALLI'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızda görev yapan çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde her zaman bana destek olan aileme çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET .....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Polikistik Over Sendromu .....	3
2.2. Normal Oogenezis .....	4
2.2.1. Primordiyal Germ Hücreleri .....	5
2.2.2. Primordiyal Foliküllerin Primer Foliküllere Dönüşümü.....	6
2.2.3. Preantral-Antral Folikül Gelişimi.....	7
2.2.4. Dominant Folikül Seçimi.....	9
2.2.5 Oosit Maturasyonu .....	10
2.3. Ovaryan Folikül Gelişimi Kontrolünde TGF- $\beta$ Süperalesinin Lokal Rolü. 10	

2.3.1. Oosit Kaynaklı TGF- $\beta$ Süperailisi Üyeleri.....	12
2.3.1.1. Folikülogenezin Düzenlenmesinde GDF-9'un Biyolojik Fonksiyonları .	13
2.3.1.2. Folikülogenezin Düzenlenmesinde BMP-15'in Biyolojik Fonksiyonları	14
2.4. PKOS'da Folikülogenez .....	15
2.4.1. PKOS'da Erken Foliküler Gelişim PKOS'da Folikülogenez .....	16
2.4.2. PKOS'da Antral Folikül Gelişimi .....	17
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı .....	19
3.2. Çalışma Grupları .....	19
3.3. Overlerin Elde Edilmesi ve Fiksasyon .....	19
3.4. Işık mikroskopik Doku Takip İşlemi .....	20
3.5. İmmünofloresan İşaretleme Protokolü .....	20
3.6. İmmünofloresan İşaretlemenin Kantitatif Değerlendirilmesi .....	22
3.7. Elektron Mikroskopik Doku Takibi Protokolü .....	23
3.8. Elektron Mikroskopik Değerlendirme.....	24
3.9. İstatistiksel Analiz.....	24
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>25</b>
4.1. Vajinal Smear Bulguları .....	25
4.2. Stereo Mikroskopik Bulgular .....	26
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular.....	27
4.4. İmmünofloresan Bulgular .....	28
4.4.1. GDF-9.....	29
4.4.2. BMP-15 .....	34
4.5. Elektron Mikroskopik Bulgular .....	38
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>44</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>49</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>51</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>59</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Ovaryumun şematik yapısı.....	4
<b>Şekil 2.2.</b>	Primordiyal-primer folikül geçişi ile ilgili uyarıcı ve baskılayıcı büyüme faktörleri.....	6
<b>Şekil 2.3.</b>	Preantral-antral folikül aşamasında etkili büyüme faktörleri.....	8
<b>Şekil 2.4.</b>	TGF- $\beta$ süperailesi üyelerinin teka-granüloza hücreleri ve granüloza hücreleri-oosit arasında karşılıklı etkileşimleri.....	11
<b>Şekil 3.1.</b>	ImageJ görüntü analiz programı ile folikülde GDF-9 ve BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğunun ölçülmesi.....	22
<b>Şekil 4.1.</b>	Östrus siklusu vajinal smear.....	26
<b>Şekil 4.2.</b>	Overin stereo mikroskopik görünümü.....	27
<b>Şekil 4.3.</b>	Işık mikroskopik over kesitleri.....	28
<b>Şekil 4.4.</b>	GDF-9 ve BMP-15 immünofloresan negatif kontrol kesitleri.....	29
<b>Şekil 4.5.</b>	GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu.....	31
<b>Şekil 4.6.</b>	Foliküler gelişim aşamalarında GDF-9 immünofloresan boyanma yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması.....	32
<b>Şekil 4.7.</b>	GDF-9 ve BMP-15'in immün işaretlenme yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması.....	33
<b>Şekil 4.8.</b>	GDF-9'un oosit sitoplazmasında ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme.....	33
<b>Şekil 4.9.</b>	BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu.....	36
<b>Şekil 4.10.</b>	Foliküler gelişim aşamalarında BMP-15 immünofloresan boyanma	

	yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması.....	37
<b>Şekil 4.11.</b>	BMP-15'un oosit sitoplazmasında ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenmesi.....	38
<b>Şekil 4.12.</b>	Primordiyal foliküllerde normal yapıda oosit ve pregranüloza hücreleri.....	39
<b>Şekil 4.13.</b>	Primer foliküllerde normal yapıda granüloza hücreleri.....	40
<b>Şekil 4.14.</b>	Multilaminar primer foliküllerde normal yapıda granüloza hücreleri ve onu çevreleyen teka hücreleri.....	40
<b>Şekil 4.15.</b>	Granüloza hücre bazal membranının elektron mikroskopik görünümü.....	41
<b>Şekil 4.16.</b>	Teka hücrelerinin elektron mikroskopik görünümü.....	42
<b>Şekil 4.17.</b>	ZP'de ve oosit ve granüloza hücre sitoplazmik uzantılarının elektron mikroskopik görünümü.....	42
<b>Şekil 4.18.</b>	Ovaryan stromal hücrelerin elektron mikroskopik görünümü.....	43
<b>Şekil 4.19.</b>	Preantral foliküllerin granüloza hücreleri ve foliküler kistik yapının elektron mikroskopik görünümü.....	43



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> Folikülün farklı gelişim aşamalarında GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu.....	32
<b>Çizelge 4.2.</b> Gruplarda GDF-9 ve BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu.....	35
<b>Çizelge 4.3.</b> Folikülün farklı gelişim aşamalarında BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu.....	35

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMH</b>	Anti-Müllerian Hormon
<b>BMP-2</b>	Kemik Morfogenetik Protein-2
<b>BMP-4</b>	Kemik Morfogenetik Protein-4
<b>BMP-6</b>	Kemik Morfogenetik Protein-6
<b>BMP-7</b>	Kemik Morfogenetik Protein-7
<b>BMP-8b</b>	Kemik Morfogenetik Protein-8b
<b>BMP-15</b>	Kemik Morfogenetik Protein-15
<b>COC</b>	Kumulus-Oosit Kompleksi
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktör
<b>FSH</b>	Folikül Uyarıcı Hormonun
<b>GDF-9</b>	Büyüme Farklılaşma Faktörü-9
<b>GV</b>	Germinal Vezikül
<b>KL</b>	KIT Ligand
<b>LH</b>	Luteinleştirici Hormon
<b>MI</b>	Metafaz I
<b>MII</b>	Metafaz II
<b>OMI</b>	Oosit Maturasyonunu Engelleyici Faktör
<b>PGH</b>	Primordiyal Germ Hücreleri
<b>PKOS</b>	Polikistik Over Sendromu
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
<b>ZP</b>	Zona Pellusida

## ÖZET

**Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Fare Over Dokusunda, Büyüme Farklılaşma Faktörü-9 (GDF-9) ve Kemik Morfogenik Protein-15'in (BMP-15) Ekspresyonlarının ve İnce Yapı Değişikliklerinin İncelenmesi**

Polikistik Over Sendromu (PKOS), %6-8 prevalansı ile reproduktif çağıdaki kadınlarda en sık gözlenen endokrinopatidir. Farklı büyüme faktörlerinin PKOS'da olası etki mekanizmaları açıklanmaya çalışılmış olmakla birlikte PKOS gelişiminde rol alan patolojik mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada, PKOS gelişiminde büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF-9) ve kemik morfogenik protein-15'in (BMP-15) etkinliği ve folikülogenezisde döneysel rolünün araştırılması planlandı.

Çalışmada 45 adet 23-25 günlük Balb/C dişi fare kullanıldı ve her grupta 15 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Grup I'deki hayvanlara deney süresince hiçbir işlem yapılmadı. Grup II'deki hayvanlara deney süresince 0.1 ml susam yağı subkutan (s.c.) enjekte edildi. Grup III'deki hayvanlara deneysel PKOS modeli oluşturmak için 20 gün boyunca, 0.1 ml susam yağı içinde çözdürülmüş dehidroepiandrosteron (DHEA, 6 mg/100g/gün) s.c. enjekte edildi. Bu süre sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Elde edilen over dokuları GDF-9 ve BMP-15 immünofloresan işaretlemeler ve elektron mikroskopik incelemeler için takip edildi.

Grup III'de GDF-9 ve BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğunun benzer olduğu ve primer folikülden sonraki aşamalarda diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı saptandı (sırasıyla  $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Grup III'de, diğer gruplara göre overde pre-antral ve antral folikül miktarının arttığı görüldü. Ayrıca bu grupta elektron mikroskopik olarak multilaminar primer ve sekonder foliküllerin bir kısmında; granüloza hücrelerinde apoptozisin arttığı, granüloza ve teka hücrelerinde artmış lipid vakuelleri, granüloza hücrelerinde bazal laminalarında kalınlaşma ve düzensizlik, oositi çevreleyen zona pellusida da yoğunlaşma gözlemlendi.

Sonuç olarak, PKOS'da folikülogenezin primer folikül aşamasından itibaren GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonlarının azalmasının, folikül gelişim bozukluğu ve zona pellusida yapısında değişikliğe neden olarak kadınlarda subfertilite veya infertiliteye yol açabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Polikistik over sendromu, folikülogenezis, büyüme farklılaşma faktörü-9, kemik morfogenetik protein-15

## ABSTRACT

### **Investigating of Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) and Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) Expressions and Fine Structure Changes in Mouse Ovarium Tissue with Polycystic Ovarian Syndrome**

Polycystic Ovarian Syndrome, (PCOS) is the most commonly observed endocrinopathy in women who are in reproductive period with 6-8% prevalence. Different growth factors' probable effect mechanisms in PCOS were attempted to be explained while pathological mechanisms having role in PCOS development could not be explained precisely. In the present study, it has been planned to search the efficiency of the growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in PCOS development and its periodical role in folliculogenesis.

In the current study 45, 23-25 days old Balb/C female mice were used and they were divided into 3 groups as 15 mice in each group. Group I was not subjected to any procedure throughout the experiment process. In group II, 0.1 ml sesame oil was injected to subcutaneous (s.c.). To form an experimental PCOS model, dehydroepiandrosterone dissolved in 0.1 ml sesame oil (DHEA, 6 mg/100g/day) was injected to s.c.. At the end of this process, all the animals were sacrificed. Obtained ovarium tissues were followed for GDF-9 and BMP-15 immunofluorescent labelling and electron microscopic examinations.

In group III, it was determined that intensity of GDF-9 and BMP-15 immune labelling was similar and in the stages after primary follicle significantly decreased compared to other groups (respectively  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ). In group III, it was observed that pre-antral and antral follicle amount increased when compared to the other groups. In addition, in this group, electron microscopically in some part of multinaminal primary and secondary follicles; increased apoptosis in granulosa cells, increased lipid vacuole in theca cells, thickness and irregularity in basal lamina in granulosa cells, intensity in zona pellusida surrounding oocyte was observed.

Consequently, it has been thought that in PCOS, decrease of GDF-9 and BMP-15 expressions as from the primary follicle stage, can cause subfertility or infertility in women by causing follicle development disorder and changes in zona pellusida structure.

**Key words:** Polycystic ovary syndrome, folliculogenesis, growth differentiation factor-9, bone morphogenetic protein-15

# 1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluk olup olguların %40-70'inde infertilite gözlenmektedir (1). PKOS'un fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, menstrual düzensizlikler, ovaryan hiperandrojenizm, hiperinsülinemi, insülin direnci ve intraovaryan otokrin ve parakrin sinyalizasyondaki değişikliklere bağlı olarak folikül gelişiminde duraksama gözlenmektedir (2). Foliküler duraksama nedeniyle over periferinde küçük antral foliküllerin birikimi eşlik etmektedir (3).

Üreme yaşamı boyunca kadınlar, puberte ile birlikte düzenli olarak üreme siklusuna girmektedir. Bu siklus overde folikül gelişimi, dominant folikülün seçilmesi, ovulasyon ve endometriyumun implantasyon için hazırlanması aşamalarını içerir. Ovuluar siklusların düzenli olabilmesi hipotalamus, hipofiz ve overden gelen uyarıcı ve baskılayıcı sinyallerin çok hassas bir şekilde etkileşimi ile sağlanır (4).

Overde folikül büyümesinin erken evreleri, gonadotropinlerden bağımsız olarak lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin etkisi ile otokrin-parakrin etkileşimlerle sağlanmaktadır (5). Dinlenme fazında bekleyen primordiyal foliküller büyümenin başlaması ile primer folikül aşamasına girerler. Gelişimleri süresince preantral ve antral aşamaya ulaşırlar. Antral folikül grubu büyüklüğünü artırır ve gonadotropinlerin etkisi ile dominant folikül seçimi ve ovulasyon gerçekleşir (6).

Primordiyal folikülden antral folikül gelişimi sürecinin, overde farklı kompartmanlardan kaynaklanan (oosit, granüloza ve teka hücreleri, stromal hücreler) sinyallerin otokrin-parakrin etkileşimleri ile gerçekleştiği bilinmektedir (7, 8). Bu süreçte dönüştürücü büyüme faktörü beta (transforming growth factor-beta; TGF- $\beta$ ) ailesinin bazı üyeleri; kemik morfogenetik protein-4 (bone morfogenetik protein-4; BMP-4), kemik morfogenetik protein-7 (bone morfogenetik protein-7; BMP-7), kemik morfogenetik protein-6 (bone morfogenetik protein-6; BMP-6), kemik morfogenetik protein-15 (bone morfogenetik protein-15; BMP-15) ve büyüme farklılaşma faktörü-9 (growth differentiation factor-9; GDF-9) rol oynamaktadır (9).

TGF- $\beta$  ailesinin üyelerinden granüloza hücrelerinden salınan aktivinler, oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15 preantral ve antral folikül gelişiminde önemli rol

oyunmaktadır (10, 11). GDF-9 ve BMP-15 otokrin-parakrin etki ile oosit maturasyonunu etkilemekte, oosit ve çevresindeki somatik hücreler arasında moleküler etkileşimi düzenlemektedir. Ayrıca granüloza hücre çoğalması, kumulus genişlemesi, luteinizasyon ve apoptozunda rol almaktadır (12, 13). Yapılan çalışmalarda GDF-9 ve BMP-15'in folikül gelişiminde ve oosit maturasyonunda etkili olduğu ayrıca dominant folikül seçiminde rol aldığı gösterilmiştir (14).

PKOS'da anormal folikülogenez sürecinde ve büyüyen folikül duraksamasında oositte sekrete edilen bazı faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmüştür. PKOS'lu hastalardan elde edilen Metafaz I (MI) ve Metafaz II (MII) aşamasındaki oositlerle yapılan bir çalışmada GDF-9 ve BMP-15 mRNA düzeylerinin MI aşamasında azaldığı MII aşamasında ise önemli derecede arttığı gösterilmiştir (15). Bu çalışmayla uyumlu olarak başka bir çalışmada PKOS'lu hastalardan toplanan oositlerde GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonunda in vitro olarak önemli bir fark saptanmazken, kumulus granüloza hücrelerinde ise GDF-9 ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (16). PKOS'lu kadınlarda BMP-15 gen mutasyonlarının PKOS fenotipinin oluşmasına katkıda bulunduğu öne sürülmekle birlikte GDF-9 ve BMP-15'in foliküler gelişim PKOS patogenezindeki rolü henüz açıklanamamıştır (17). Literatürde PKOS'da GDF-9 ve BMP-15'in folikülogenez sürecinde hangi aşamalarda etkili olduğunu, folikülogenez sürecinde olası ince yapı değişikliklerini gösteren in vivo çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda PKOS'da GDF-9 ve BMP-15'in folikülogenezin hangi aşamalarında etkili olduğunu, ayrıca oositte ve granüloza hücrelerinde farklı gelişimsel aşamalarda olası ince yapı değişikliklerini göstermeyi planladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Polikistik Over Sendromu

PKOS, merkezi sinir sistemi, hipofiz, overler, adrenal glandlar ve ekstrasglanduler dokular arasındaki etkileşimlerin bozulması sonucu; üreme çağıının herhangi bir döneminde ortaya çıkan kronik seyreden, yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilen kompleks bir hastalıktır. Sendromun prevalansı yaklaşık %6-8 olarak bildirilmektedir (18). İlk olarak 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael L. Leventhal tarafından amenore, hirsutizm, anovulasyon ve büyük polikistik overlerle karakteristik semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (1). Tanı kriterleri konusunda günümüzde tam bir fikir birliği sağlanamamıştır. Ancak yeni tanımlamaya göre; oligo-anovulasyon, klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları, ultrasonografide polikistik overlerin gözlenmesi kriterlerinden ikisinin varlığı ile PKOS tanısı konulabilmektedir (19).

PKOS genellikle peripubertal dönemden itibaren başlamakta, gonadotropin dinamiğinde değişiklikler, steroidogenez defektleri, insulin salınımı ve genetik faktörlere bağlı olarak menstrual siklus düzensizliği (anovulasyon, oligo-amenore, disfonksiyonel uterus kanaması), hiperandrojenizm bulguları (hirsutizm, akne, ciltte yağlanma) ve infertilite ile karşımıza çıkmaktadır. PKOS'lu hastalarda menstrual düzensizlikler sıklıkla gözlenmekle birlikte, hastaların %20'sinde menstrual siklusun düzenli olabileceği de bildirilmiştir (2).

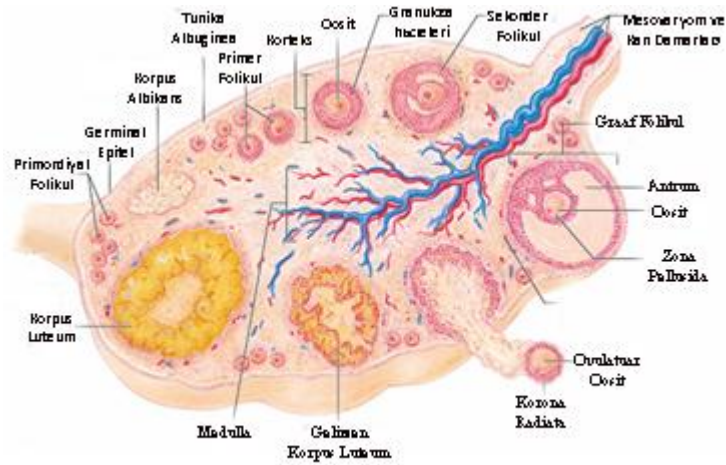
PKOS'lu kadınlar tipik olarak artmış oosit sayısı ile karakterize olmasına rağmen oositler genellikle düşük kalitelidir, bu da fertilizasyon, bölünme, implantasyon oranının düşük olmasına ve düşük yapma riskinin de yüksek olmasına neden olur (20).

PKOS'lu hastalarda, serum folikül uyarıcı hormon (follicle stimulating hormone; FSH) düzeyi normal siklusun erken foliküler dönemindekinden daha düşük olmasına rağmen yeni folikül gelişimi sürekli olarak uyarılmaktadır. Ancak FSH düşüklüğüne bağlı olarak, foliküllerde maturasyonun tamamlanamadığı ve gelişen foliküllerin ise ovulasyon aşamasına ilerleyemediği gösterilmiştir (18). Foliküller 2-8 mm çapında küçük foliküler kistler şeklinde kalıp birkaç ay devamlılık gösterirler. Bir kısım

foliküller duraksamaya girerken, başka bir folikül grubu aynı gelişim paternine girer (21, 22). Polikistik overlerde primer ve sekonder foliküllerin sayısının önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Oluşan bu foliküllerin atretik olmayıp, gelişimlerinin duraksadığı bildirilmiştir. Ayrıca foliküllerin gonadotropik uyarıma cevap verdiği ve steroid sentezinde aktif olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bu bilgiler ışığında oluşan foliküllerin atreziden hangi mekanizmalarla kurtulduğu ve yetersiz dominant folikül gelişiminin nedeni henüz açıklanamamıştır (23).

## 2.2. Normal Oogenezis

Gametogenez, özelleşmiş üreme hücreleri olan gametlerin oluşum ve gelişme sürecidir. Oogenezis; primordiyal germ hücrelerinin matür oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen olaylar dizisidir. Oogenezis prenatal maturasyon ve postnatal maturasyon olmak üzere iki evrede incelenir. Hücrelerdeki bu maturasyon süreci doğumdan önce başlar, puberte sonrasında tamamlanır (24). Pubertede gonadotropinlerin etkisi ile primordiyal foliküller primer foliküllere dönüşerek büyümeye başlarlar. Antral aşamaya ulaşan foliküllerden sadece bir tanesi matür foliküle dönüşür ve bu matür folikül içindeki oosit ovulasyon ile over yüzeyinden atılır (4) (Şekil 2.1). Bu süreçte gözlenen oosit maturasyonu ve granüloza hücre çoğalması oosit, granüloza hücreleri ve ovaryan stromal hücreler arasında meydana gelen sinyal geçişleri ile koordine edilir (5, 24).



Şekil 2.1. Ovaryumun şematik yapısı (25).



### 2.2.1. Primordiyal Germ Hücreleri (PGH)

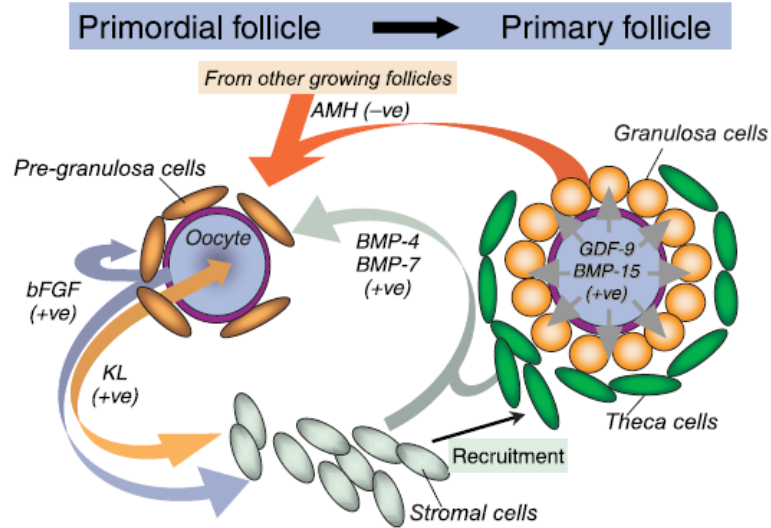
PGH ilk olarak insanda 3.-4. gebelik haftaları arasında allantois yakınlarında vitellus kesesinin dorsal duvarının endoderminde 100 kadar hücre olarak ortaya çıkarlar. PGH ekstraembriyonik ektoderme komşu proksimal epiblasttan ekstraembriyonik ektodermal hücrelerinden sentezlenen BMP-4 ve kemik morfogenetik protein-8b (bone morfogenetik protein-8b; BMP-8b) ve ekstraembriyonik endodermal hücrelerden sentezlenen kemik morfogenetik protein-2 (bone morfogenetik protein-2; BMP-2) sinyali ile gelişmektedir. BMP-4'e yanıt olarak epiblast anahtar transkripsiyonel düzenleyicileri harekete geçirmekte ve germ hücre özellikleri kazanmaktadır (6, 8, 26). Bunlar 15-20 µm çapında, eksantrik yerleşimli nükleusa sahip yuvarlak şekilli hücreler olup sitoplazmalarında az miktarda organel içerirler (26).

Embriyonun katlanması sırasında vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olurken PGH, ameboid hareketlerle gelişmekte olan arka bağırsağın dorsal mezenteriy boyunca göç ederek ürogenital kabartıda gonadları oluşturacak bölgeye yerleşir. Elektron mikroskopik incelemelerde, fuziform ve irregüler bir şekil aldığı, psödopodları oluşturan sitoplazmik uzantılar içerdiği görülür. 7. haftaya kadar gonadın germ hücreleri ile kolonizasyonu tamamlanırken, gonadların oluşacağı bölgelere göç edemeyen PGH ise dejenere olurlar (8, 26).

PGH gelişmekte olan gonadlara yerleştiğinde oogoniumlara farklılaşırlar, daha sonra mitoz bölünme ile hızla çoğalarak sayılarını artırırlar (24). Hücreler pre-mayotik DNA sentezinin başlaması ile oogonial evrelerini tamamlarlar ve oosit evresine girerler. Oluşan oositler primer oosit olarak adlandırılır. Bu aşamada yassı epitel hücreleri oogoniumların çevresini tek tabaka halinde çevreleyerek primordiyal folikülleri oluşturur. Folikül oluşumunun temel amacı primer oositin atreziden korunmasıdır. Primer oositlerin ileri gelişimi folikül hücrelerince salgılanan oosit maturasyonunu engelleyici faktör (oocyte maturation inhibitor; OMI) aracılığı ile puberteye kadar engellenir. Böylece primer oositler I. mayozun profazında (diploten evresinde, 30-60 µm) bölünmelerini duraksatır (8).

### 2.2.2. Primordiyal Foliküllerin Primer Foliküllere Dönüşümü

Primordiyal foliküller, büyümenin başlaması ile dinlenme fazından primer aşamaya geçmektedir. Primordiyal folikülden primer folikül gelişiminin granüloza, teka intersitisyel hücreler ve stroma kaynaklı sinyallerin otokrin-parakrin etkileşimleri ile gerçekleştiği bilinmektedir. Bu geçişin primordiyal foliküllerde FSH reseptör mRNA ekspresyonunun eksikliğinden dolayı gonadotropinlerden bağımsız olduğu gösterilmiştir (6). Primordiyal folikülün primer foliküle dönüşümü süresince, primordiyal foliküllerin yassı pre-granüloza hücreleri küboidal hale dönüşmekte, folikülün çapı artmaktadır (8, 27). Bu aktivasyonda ovaryan stromal hücreler ve oosit tarafından eksprese edilen TGF- $\beta$  süperailisinin belirli üyeleri rol oynar (6, 9). Bunlardan ovaryan stromal hücrelerinden ve teka hücrelerinden eksprese edilen BMP-4 ve BMP-7, oosit kaynaklı olan GDF-9, primordiyal-primer folikül geçişinin pozitif düzenleyicileri olarak görev alırlar (9). Bu faktörlerin etkilerine zıt olarak büyümekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinden eksprese edilen anti-müllerian hormon (anti-müllerian hormone; AMH) ise primordiyal folikül- primer folikül geçişinin negatif düzenleyicisi olarak etkili olmaktadır (8, 9, 28) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Primordiyal-primer folikül geçişi ile ilgili uyarıcı ve baskılayıcı büyüme faktörleri (9).

Primer folikülden preantral folikül gelişimi; oosit çapında artma, zona pellusidanın (ZP) oluşumu, teka hücrelerinin yoğunlaşması ve granüloza hücrelerini teka tabakasından ayıracak olan bazal laminanın oluşumunu içerir (6, 29, 30 ). Oosit, folikül gelişimi sırasında kendi çevresinde, glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin bir membran olan ZP'yi oluşturur. Oosit çevresindeki granüloza hücreleri multilaminar primer folikülü oluşturmak üzere çoğalır. Daha sonra granüloza hücreleri çevresinde bulunan ovaryan stroma hücreleri de teka hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşırlar (31, 32). Granüloza hücrelerine yakın yerleşimli olan stromal hücreler, teka interna (iç tabaka) tabakasını oluşturur. Bu tabaka damardan zengin olup, steroid üreten kübik şekilli hücrelere sahiptir. Luteinleştirici hormon (luteinizing hormone; LH) reseptörü taşıyan bu hücreler östrojen öncülü androjenleri salgırlarlar. Teka eksterna (dış tabaka) tabakası ise teka interna tabakasını çevreler (30, 31). Bu tabaka konsantrik dizilimli kollajen demetler ve düz kaslar içermesi nedeniyle daha çok bir kapsül görevi görür. Folikül büyüdükçe korteksin daha derin kısımlarına doğru hareket eder (32).

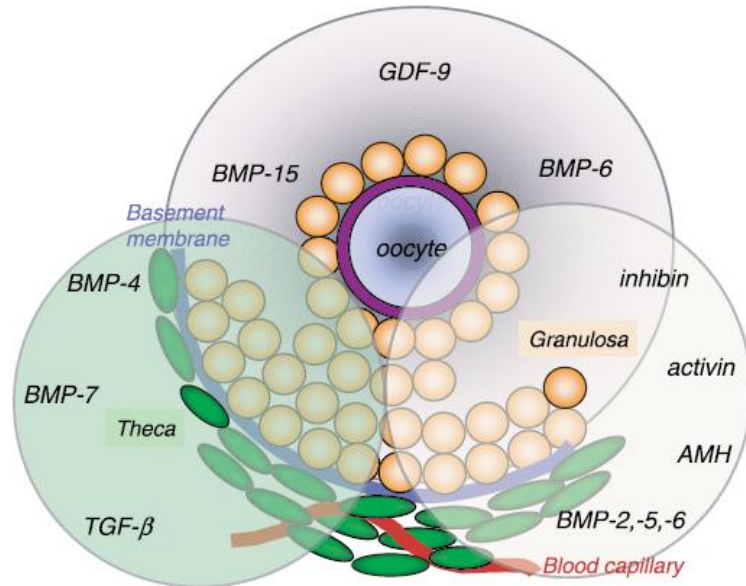
### **2.2.3. Preantral-Antral Folikül Gelişimi**

Primer aşamada 40-60 µm olan folikül çapı preantral aşamada 120-150 µm'e çıkmaktadır. Bu büyüme oosit genomunun reaktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Antral aşamaya ulaşan foliküllerde granüloza hücre tabakaları arasında sıvı dolu boşluklar oluşup birleşerek antral boşluğu (antrum) oluşturur (9). Antrum sıvısı hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir. Antrum oluşumuyla folikül "Sekonder (antral) folikül" adını alır (33). Bu aşamada oositler matür boyutlarına (~120µm) ulaşır ve büyümeleri durur. Ancak granüloza hücreleri çoğalmaya devam eder. Ekzantrik yerleşim gösteren oosit çevresinde ise granüloza hücreleri daha yoğun bir şekilde birikerek bir tepelik oluşturur. Foliküler boşluk içinde oosit bir miktar hücre ile bulunur. Oositi çevreleyen hücreler kumulus ooforus adını alır. Ovulasyondan sonra oosit, çevresindeki korona radiata tabakası ile birlikte kumulus-oosit kompleksi (cumulus oosit complex; COC) şeklinde atılır (32).

Folikülün büyümeye devam etmesi ile antral aşamada foliküller 200 µm çapa ulaşır. Bu aşamaya kadar folikül gelişimi gonadotropinlerden bağımsız olarak

gerçekleşmektedir. Preantral folikül gelişiminde lokal TGF- $\beta$  süperailisi üyelerinin, pozitif düzenleyici olarak rol aldığı gösterilmiştir. Bu faktörlerden oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15 granuloza hücrelerinden eksprese edilen aktivinler, teka hücrelerinden eksprese edilen BMP-4 ve BMP-7 preantral folikül ve antral folikül aşamalarında etkilidir (6, 8, 14).

Preantral folikülden antral foliküle geçişte teka hücre tabakaları daha belirgin hale gelir. Teka hücreleri overde ana androjen kaynağı olarak granuloza hücrelerine östrojen sentezi için prekürsörler sağlar. Teka interna hücrelerinin içinde lipit damlacıkları birikerek bu hücelere tipik steroid sentezleyen hücre görünümünü kazandırır. İnsanlarda LH, teka interna hücrelerinde androjen sentezini tetikler. Östrojen öncülleri olarak görev alan androjenler buradan granuloza hücrelerinin düz endoplazmik retikulumlarına göç eder, FSH'nin etkisiyle östrojene dönüştürülürler. FSH ve östrojen, FSH reseptörlerinin hızlı olarak çoğalmasını uyarmaktadır. Artan östrojen seviyeleri ile granuloza hücrelerinin çoğalması ve folikül genişlemesi sağlanmaktadır (24, 34). Preantral ve antral foliküllerin hızlı büyümeleri sırasında; BMP-4 ve BMP-7 FSH sinyal yolağını modifiye ederek, granuloza hücrelerinden östrojen sentezini uyarmakta, progesteron sentezini de baskılamaktadır. Böylece luteinizasyonu baskılama görevini yürütürler (35, 36) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Preantral-antral folikül aşamasında etkili büyüme faktörleri (9).

#### 2.2.4. Dominant Folikül Seçimi

Folikül gelişimi, gonadotropinlerin pozitif düzenleyici etkisiyle sağlanmaktadır. Erken antral aşamadaki foliküller FSH etkisiyle antral aşamaya geçerler. Bu dönemde antral boşlukta büyüme, oosit çapında artma, granüloza ve teka hücrelerinde çoğalma ve teka hücrelerinde vaskülarizasyonun artışı belirgindir. FSH bu dönemde folikül büyümesinin kritik bir belirleyicisi olmaktadır. Seçilen folikül grubu büyümeye devam ederken, gonadotropinlere karşı yanıtlarının ve steroidogenetik aktivitelerinin düzenlenmesi olası bir prematür luteinizasyonun baskılanması yönünden de kritik önem taşımaktadır (11, 37). Ortamda bulunan GDF-9 ve BMP-15 gibi oosit kaynaklı faktörler, gonadotropin etkisi ile aktive olan progesteron sentezini baskılayarak prematür luteinizasyonu baskılamaktadır (38, 39).

Preantral ve antral folikül büyümesi FSH ve LH reseptör ekspresyonunu ve FSH ile baskılanan aromataz aktivitesinin arttırılması ile karakterizedir. Özellikle büyüyen preantral ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinden eksprese edilen aktivin-A, TGF- $\beta$  ve BMP-6, teka hücrelerinden eksprese edilen, BMP-4 ve BMP-7, küçük foliküller için androjen desteğinin azalmasına ve büyümelerinde yavaşlamasına neden olur (38). Foliküler büyüme ile granüloza hücrelerinden daha fazla inhibin A ve follistatin salınarak aktivin dominant ortamdan inhibin dominant ortama bir geçiş olmaktadır. İnhibinin artması ile FSH düzeyi düşmekte, LH ile baskılanan androjen sentezi artmakta ve böylece preovulatar dönemde ihtiyaç duyulan estradiol yüksekliği sağlanmaktadır. Bu sayede erken folikül büyümesi aşamasında, aktivin A, TGF- $\beta$  ve GDF-9 gibi faktörlerin etkisi ile daha fazla FSH ve LH reseptörü ekspresyonu ve aromataz aktivitesi gösteren foliküller, ileri büyüme aşamasında daha az androjeni etkili kullanılabilir hale gelir ve dominant folikül olarak seçilebilmesi sağlanır (8, 40).

Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce LH salınımı tetiklenir. LH artışı oositte durağan olan mayoz bölünmenin yeniden başlamasını, granüloza hücrelerinin luteinizasyonunu, oosit ile çevresindeki kumulus tabakasının serbestleşmesini sağlamaktadır. Kandaki LH hormonu seviyesinde meydana gelen aşırı yükselme (pik) sonucu granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri down-regüle olarak östrojen üretimini azaltırlar. LH pikinden 12-24 saat kadar sonra mayoz bölünmenin başlaması ile oosit I. mayoz bölünmesini tamamlayarak ilk kutup cisimciğini atar ve ovulasyon gerçekleşir (32, 34).

### **2.2.5. Oosit Maturasyonu**

Maturasyon, oogenezin büyüme ve gelişimi izleyen üçüncü evresidir. Oositte çeşitli sitoplazmik özelliklerin değişmesi ile oositin ovulasyon ve fertilizasyona hazırlanmasıyla karakterizedir. Oosit maturasyonu çekirdek ve sitoplazmada meydana gelen süreçlere bağlı olarak nükleer ve sitoplazmik maturasyon olarak ikiye ayrılır (37).

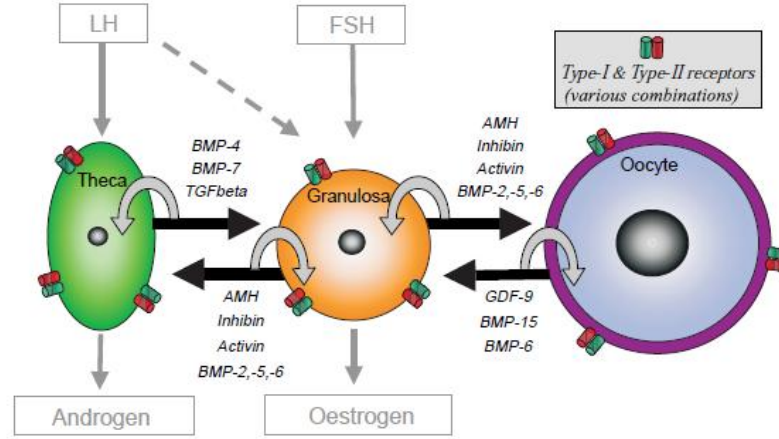
Nükleer maturasyonun başlaması için LH tetikleyici bir role sahiptir, ancak maturasyonun devamı için başta östrojen olmak üzere steroidler de gereklidir (41). I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında, bekleme halinde iken çekirdek germinal vezikül (GV) evresindedir. Nükleer maturasyon, oosit çekirdeğinin GV'den MII aşamasına geçişi olarak tanımlanabilir. Maturasyon sürecinde ilk belirti GV membranının yıkılması ve çekirdek içeriğiyle sitoplazmanın karışmasıdır. Bunu takiben kromozom yoğunlaşması, iğ iplikçikleri oluşumu, homolog kromozomların metafaz plağı üzerinde yerleşmesi gerçekleşmektedir (42, 43).

Sitoplazmik maturasyon, nükleer maturasyon gerçekleşirken sitoplazmada meydana gelen ince yapı düzeyindeki değişiklikleri tanımlar. Sitoplazmik maturasyon dolaylı olarak oositin matür haldeyken normal fertilizasyon, bölünme ve blastosist gelişimini gerçekleştirebilmesini sağlar (43). Birinci polar cismin oluşmasıyla birlikte perivitellin boşluk genişler ve şekillenir. Mitokondriyonların sayısı artar ve yapısal değişimleri oluşur (42).

### **2.3. Ovaryan Folikül Gelişimi Kontrolünde TGF- $\beta$ Süperailisinin Lokal Rolü**

Oogenezis birçok intraovaryan ve ekstraovaryan faktör tarafından düzenlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, primordiyal bir folikülden antral folikül oluşumunun, gonadotropinlerden bağımsız olarak overde lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin etkisi ile olduğu gösterilmiştir (8, 9). Birçok intraovaryan faktörler arasından özellikle TGF- $\beta$  süperailisi üyeleri folikül büyümesi ve oosit gelişimi üzerine önemli biyolojik rollere sahiptir. TGF- $\beta$  süperailisi; TGF- $\beta$ , aktivin, inhibin, AMH, GDF-9 ve BMP'lerden oluşur. Bunlar özgün hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak intraselüler sinyal yollarını tetikler. Böylece otokrin, parakrin ve endokrin

mekanizmalarla etki göstererek; hücre büyümesi, morfogenez, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi biyolojik olaylarda çok önemli rol oynarlar (9, 44) (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** TGF- $\beta$  süperailesi üyelerinin teka-granüloza hücreleri ve granüloza hücreleri-ooisit arasında karşılıklı etkileşimleri (9).

Oogenezis gelişim aşamalarında, ovaryan somatik hücreler ve oosit tarafından TGF- $\beta$  süperailesiyle ilişkili; bağlı proteinler, sinyalleşme aracıları, ligandlar ve reseptörlerin eksprese edildiği kanıtlanmıştır. Deneysel bulguların giderek artması, bunların primordiyal folikül seçimi, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinin çoğalması ya da atrezisi, hormon sentezi, gonadotropin reseptör ekspresyonu, oosit maturasyonu, ovulasyon, luteinizasyon ve korpus luteum oluşumunu içeren, folikül gelişiminin çoğu aşamasında birçok yönden anahtar rol oynadığını göstermiştir (26, 45).

Oosit, folikülogenez sırasında komşu somatik hücrelerin fonksiyonunu düzenlemede önemli etkilere sahiptir. Oositten eksprese edilen GDF-9 ve BMP-15, folikülogenezin çok erken aşamalarında rol almaktadır. Her iki büyüme faktörü de normal folikülogenez ve fertilitede önemli fonksiyonlara sahiptir (44). GDF-9 granüloza hücre çoğalmasını ve preantral büyümeyi uyarmaktadır (45). Farelerde yapılan çalışmada GDF-9 eksikliğinin granüloza hücre çoğalmasını azalttığı ve primer folikül aşamasında foliküler gelişimin duraksamasına neden olduğu gösterilmiştir (46).

BMP-15'in ise normal folikülogenez ve ovulasyonda önemli rol oynadığı, granüloza hücre çoğalmasını uyardığı ve somatik hücreler için mitojenik olduğu gösterilmiştir (47). Ayrıca dominant folikül seçimini etkilemekte, folikül büyümesini, dejenerasyonu ve atretik folikül oluşumunu da düzenlemektedir (17).

Folikülogenez sürecinde preantral ve antral folikül büyümesini arttıran pozitif düzenleyici diğer büyüme faktörleri; granüloza hücrelerinden eksprese edilen aktivin A, granüloza ve teka hücrelerinden eksprese edilen TGF- $\beta$ , teka hücrelerinden eksprese edilen BMP-4 ve BMP-7'dir. TGF- $\beta$ 'nın 3 izoformu vardır (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3). TGF- $\beta$  biyoaktivitesi ilk olarak preantral folikülde izlenmekte folikül büyüdükçe de artan miktarlarda eksprese edilmektedir (48, 49). İnsanda etkileri tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, sıçanlarda granüloza hücre çoğalmasını baskıladığı, progesteron üretimini arttırdığı ve östrojenin büyümeyi uyarıcı etkisini ortaya çıkardığı gösterilmiştir (50). Bunlara karşılık AMH folikülogenezde negatif düzenleyici olarak etki gösterir. AMH, büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerinde eksprese edilmekte ve primordiyal folikül primer folikül geçişini baskılamaktadır. Ayrıca preantral folikül gelişimi üzerinde de negatif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (8, 49). AMH preantral ve küçük antral foliküllerin FSH'a yanıtını azaltmakta böylece foliküllerin döngüsel gelişimi ve dominant folikül seçim sürecinde negatif yönde etki göstermektedir (9).

### **2.3.1. Oosit Kaynaklı TGF- $\beta$ Süperailisi Üyeleri**

Oosit, folikül büyümesi ve gelişmesinin düzenlenmesinde merkezi rol oynamaktadır. TGF- $\beta$  süperailisinin oosit kaynaklı üyeleri, GDF-9 ve BMP-15 çeşitli matris stabilize edici faktörlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (26). GDF-9 ve BMP-15'in inek ve koyundaki primordiyal foliküllerde, kemirgenlerde erken aşamadaki foliküllerde oositler tarafından seçici olarak salgılandığı bulunmuştur (43). Farklı fizyolojik koşullar altında, GDF-9 ve BMP-15 büyüyen ve matür oositlerden de yüksek oranda eksprese edilirler. BMP-15 ve GDF-9 mitojenik sinyal iletim mekanizmaları yoluyla kumulus hücre fonksiyonunun düzenlenmesi, metabolizma, çoğalma, apoptoz, luteinizasyonda önemli etkilere sahiptir (45, 51). GDF-9 ve BMP-15 folikülogenez için



gerekli olup, anormal ekspresyonlarının infertiliteyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (43).

İn vitro olarak GDF-9 veya BMP-15 ile birlikte COC'nin inkübasyonunun oosit maturasyonunu önemli ölçüde uyardığı ve blastokist gelişim oranlarını arttırdığı, blastokistte embriyoblast ve trofoblast hücre sayılarını arttırdığı raporlanmıştır (52, 53).

### **2.3.1.1. Folikülogenezin Düzenlenmesinde GDF-9'un Biyolojik Fonksiyonları**

Rekombinant GDF-9 proteini kullanılan in vitro çalışmalarla, folikülogenezin tüm aşamalarında folikül büyümesi ve gelişmesinde GDF-9 aktivasyonunun biyolojik rolleri ve önemi aydınlatılmıştır (14). GDF-9 mRNA ve protein ekspresyonunun primer ve büyük foliküllerin oositleri ile sınırlı olduğu ileri sürülmüştür (54). Oosit kaynaklı GDF-9'un folikülogenezin çok erken aşamalarında granüloza hücrelerinde önemli etkileri bulunmaktadır (55). GDF-9 uygulanmış immatür sıçanlarda primer ve küçük preantral foliküllerin daha fazla olduğu fakat primordiyal foliküllerin azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın, GDF-9'un primordiyal folikülleri maturasyon için aktifleştirmesi sonucu geliştiği düşünülmüştür (56).

GDF-9 oosit, granüloza hücreleri ve teka hücrelerini içeren tüm foliküller kompartmanın farklılaşmasını uyarmaktadır (57, 58). GDF-9 primer folikül aşamasından itibaren oositler tarafından seçici olarak eksprese edilmektedir. GDF-9 geni silinen farelerde, primer folikül aşamasında folikül gelişiminin duraksadığı, foliküllerin anormal yapıda granüloza hücreleri içerdiği ve folikül çevresinde teka hücre farklılaşmasının olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca erken foliküler aşamada oositler nispeten normal mayotik süreç gösterirken, sonraki aşamalarda GV'nin çevresindeki organellerin bir araya toplanması ve kortikal granüllerin yokluğu gibi bazı ultrastrüktürel mayotik kusurların da görüldüğü raporlanmıştır (57). Bunlara ek olarak; GDF-9 geni eksikliğinde teka hücrelerinin gelişimi bozulmakta, teka hücrelerinde LH reseptör ve c-kit ekspresyonunun eksikliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, oosit kaynaklı GDF-9'un normal oosit ve granüloza hücre fonksiyonunun yanı sıra teka hücre farklanması ve fonksiyonu için gerekli olduğu da saptanmıştır (58).

İn vitro olarak, GDF-9'un preantral folikül büyümesinin uyarılması, gelişen foliküllerin antral aşamaya geçişi, granüloza hücre apoptozu ve foliküler atrezinin baskılanması gibi etkilerle foliküler yaşamı da desteklediği saptanmıştır (59, 60). Foliküler büyümeyi granüloza hücre çoğalması ve bu hücrelerde FSH reseptör ekspresyonunun uyarılmasını sağlayarak desteklemektedir (14). FSH aktivasyonunun GDF-9 tarafından baskılanmasının FSH reseptör modülasyonu aracılığıyla meydana geldiği varsayılmaktadır (10).

GDF-9, LH dalgalanması (piki) öncesi kumulus hücreleri sterol biyosentezi ve glikoliz gibi metabolik kaskatlarda rol almakta böylece ovulasyon öncesi folikül büyümesinin son aşamasında da önemli etkiler yapmaktadır (61).

### **2.3.1.2. Folikülogenezin Düzenlenmesinde BMP-15'in Biyolojik Fonksiyonları**

Oosit tarafından eksprese edilen BMP-15, folikül gelişim aşamaları süresince giderek artan bir ekspresyon paterni göstermektedir (38). BMP-15'in aktivasyonu, BMP-15'e bağlanabilen bir bağlayıcı protein ve negatif aktiviteli follistatin tarafından düzenlenir. Rekombinant insan BMP-15'i kullanılan in vitro çalışmalar; BMP-15'in, FSH'dan bağımsız olarak farklılaşmamış granüloza hücre çoğalmasını uyardığını göstermiştir (35, 39). Granüloza hücre çoğalması ve folikül büyümesi esnasında prematür luteinizasyonun önlenmesi önemlidir. Bu süreçte oosit kaynaklı faktörler GDF-9 ve BMP-15 gonadotropin ile olan progesteron sentezini baskılayarak prematür luteinizasyonu baskılar. BMP-15 granüloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunu baskılayıp FSH aktivasyonunu engellemektedir (62). BMP-15 FSH reseptör ekspresyonunu baskılarken; BMP-15 aktivasyonunu düzenleyen follistatin FSH'a yanıt olarak granüloza hücrelerinin devamlılığını sağlar. Dolayısıyla, follistatin dominant folikül seçimi esnasında BMP-15'in bu etkisini antagonize ederek folikülde yeterince FSH reseptörünün bulunmasını sağlamaktadır (38).

BMP-15 granüloza hücrelerinde KIT ligand (KL) ekspresyonunu uyarır. KL ise oositlerde BMP-15 ekspresyonunu baskılar. Bu nedenle, BMP-15 ve KL oosit ve çevresindeki granüloza hücreleri arasında negatif-feedback döngüsü oluşturur; Oosit BMP-15 ürettiği zaman granüloza hücrelerini KL üretmeleri için uyarır, c-kit

aracılığıyla oosite geri dönüş sinyalleri oositin daha fazla BMP-15 eksprese etmesini baskılar. Artan KL ekspresyonu ve FSH aktivasyonunun BMP-15 tarafından baskılanmasında meydana gelen daha sonraki azalma granüloza hücre çoğalmasının baskılanmasına izin verir (12).

BMP-15 kumulus hücre apoptozunun düzenlenmesine de katılmaktadır. Sığır overlerinde, COC'den oositin uzaklaştırılmasının kumulus hücre apoptozunu başlattığı gösterilmiştir (63). Kumulus hücre apoptozunun başlatılması BMP-15 tedavisiyle önlenabilir. Böylece BMP-15 ovulasyona kadar COC'de apoptoz sıklığının azalmasına katkıda bulunabilir. Bununla ilişkili olarak, BMP-15'in ovulasyona kadar etkin kumulus hücre popülasyonunu sağlayarak, fonksiyonel COC devamlılığında rol aldığı ileri sürülmüştür (64). BMP-15; kumulus genişlemesinin uyarılmasıyla da ilişkilidir. Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor; EGF) gibi büyüme faktörleri kumulus hücre genişlemesini artırır. Oositler kumulus hücreleri üzerinde EGF reseptörlerinin ekspresyonunu destekler. Oositin çıkartılması farede kumulus hücrelerinde EGF reseptör ekspresyonunu azaltmaktadır. Yapılan çalışmada, GDF-9 ve BMP-15 verilmesi ile EGF reseptör düzeyinin normale döndüğü ve böylece normal kumulus hücre genişlemesi gözlemlendiği raporlanmıştır (65).

#### **2.4. PKOS'da Folikülogenez**

Over folikül gelişimi süresince, primordiyal foliküller büyüyen folikül havuzunun içinde gelişir, bir antral folikül ovulasyon için seçilir. Bu olaylar koordineli üreme, metabolik ve intraovaryan etkileşimleri gerektirir (27). PKOS'da ovaryan hiperandrojenizm, insülin direnci hiperinsülinemi ve değişmiş intraovaryan parakrin sinyalizasyon folikül büyümesini bozabilir. Foliküler gelişimin duraksamasına bağlı olarak, overin periferinde küçük antral foliküllerin birikiminin eşlik ettiği polikistik morfoloji gözlenmektedir. Bu nedenle; polikistik over, makroskopik olarak normal over büyüklüğünün 2-5 katı kadardır (2). Ayrıca PKOS'lu kadınlarda; folikülogenez süresince intrafoliküler mikroçevrede oluşan değişiklikler, endokrin-parakrin faktör değişikliği, metabolik disfonksiyon ile ilişkili olarak bozulmuş oosit maturasyonu, düşük fertilizasyon oranları ve embriyonik gelişim yetersizliği gözlenmektedir (20).

#### 2.4.1. PKOS'da Erken Foliküler Gelişim

PKOS patogeneziyle ilişkili olarak, folikülogenezin erken ve preantral aşamalarında görülen folikül gelişim bozukluğu mekanizmaları hala bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar, PKOS'ta primer ve sekonder folikül sayılarının normale göre yaklaşık olarak 2 kat fazla olduğunu göstermiştir (22, 66, 67). Erickson ve ark. (68) bu artışın PKOS'ta primer folikül aşamasındaki yığılmadan kaynaklandığını rapor etmiştir. Bir başka çalışmada ise primordiyal folikül gelişiminin normale göre yüksek, primordiyal folikül atrezisinin ise normalden az olduğu, buna bağlı olarakta primer ve sekonder folikül sayısının arttığı bildirilmiştir (18). Preantral folikül gelişimi, endokrin, otokrin ve parakrin etkili faktörlere bağlıdır. Ancak bu faktörlerden hangisinin erken folikül gelişimi için daha önemli olduğu henüz bilinmemektedir (69).

Normal folikülogenezde gerekli olduğu bilinen büyüme faktörlerinden GDF-9 ve BMP-15'in anormal ekspresyonlarının PKOS patogeneziyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (16, 47, 70). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada GDF-9 ve BMP-15'in ekspresyonlarının PKOS'lu hastalarda normale göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (16). Buna zıt olarak bir başka çalışmada GDF-9 ekspresyon düzeyinin polikistik overlerde azalmış olduğu bildirilmiştir ve GDF-9'un düşük seviyesinin PKOS foliküllerinde artan androjen sentezinin bir nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (70). Ancak azalmış GDF-9 mRNA seviyesinin, PKOS'da foliküler gelişim duraksamasında nasıl bir etki gösterdiği ve hastalığın primer patofizyolojisinde olası etki yolları henüz açıklanamamıştır (41, 70).

İnfertil kadınlarda, folikül sıvısı BMP-15 düzeyindeki yükselmenin, bozulmuş oosit kalitesini düzeltebileceği, fertilizasyon oranlarını yükseltebileceği ve yetersiz embriyonik gelişimi düzelteceği yönünde görüşler bildirilmiştir. Ayrıca BMP-15'in oosit maturasyonu ve fertilizasyon oranlarının belirlenmesinde iyi bir indikatör olabileceği de ileri sürülmektedir (47). Raporlanan bir çalışmada, folikülogenez süresince PKOS oositlerinde BMP-15'in ekspresyonunda ise kalitatif ve kantitatif hiçbir değişiklik gözlenmemiştir (70).

#### 2.4.2. PKOS'da Antral Folikül Gelişimi

Folikülogenez anormal ekstraovaryan endokrin faktörler tarafından bozulabilir, bu da ovaryan fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır. FSH eksikliği, LH hipersekresyonu, hiperandrojenemi ve insülin direnci ile hiperinsülinemi gibi kompleks endokrin bozukluklar PKOS'un patogenezinin sorumludur (41).

FSH, foliküler gelişimi uyarmakta, granüloza hücrelerinde LH reseptörlerini ve aromataz enzim sistemlerini baskılamaktadır (27). PKOS'lu hastalar normal sikluslu hastalar ile karşılaştırıldığında düşük serum FSH seviyesi göstermektedir. FSH eksikliği, 2-8 mm arasında antral foliküllerin artan birikimiyle sonuçlanır. Dolayısıyla, çok sayıda küçük folikül, foliküler gelişim duraksamasına uğrar ve dominant folikül olmayı başaramaz (18).

PKOS'da foliküler gelişimde duraksama olmasına rağmen, foliküler büyüklüğün normal foliküller ile karşılaştırıldığında benzer olduğu gösterilmiştir. Bu foliküllerde granüloza hücrelerinin steroid sentezleme özelliklerini devam ettirdiği ve östrojen, progesteronun düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (66). Anovuluar PKOS'lu hastalarda, orta büyüklükteki antral foliküllerin granüloza hücreleri tarafından östrojen üretimi tipik olarak artmıştır, fakat ovuluar PKOS'lu hastalarda östrojen düzeylerinin normal olduğu gösterilmiştir (71).

PKOS'lu kadınlar tipik olarak foliküler faz boyunca LH'nin hipersekresyonu ile uyarılır (23). Yüksek LH düzeyi, yetersiz oosit maturasyonu ve fertilizasyon oranlarında azalmaya neden olmaktadır. Folikülogenez sırasında LH'nin aşırı sekresyonu FSH fonksiyonunu baskılayabilir; bu durum PKOS'lu kadınlarda, küçük antral foliküllerde atrezi ve prematür luteinizasyonunu destekleyerek anormal granüloza hücre fonksiyonuyla sonuçlanır (23, 72). Ayrıca artan LH düzeyi, oosit nükleer fonksiyonları da etkileyerek erken mayotik süreçleri aktif hale getirebilir veya oositte apoptotik sinyallerin aktive olmasına neden olabilir (73). Mayoz bölünmenin endokrin kontrolünün bozulması, 1. polar cismin oluşumunda bozulmaya ve oositte kromozomal sayısal anomalilere neden olabilmektedir (74).

PKOS'lu kadınların serum ve folikül sıvısı AMH seviyesi normalden yüksek olup artan AMH düzeyi oosit maturasyonu azaltmakta ve immatür oosit sayısının artışına neden olmaktadır (75, 76). Ayrıca artan AMH düzeyi granüloza hücrelerinin

FSH'a duyarsız hale gelmesine neden olmakta ve sonuçta overde artmış antral folikül gelişimi ve foliküler gelişim duraksaması gözlenmektedir (76).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

Deney protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilen, 45 adet 23-25 günlük dişi Balb/C cinsi fareler kullanıldı. Denekler deney süresince, sıcaklığı  $23\pm 1$  °C, nem oranı %45-65 ve 12 saat gece, 12 saat gündüz koşulları sağlanan laboratuvar ortamında, 35cmX45cmX25cm boyutlarında plastik kafeslerde barındırıldı ve hazır pellet yem ve çeşme suyu ile beslendi. Deneklere ilaç uygulaması her sabah 09.30-10.30 arasında yapıldı.

#### 3.2. Çalışma Grupları

Grup I (n=15): Bu gruptaki deneklere, 20 gün boyunca hiçbir işlem yapılmadı ve bu süre sonunda sakrifiye edildiler.

Grup II (n=15): Bu gruptaki deneklere, 20 gün boyunca susam yağı (Sigma-Aldrich®, katalog no: 85067) s.c. enjekte edildi ve bu süre sonunda denekler sakrifiye edildi.

Grup III (n=15): Bu gruptaki deneklere, 20 gün boyunca dehidroepiandrosteron (DHEA, 6 mg/100g/gün) (Merck Millipore®, katalog no: 252805) susam yağında çözdürülerek s.c. enjekte edildi (77, 78). Bu süre sonunda denekler sakrifiye edildi. Tüm gruplarda siklus takibi günlük vajinal smear alınarak yapıldı (79, 80).

#### 3.3. Overlerin Elde Edilmesi ve Fiksasyon

Deney süresi bitiminde, denekler intraperitoneal olarak uygulanan ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (100 mg/kg) anestezisi ile uyutuldu. Deneklerin ağırlı uyarılara yanıt vermediği anlaşıldıktan sonra abdominal bölgeleri açıldı. Her grupta 10 deneğin

overleri iki taraflı olarak alındı, sağ overler immünfloresan preparasyon için %4' lük paraformaldehit çözeltisine, sol overler elektron mikroskopik preparasyon için %2,5'lük gluteraldehit çözeltisine alındı. Tüm gruplarda 5 deneğin overleri ise ışık mikroskopik preparasyon için %10'luk tamponlanmış formaldehite alındı. Tüm gruplardan alınan overler stereo mikroskop ile incelendi ve mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Nikon® coolpix5000, Tokyo, Japonya) ile fotoğrafları çekildi.

### 3.4. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi (81)

Işık mikroskopik inceleme için alınan dokular öncelikle 1cm<sup>3</sup>'lük parçalara bölündü ve %10'luk formaldehit solüsyonunda 24-48 saat tespit edildi. Daha sonra musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular aşağıdaki takip protokolüne göre hazırlandı.

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| 1. Etil Alkol (%80)  | 30 dk  |
| 2. Etil Alkol (%95)  | 2 saat |
| 3. Etil Alkol (%95)  | 1 saat |
| 4. Etil Alkol (%100) | 1 saat |
| 5. Etil Alkol (%100) | 1 saat |
| 6. Etil Alkol (%100) | 1 saat |
| 7. Ksilol            | 1 saat |
| 8. Ksilol            | 1 saat |
| 9. Ksilol            | 2 saat |
| 10. Parafin          | 2 saat |
| 11. Parafin          | 2 saat |
| 12. Parafin          | 2 saat |
| 13. Bloklama         |        |

Blok haline getirilen dokulardan, rotary mikrotom (Leica® RM2125RT, Leica Avusturya-Viyana) ile 5 µm kalınlığında kesitler adheziv lamlara (Superior Marienfeld-HistoBond®) alındı ve histokimyasal inceleme için toluidin mavisi ile boyandı.



### 3.5. İmmünofloresan İşaretleme Protokolü (82)

1. Paraformaldehit çözeltisindeki dokular bir gece buzdolabında +4°C’de bekletildi.

2. Dokular %20’ lik süktroz solüsyonda 12 saat, bunu takiben %30 süktroz ve %0,1 sodyum azid içeren solusyonda 12 saat bekletildi. Daha sonra -20°C’ye konarak donmaları sağlandı.

3. Donan dokulardan, Leica® CM1900 marka kriyostat ile 10 µm kalınlığında kesitler, adeziv kaplı lamlara (Superior Marienfeld-HistoBond®) alındı. İşaretleme işlemi yapılmadan önce kesitler pap-pen ile çevrildi.

4. Kesitler fosfatlı tuz tamponu (PBS, pH: 7,4) ile 3 kez 5’er dakika yıkandı.

5. Non-spesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için protein blok (Novocastrol™, katalog no: D01-125) ile 8 dakika inkübe edildi.

6. Kesitlerin üzerindeki protein blok uzaklaştırıldı. Daha sonra %0.1 Triton-X-100, %0.5’lik sığır serum albumini içeren PBS içinde (PBS-BSA) 1/100 oranında sulandırılmış primer antikorlar (GDF-9 için; GDF-9 keçiden elde edilmiş poliklonal IgG primer antikor, Santa Cruz Biotechnology®, katalog no: 12244, BMP-15 için; BMP-15 tavşandan elde edilmiş poliklonal IgG primer antikor, Santa Cruz Biotechnology®, katalog no: 28911) damlatıldı. Negatif kontrol için ayrılan kesitlere ise primer antikor içermeyen % 0,5 PBS-BSA damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde +4 °C’de buzdolabında 16 saat inkübe edildiler.

7. İnkübasyondan çıkarılan kesitler PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkandı.

8. Kesitlerin üzerine %0,5 PBS-BSA içinde 1/200 oranında sulandırılmış sekonder antikor (GDF-9 için; tavşandan elde edilmiş texas red (TR) konjuge anti-keçi IgG sekonder antikor, Santa Cruz Biotechnology®, sc-2012, BMP-15 için; keçiden elde edilmiş fluorescein isothiocyanate (FITC) konjuge anti-tavşan IgG sekonder antikor, Santa Cruz Biotechnology®, katalog no: 2012) damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde 37 °C’de 90 dakika inkübe edildiler.

9. Kesitler PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkandı.

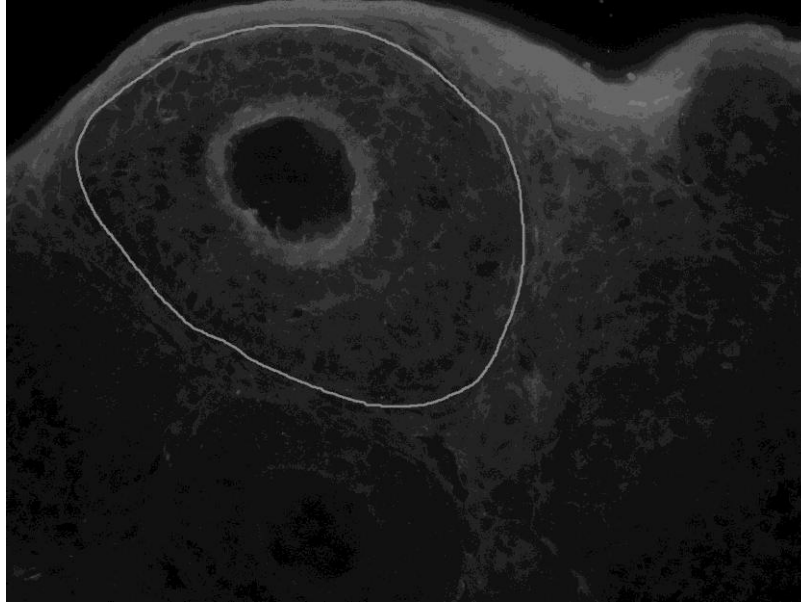
10. Son yıkamadan sonra lamlar dikkatlice kurulandı ve çekirdeklerin boyanması için kesitler, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içerikli kapatma

medyumu (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, katalog no: 24941) ile kapatıldı. Lamellerin etrafı, kesitlerin hava almaması için tırnak cilası ile izole edildi.

### 3.6. İmmüno Floresan İşaretlemenin Kantitatif Değerlendirilmesi

Hazırlanan kesitler, Nikon EclipseTi-S floresan mikroskop (Nikon<sup>®</sup>, Japan) ile incelendi ve mikroskoba monte edilmiş dijital kamera ile X40 büyütmede fotoğraflandı.

Değerlendirmede, her gruptan 80 folikül (primordiyal folikül=20, primer folikül=20, sekonder folikül=20, tersiyer folikül=20) olmak üzere toplamda 240 folikül Image J (National Institutes of Health, USA) görüntü analiz programı kullanılarak analiz edildi. Analiz için, floresan mikrograflar öncelikle 8-bit renge dönüştürüldü. Daha sonra 256 gri skala renk düzeyinde, 2.derece polinomial fonksiyonda kalibre edildi. Belirlenen foliküllerin çevresi programdaki araçla (freehand tool) elle çizilerek çevrelendi ve boyanma yoğunluklarının ortalama değerleri, sayısal olarak ölçüldü (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** ImageJ görüntü analiz programı ile folikülde GDF-9 ve BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğunun ölçülmesi.

### 3.7. Elektron Mikroskopik Doku Takibi Protokolü (79)

Elektron mikroskopik inceleme için alınan dokular öncelikle 1mm<sup>3</sup>'lük parçalara bölündü ve %2,5'lik gluteraldehit solüsyonunda 4-6 saat tespit edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan dokular aşağıdaki takip protokolüne göre hazırlandı.

1. %1'lik osmium tetraoksitte ikinci tespit	1 saat
2. PBS ile yıkama	3 kez 5'er dakika
3. % 50 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
4. % 60 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
5. % 70 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
6. % 80 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
7. % 96 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
8. % 100 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
9. % 100 Etil alkol	+ 4 °C'de 15 dakika
10. %100 Etil alkol	25 °C'de 15 dakika
11. Propilen oksit	25 °C'de 15 dakika
12. Propilen oksit	25 °C'de 15 dakika
13. Propilen oksit + Epoksi rezin	25 °C'de 30 dakika
14. Propilen oksit + Epoksi rezin	25 °C'de 30 dakika
15. Epoksi rezin	25 °C'de 16-24 saat

Bu işlemlerden sonra dokular epoksi rezine (Electron Microscopy Sciences® katalog no:13940) gömülerek 60 °C'lik etüvde 24 saat süreyle polimerize edildi. Elde edilen bloklardan ultramikrotom (Leica® Ultracut UCT125, Leica Avusturya-Viyana)

ile 70 nm kalınlığında kesitler, 300 gözenekli bakır gridlere alındı ve uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Kontrastlama işlemi için;

- Kesitler uranil asetatda 5 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkandı.
- Kurşun sitratta 5 dakika bekletildi.
- Distile suda yıkandı.
- Kurutma kâğıdı ile kurutuldu.

### **3.8. Elektron Mikroskopik Değerlendirme**

Boyanan kesitler transmisyon elektron mikroskobu (Jeol® JEM1011, Tokyo, Japonya) ile incelendi ve mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflandı. Her grupta ovaryan stroma ve farklı aşamalardaki foliküller ultrastrüktürü incelendi.

### **3.9. İstatistiksel Analiz**

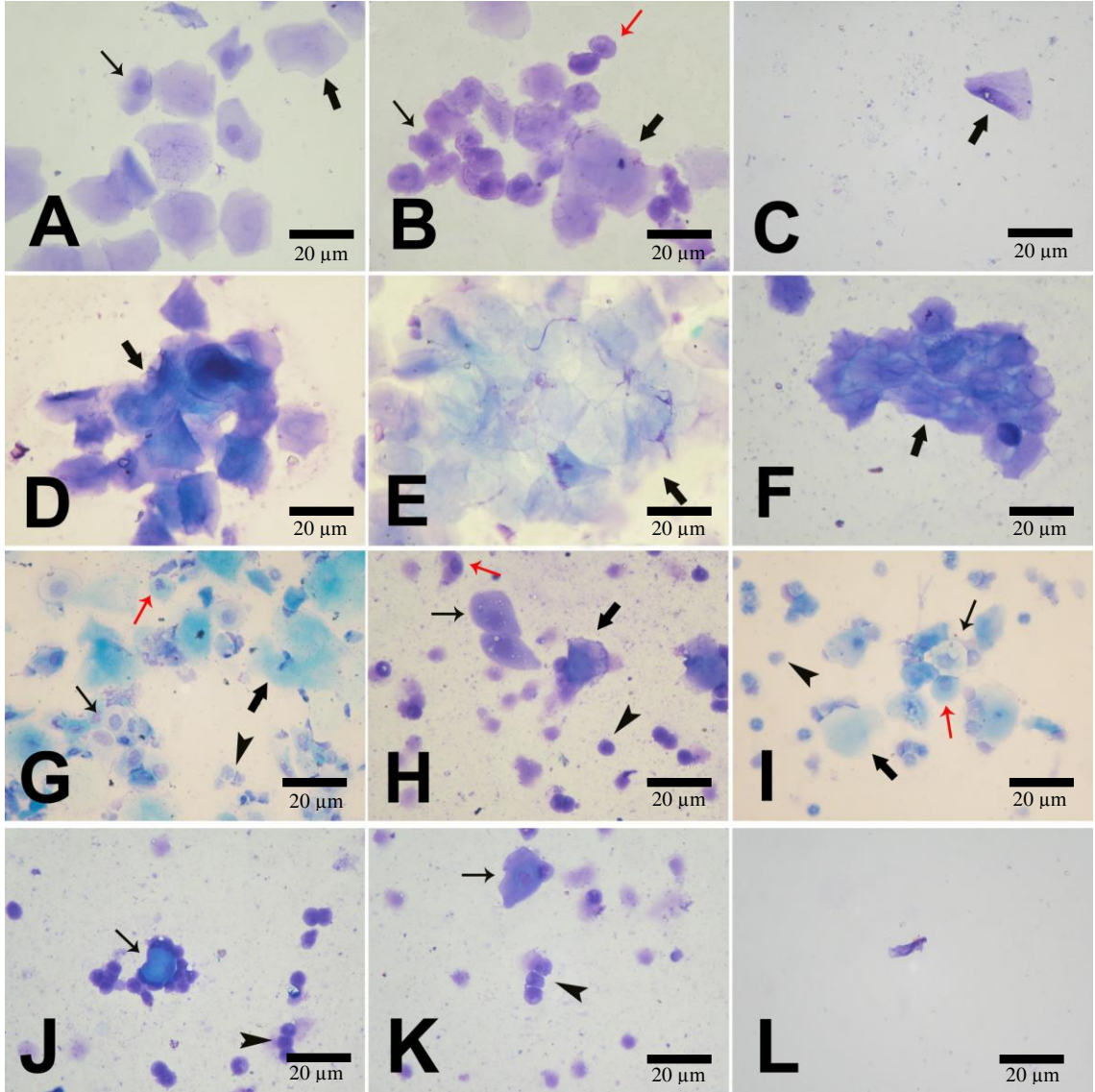
Tüm gruplarda BMP-15 ve GDF-9 parametrelerinin normal dağılıma uygunluğu, Shapiro Wilks testi ile kontrol edilmiş ve grupların normal dağılım gösterdiği saptanmıştır. Parametrelerin gruplar arası ve gruplar içi karşılaştırılmasında ANOVA testi kullanılmıştır. Grup ortalamalarının ikişerli karşılaştırılmasında Tukey HSD testi kullanılmıştır. Gruplarda parametrelere ait tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. Bu nedenle parametrelerin gruplardaki dağılımının grafik gösterimi için de “Error Bar” grafiği tercih edilmiştir. İstatistik analizlerde SPSS 11.5 ve Statistica 6.0 paket programları kullanıldı ve analizlerde  $p < 0.01$ 'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1.-Vajinal Smear Bulguları

Grup I ve Grup II'de östrus siklusunun tüm aşamaları benzerlik göstermekteydi. Proöstrus aşamasında, her alanda parabazal, süperfisyal ve az sayıda kornifiye hücre grupları görüldü (sırasıyla Şekil 4.1.A ve 4.1.B). Östrus aşamasında, gruplar oluşturmuş çok sayıda kornifiye hücre bulunmaktaydı (sırasıyla Şekil 4.1.D ve 4.1.E). Metöstrus aşamasında, dağınık halde bulunan parabazal hücreler ve kornifiye hücreler arasında lökositler gözlemlendi (sırasıyla Şekil 4.1.G ve 4.1.H). Diöstrus aşamasında ise her alanda çok sayıda lökosit görülürken bunlar arasında az sayıda süperfisyal hücrelere rastlandı (sırasıyla Şekil 4.1. J ve 4.1.K).

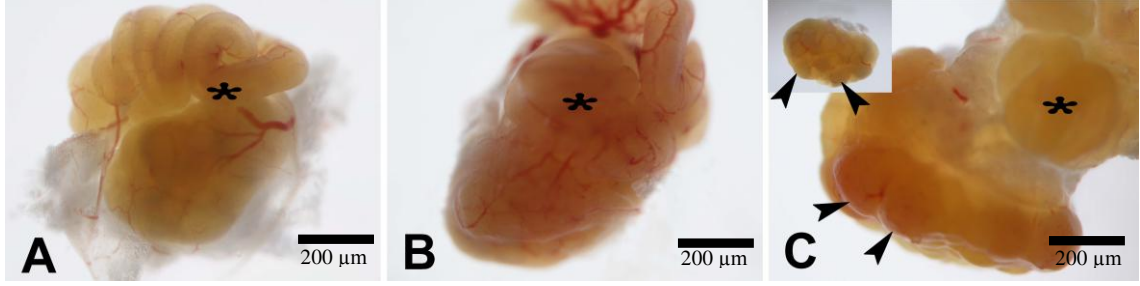
Grup III'de östrus siklusunun proöstrus aşamasında, incelenen alanlarda diğer gruplara göre çok az sayıda süperfisyal hücre görüldü (Şekil 4.1.C). Östrus aşamasında, birçok alanda gruplar oluşturmuş çok sayıda kornifiye hücre gözlemlendi (Şekil 4.1.F). Metöstrus aşamasında, birçok alanda parabazal, süperfisyal ve kornifiye hücre grupları ve bunların arasında az sayıda lökosit olduğu saptandı (Şekil 4.1.I). Diöstrus aşamasında, her alanda birkaç süperfisyal ve kornifiye hücre gözlemlendi (Şekil 4.1.L).



**Şekil 4.1.** Östrus siklusu vajinal smear. Grup I de proöstrus (A), östrus (D), metöstrus (G) ve diöstrus aşamaları (J). Grup II de proöstrus (B), östrus (E), metöstrus (H) ve diöstrus aşamaları (K). Grup III de proöstrus (C), östrus (F), metöstrus (I), diöstrus aşamaları (L). Parabazal hücreler (kırmızı oklar), süperfisyal hücreler (ince oklar), kornifiye hücreler (kalın oklar), lökositler (ok başları) (Toluidin mavisi x1200).

#### 4.2. Stereo Mikroskopik Bulgular

Grup I'de incelen overlerin, boyutlarının normal sınırlarda ve over yüzeylerinin düzgün görünümde olduğu saptandı (Şekil 4.2.A). Grup II'de grup I'e benzer olarak over boyutları ve over yüzeyinin görünümü normaldi (Şekil 4.2.B). Grup III'de diğer gruplara göre over boyutlarının arttığı, over yüzeyinin girintili çıkıntılı, kistik görünüm kazandığı görüldü (Şekil 4.2.C).



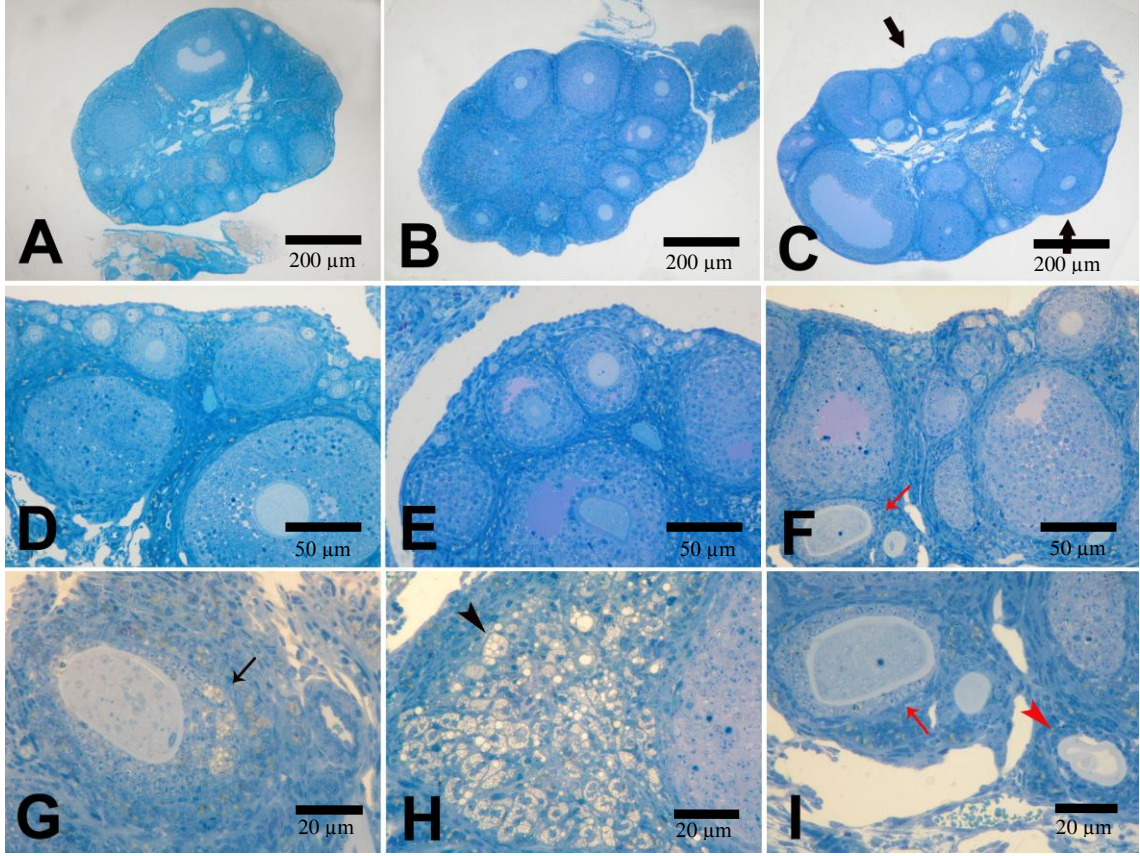
**Şekil 4.2.** Overin stereo mikroskopik görünümü. Grup I (A), Grup II (B) de normal boyutlarda düzgün yüzeyli over görünümü. Grup III (C) de, artmış over boyutu, over periferinde antral folikül birikimi ve over yüzeyinde kistik görünüm, (ok başları), tuba uterina (asteriskler) (x60).

### 4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

**Grup I:** İncelenen overlerde primordiyal folikülden tersiyer foliküle tüm folikül gelişim aşamaları gözlemlendi. Granüloza ve teka hücrelerinin yapılarını korudukları ve oosit çevresinde yerleşimlerinin düzenli olduğu görüldü. Normal yapıda foliküller arasında birkaç tane atretik folikül görüldü (Şekil 4.3.A ve 4.3.D).

**Grup II:** Bu grupta grup I'e benzer olarak foliküler aşamaların normal morfolojide olduğu gözlemlendi. Foliküler yapıdaki granüloza ve teka hücrelerinin normal morfolojide ve organizasyonda olduğu görüldü (Şekil 4.3.B ve Şekil 4.3.E).

**Grup III:** Preantral aşamadaki folikül sayısında artış bulunmaktaydı (Şekil 4.3.C). Foliküler gelişimin farklı aşamalarında atretik foliküller saptandı. Atreziye giden foliküllerin granüloza hücre sitoplazmalarında lipit birikimine bağlı luteinizasyon görüldü (Şekil 4.3.G). Ayrıca ovaryan stromal hücre sitoplazmalarında da lipit birikimi vardı (Şekil 4.3.H). Stromada çok sayıda farklı boyutlarda foliküler kistik yapılarla rastlandı (Şekil 4.3.I).

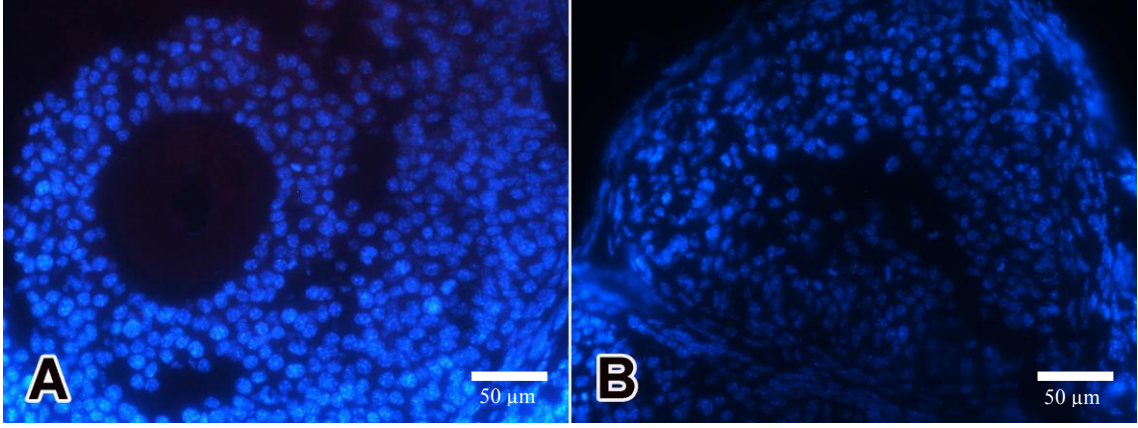


**Şekil 4.3.** Işık mikroskobik over kesitleri. Grup I (A), Grup II (B) normal over görünümü, Grup III ( C) de over stromasında artmış sayıda antral folikül birikimi (kalın oklar). Grup I (D), grup II ( E), grup III ( F) farklı folikül gelişim aşamaları. Grup III (G)'de granüloza hücrelerinde luteinizasyon (ince ok), (H) stromada luteinizasyon (ok başı), (I) foliküler kist (kırmızı oklar) ve atretik folikül (kırmızı ok başı). (A, B, C Toluidin mavisi x170), (D, E, F, Toluidin mavisi x600), (G, H, I, Toluidin mavisi x1200).

#### 4.4. İmmüno Floresan Bulgular

GDF-9 ve BMP-15 negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi (Şekil 4.4.A ve 4.4.B).





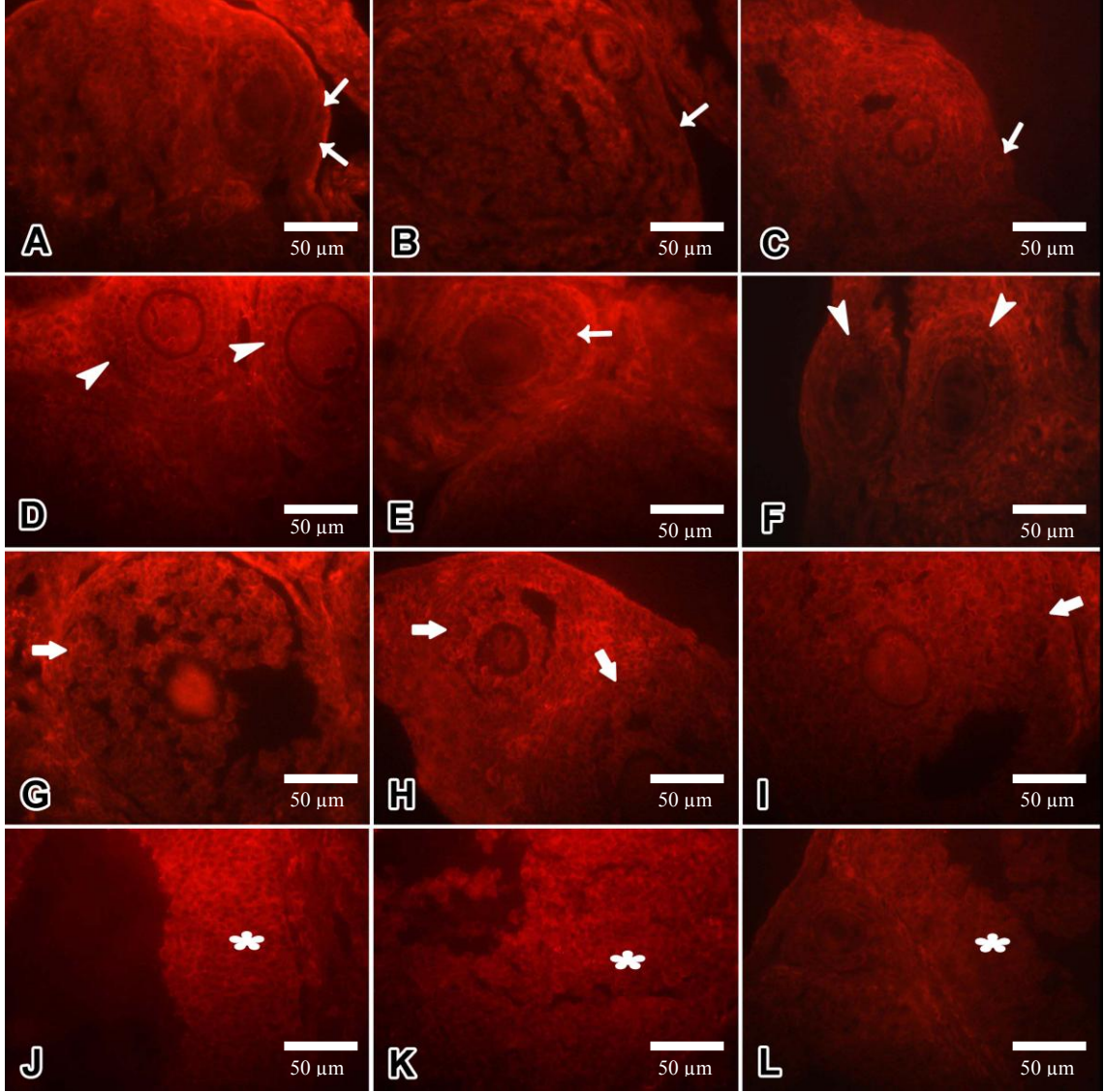
Şekil 4.4. GDF-9 (A) ve BMP-15 (B) immünofloresan negatif kontrol kesitleri (x400).

#### 4.4.1. GDF-9

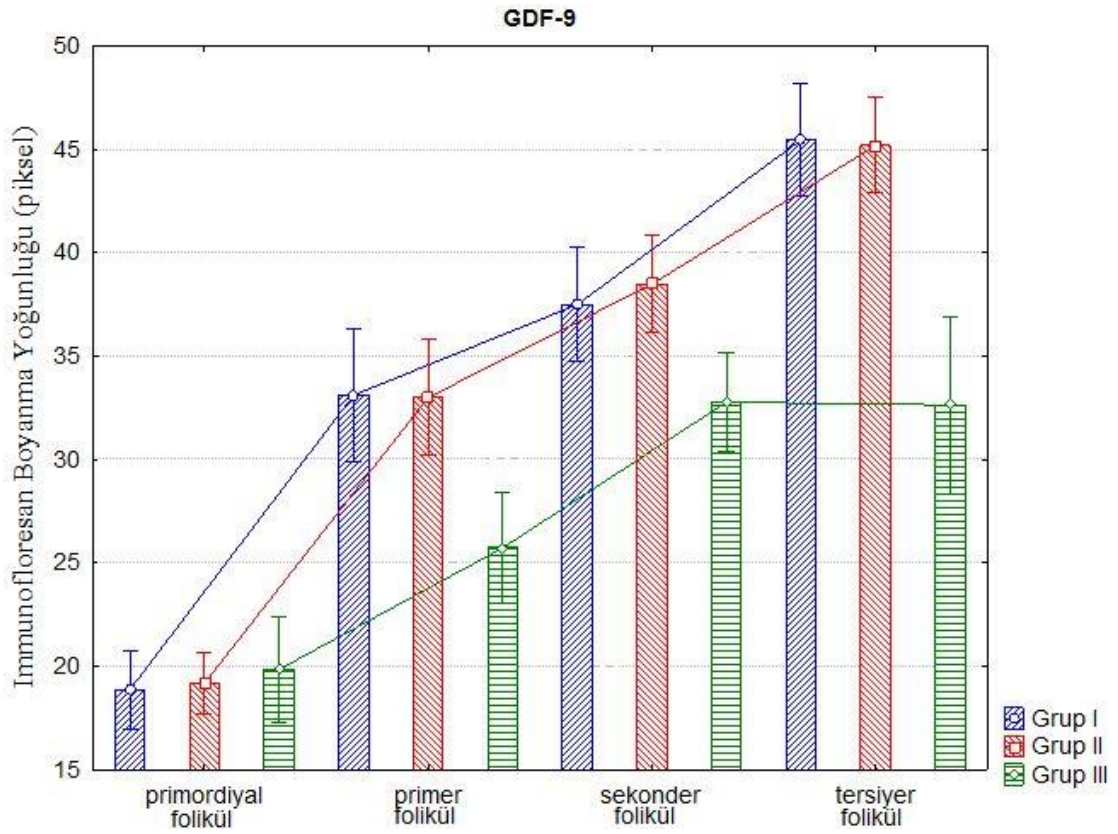
**Grup I:** Foliküler gelişimin erken aşamasından (primordiyal folikül) itibaren tüm foliküler aşamalarda (primer folikül, sekonder folikül ve tersiyer folikül), foliküler hücrelerde GDF-9 immün işaretlenmesi görüldü (sırasıyla Şekil 4.5.A, 4.5.D, 4.5.G, 4.5.J). Primordiyal foliküllerde GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu azdı ( $18.868 \pm 4.03$ ). Ancak folikül gelişim süresince primer folikül, sekonder folikül ve tersiyer folikül aşamalarına doğru GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğunda artış görüldü (sırasıyla  $33.103 \pm 6.8$ ,  $37.487 \pm 5.9$ ,  $45.447 \pm 5.8$ ), (Şekil 4.6). Primordiyal folikülden tersiyer foliküle doğru gözlenen bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.001$ ), (Çizelge 4.1.).

**Grup II:** GDF-9 immün işaretlenmesi, folikülogenez süresince oosit ve granüloza hücrelerinde kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.5.B, 4.5.E, 4.5.H, 4.5.K), (Çizelge 4.2.) (Şekil 4.7.). Folikül gelişim aşamaları süresince primordiyal folikül aşamasından tersiyer folikül aşamasına doğru tüm foliküler hücrelerde immün işaretlenme görüldü. Primordiyal foliküllerde GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğunun az olduğu saptandı ( $19.171 \pm 3.2$ ). Primordiyal folikülden sonraki gelişim aşamalarında (primer folikül, sekonder folikül ve tersiyer folikül) GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğunun artış gösterdiği (sırasıyla  $33.000 \pm 5.9$ ,  $38.466 \pm 4.9$ ,  $45.185 \pm 4.9$ ) ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p < 0.001$ ), (Çizelge 4.1.).

**Grup III:** Bu grupta GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu diğer gruplara göre anlamlı olarak azalmıştı ( $p<0.001$ ), (Şekil 4.7.). Folikülogenezin tüm aşamalarında GDF-9 immün işaretlenmesi gözlemlendi (sırasıyla Şekil 4.5.C, 4.5.F, 4.5.I, 4.5.L). Bu işaretlenme, oosit sitoplaması ve granüloza hücre sitoplazmasında belirgindi (Şekil 4.8.). Diğer gruplarla karşılaştırıldığında primordiyal foliküllerde GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğunun benzer olduğu gözlemlendi ( $19.834\pm 5,5$ ), ( $p=0.775$ ). GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu, primordiyal foliküldekine göre primer folikül ve sekonder folikülde anlamlı olarak artış göstermekteydi (sırasıyla  $25.721\pm 5,7$ ,  $32.765\pm 5,1$ ), (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Ancak immün işaretlenme yoğunluğu, diğer gruplardaki primer folikül ve sekonder folikül immün işaretlenme yoğunluğuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermekteydi (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ), (Çizelge 4.1). Tersiyer foliküllerin immün işaretlenme yoğunluğu diğer gruplardakinden azdı ( $32.631\pm 9,1$ ) ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.001$ ), (Şekil 4.6), (Çizelge 4.2).



**Şekil 4.5.** GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu. Grup I'de primordiyal foliküllerde (ince oklar) (A), multilaminar primer foliküllerde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve oositte immün işaretlenme (ok başları) (D), sekonder folikülde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve oositte immün işaretlenme (kalın ok) (G), tersiyer folikülde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında immün işaretlenme (asterisk) (J). Grup II'de primordiyal folikülde (ince ok) (B), multilaminar primer folikülde (ince ok) (E), sekonder foliküllerde (kalın oklar) (H), ve tersiyer folikülde immün işaretlenme (asterisk) (K). Grup III'de primordiyal folikülde (ince ok) (C), multilaminar primer foliküllerde (ok başları) (F), sekonder folikülde (kalın ok) (I), tersiyer folikülde immün işaretlenme (asterisk) (L), (TR x400).

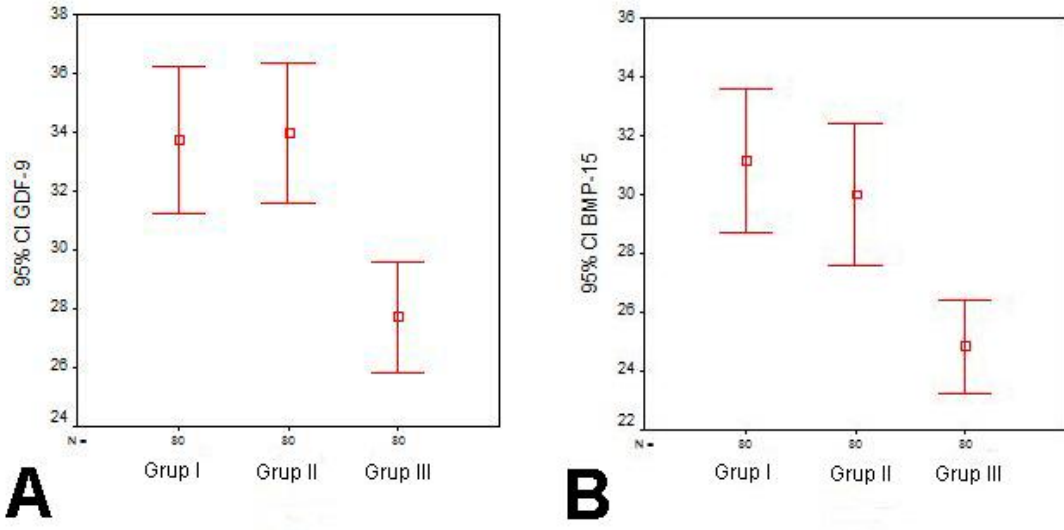


**Şekil 4.6.** Foliküler gelişim aşamalarında GDF-9 immüno Floresan boyanma yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması.

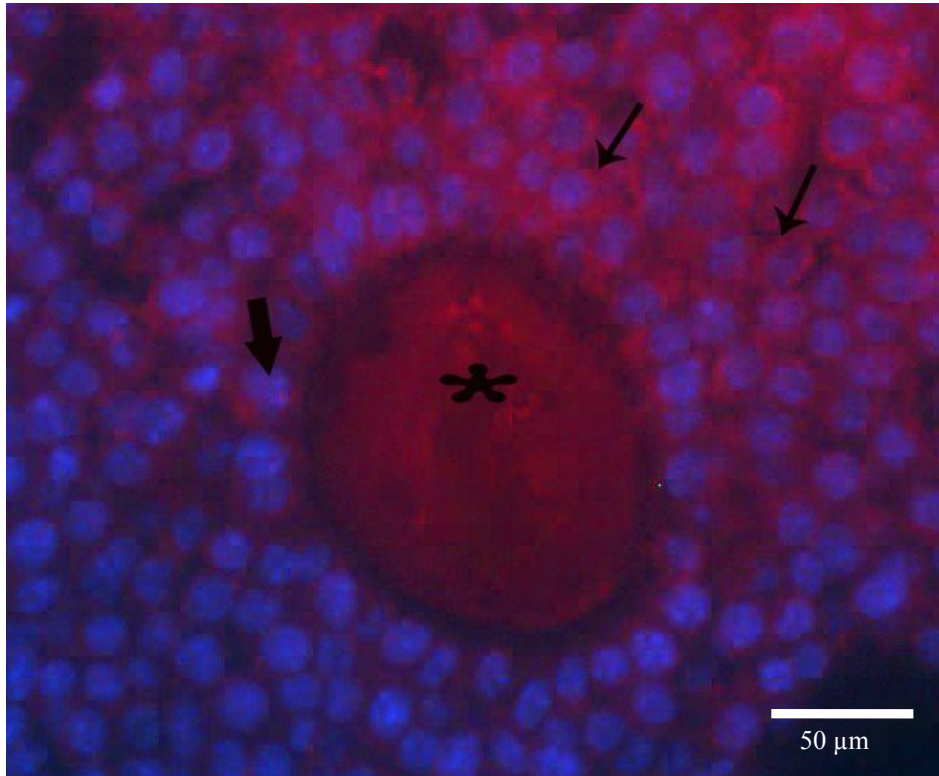
**Çizelge 4.1.** Folikülün farklı gelişim aşamalarında GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu

	Grup I		Grup II		Grup III		p
	ort	s.sapma	ort	s.sapma	ort	s.sapma	
Primordiyal folikül	18.868	4.038	19.171	3.228	19.834	5.511	0.775
Primer folikül	33.103	6.803	33.000	5.973	25.721*	5.765	<0.001
Sekonder folikül	37.487	5.910	38.466	4.993	32.765*	5.113	0.003
Tersiyer folikül	45.447	5.810	45.185	4.926	32.631*	9.175	<0.001

\*p<0.001



**Şekil 4.7.** GDF-9 (A) ve BMP-15'in (B) immün işaretlenme yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması. CI: Güvenlik aralığı, Barlar ortalama±standart sapma değerleri göstermektedir.



**Şekil 4.8.** GDF-9'un oosit sitoplazmasında ve granuloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince oklar) (TR), granuloza hücre nükleusları (kalın ok) (DAPI), oosit sitoplazması (asterisk) (TR), (x800).

#### 4.4.2. BMP-15

**Grup I:** Primordiyal foliküllerde immün işaretlenme yoğunluğunun az olduğu saptandı ( $16.554 \pm 3.5$ ), (Şekil 4.9.A). Foliküler gelişim süresince; primer folikül, sekonder folikül ve tersiyer folikül aşamalarında BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğunda artış olduğu (sırasıyla  $31.062 \pm 5.9$ ,  $35.370 \pm 6.4$ ,  $41.501 \pm 7.8$ ) saptandı (sırasıyla Şekil 4.9.D, 4.9.G, 4.9.J), (şekil 4.10.).

**Grup II:** Bu grupta immün işaretlenme yoğunluğu kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.7.), (Çizelge 4.2.). Primordiyal foliküllerde immün işaretlenme yoğunluğu azdı ( $16.138 \pm 3.8$ ) (Şekil 4.9.B). Ancak immün işaretlenme yoğunluğunun primer folikülden ( $29.157 \pm 5.5$ ), sekonder foliküle ( $33.867 \pm 5.2$ ) ve daha sonra tersiyer foliküle ( $40.820$ ) doğru artış gösterdiği saptandı (sırasıyla Şekil 4.9.E, 4.9.H, 4.9.K), (Şekil 4.10.).

**Grup III:** Bu grupta gelişen foliküler aşamalarda BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğunun diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p < 0.001$ ), (Şekil 4.7.), (Çizelge 4.2.). Folikülogenezin tüm aşamalarında BMP-15 immün işaretlenmesi gözlemlendi (sırasıyla Şekil 4.9.C, 4.9.F, 4.9.I, 4.9.L). Bu işaretlenme, oosit sitoplazması ve granüloza hücre sitoplazmasında belirgindi (Şekil 4.11.). Primordiyal foliküllerde immün işaretlenme yoğunluğu azalmıştı ( $15.695 \pm 3.2$ ) ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0.745$ ), (Çizelge 4.3.). Foliküler gelişimin ilerleyen aşamalarında, BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu primordiyal foliküle göre primer folikül ( $23.699 \pm 2.8$ ) ve sekonder folikülde ( $28.944 \pm 4.4$ ) anlamlı bir artış göstermekteydi (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Ancak diğer gruplardaki primer folikül ve sekonder folikül immün işaretlenme yoğunluğuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azaldığı saptandı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ), (Çizelge 4.3.). Tersiyer folikülde BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu önceki gelişim aşamalarına göre anlamlı olarak artmıştı ( $31.086 \pm 4.3$ ), ( $p < 0.001$ ). Ancak diğer gruplardaki tersiyer folikül immün işaretlenme yoğunluğuna göre belirgin bir azalma görülmekteydi (Şekil 4.10). BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğundaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.001$ ), (Çizelge 4.3.).

**Çizelge 4.2.** Gruplarda GDF-9 ve BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu

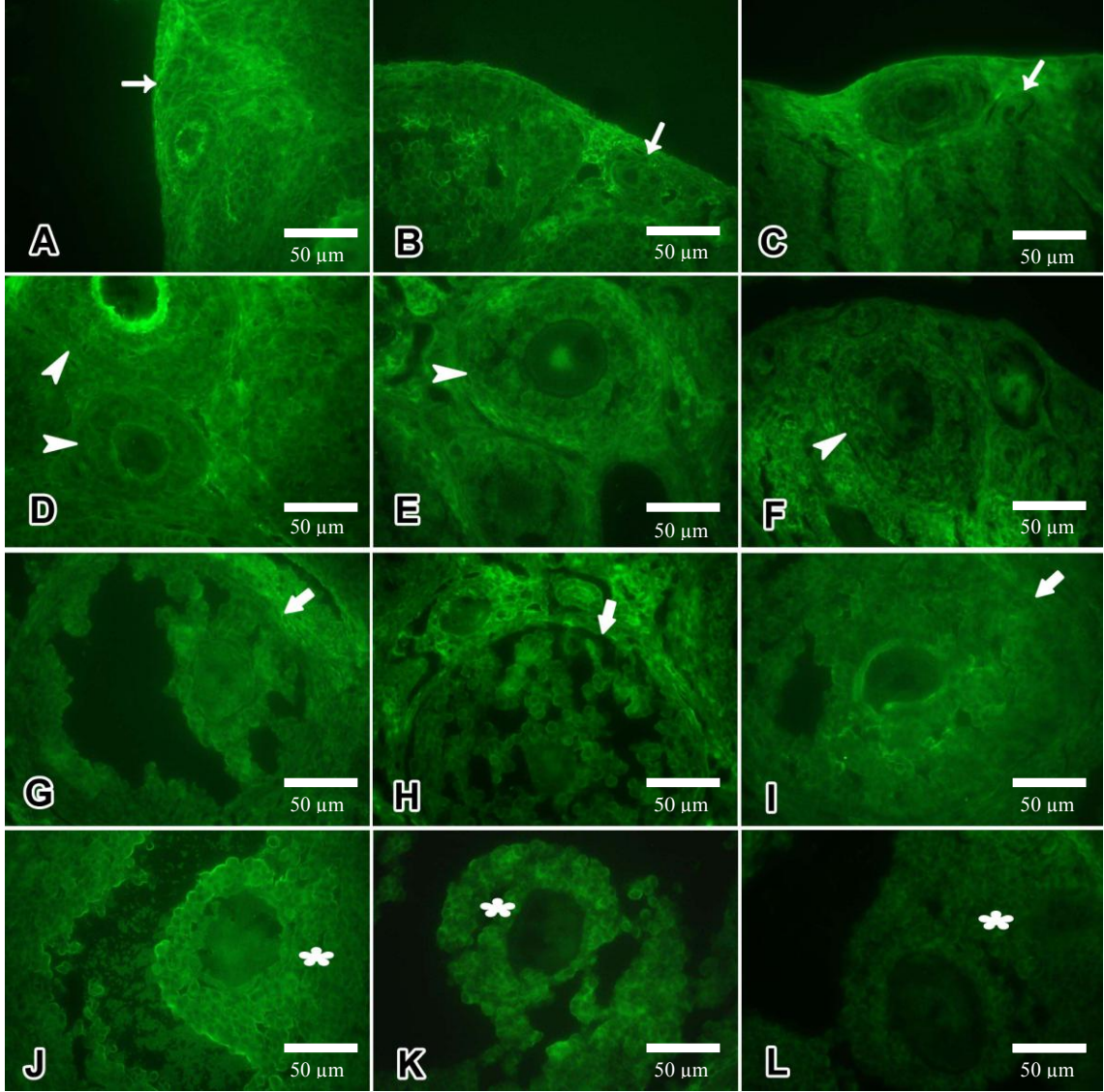
	Grup I (n=80)		Grup II (n=80)		Grup III (n=80)		p
	ort	s.sapma	ort	s.sapma	ort	s.sapma	
GDF-9	33.726	11.221	33.955	10.750	27.737	8.434	<0.001
BMP-15	31.122	11.052	29.997	10.721	24.856	7.036	<0.001

\*p<0.001

**Çizelge 4.3.** Folikülün farklı gelişim aşamalarında BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu

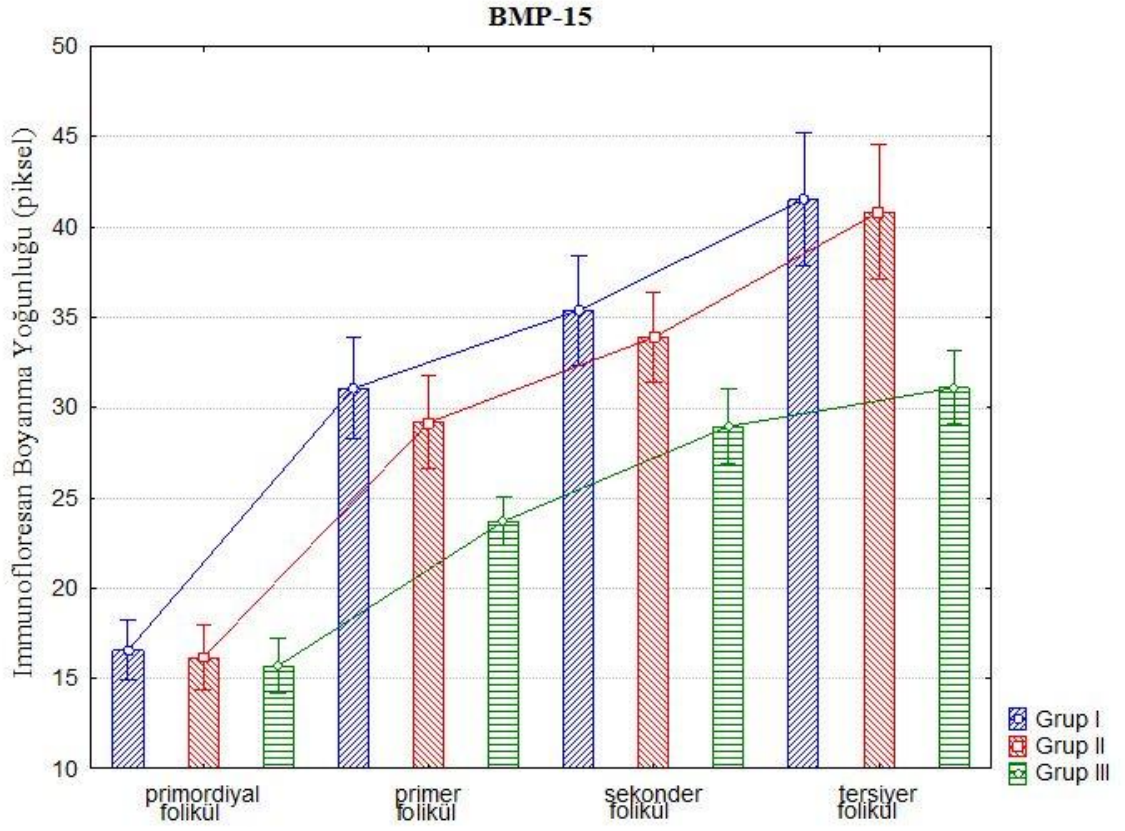
	Grup I		Grup II		Grup III		p
	ort	s.sapma	ort	s.sapma	ort	s.sapma	
Primordiyal folikül	16.554	3.518	16.138	3.804	15.695	3.241	0.745
Primer folikül	31.062	5.971	29.157	5.511	23.699*	2.899	<0.001
Sekonder folikül	35.370	6.485	33.876	5.235	28.944 *	4.476	0.001
Tersiyer folikül	41.501	7.877	40.820	7.979	31.086*	4.326	<0.001

\*p<0.001

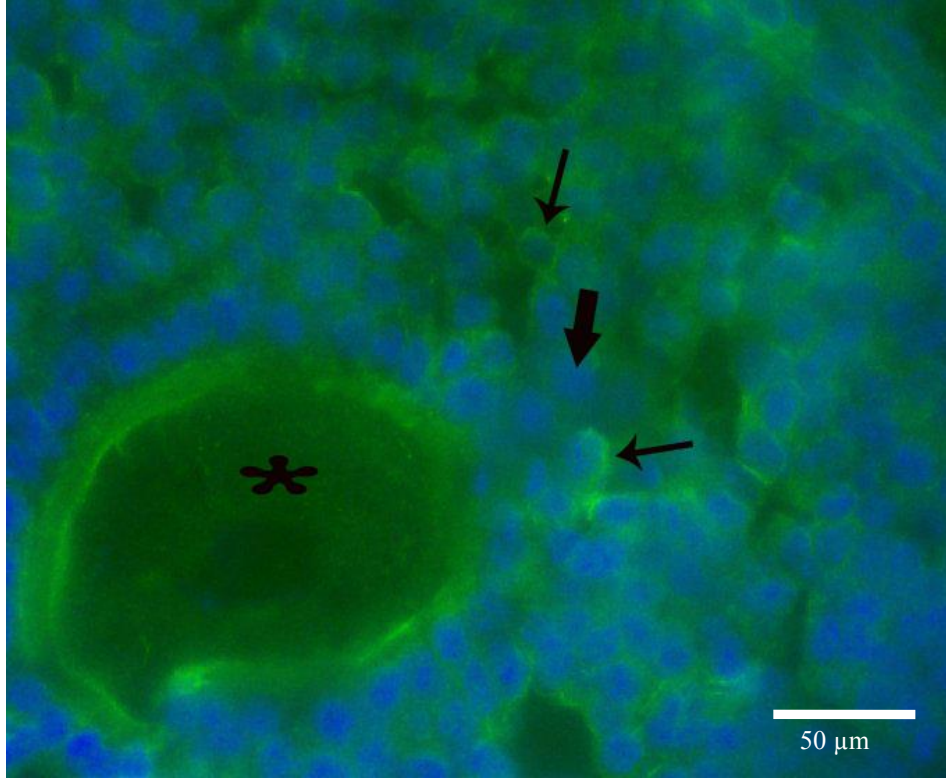


**Şekil 4.9.** BMP-15 immün işaretlenme yoğunluğu. Grup I'de primordiyal folikülde (ince ok) (A), multilaminar primer foliküllerde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında immün işaretlenme (ok başları) (D), sekonder folikülde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve oositte immün işaretlenme (kalın ok) (G), tersiyer folikülde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında ve oositte immün işaretlenme (asterisk) (J). Grup II'de primordiyal folikülde (ince ok) (B), multilaminar primer foliküllerde (ok başı) (E), sekonder folikülde (kalın ok) (H), ve tersiyer folikülde immün işaretlenme (asterisk) (K). Grup III'de primordiyal folikülde (ince ok) (C), multilaminar primer folikülde (ok başı) (F), sekonder folikülde (kalın ok) (I), tersiyer folikülde immün işaretlenme (asterisk) (L), (FITC x400).





**Şekil 4.10.** Foliküler gelişim aşamalarında BMP-15 immünofloresan boyanma yoğunluğunun grafiksel karşılaştırılması.



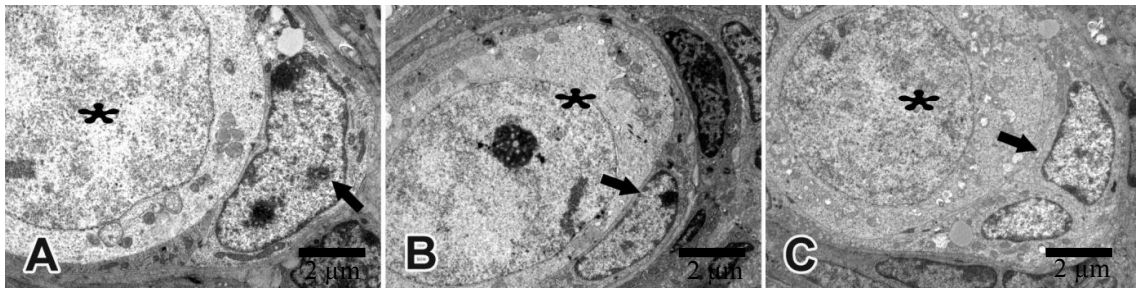
**Şekil 4.11.** BMP-15'in oosit sitoplazmasında ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince oklar) (FITC), granüloza hücre nükleusları (kalın ok) (DAPI), oosit sitoplazması (asterisk) (FITC), (x800).

#### 4.5. Elektron Mikroskopik Bulgular

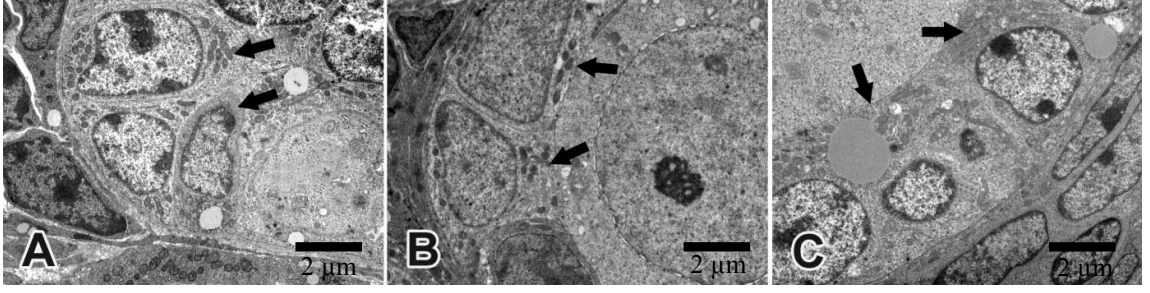
Grup I ve grup II'de benzer bulgular vardı. Bu gruplarda folikülogenezin farklı aşamalarındaki foliküllerin normal ultrastrüktürel yapıda olduğu görüldü. Primordiyal foliküllerde oosit ve pregranüloza hücreleri normaldi (sırasıyla Şekil 4.12.A, 4.12.B). Primer foliküllerde oosit çevresinde düzenli dizilimli normal yapıda granüloza hücreleri görüldü (sırasıyla Şekil 4.13.A, 4.13.B). Multilaminer primer foliküllerde granüloza hücreleri ve bunları çevreleyen teka hücreleri normal yapıdaydı (sırasıyla Şekil 4.14.A, 4.14.B). Bazı granüloza hücrelerinde birkaç tane lipid vakuolü görüldü (Şekil 4.14.A). Sekonder ve tersiyer folikül aşamasındaki foliküllerde, granüloza hücreleri ve bazal laminalarının normal yapıda olduğu saptandı (sırasıyla Şekil 4.15.A, 4.15.B). Teka hücreleri normal yapıda olmakla birlikte bazı teka hücrelerinde az miktarda lipid vakuolleri görüldü (sırasıyla Şekil 4.16.A, 4.16.B). Oositlerin yapısı ve ZP yapısı normaldi. ZP'de oosit ve granüloza hücrelerinin çok sayıda sitoplazmik uzantısı görüldü

(sırasıyla Şekil 4.17.A, 4.17.B). Foliküller çevresindeki stromal hücrelerin normal yapıda olduğu ve bunların sitoplazmalarında az miktarda lipid vakuolü olduğu gözlemlendi (sırasıyla Şekil 4.18.A, 4.18.B).

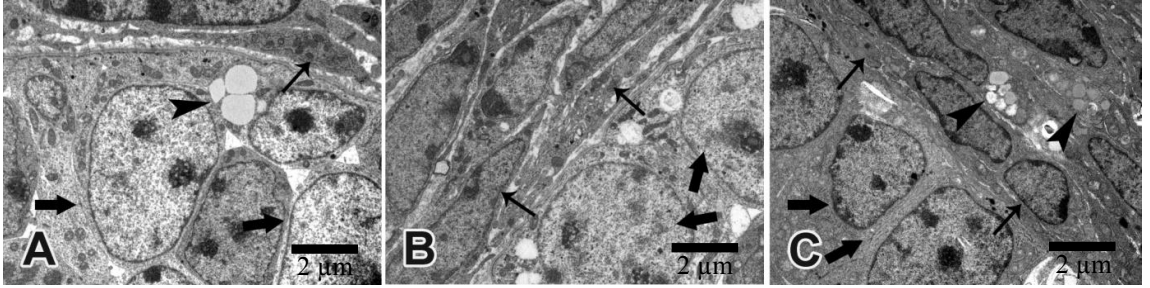
Grup III'de folikülogenezin erken aşamalarındaki foliküllerin (primordiyal ve unilaminar primer folikül) normal yapıda olduğu görüldü. Folikülü oluşturan oosit ve granüloza hücreleri normaldi (Şekil 4.12.C, 4.13.C, 4.14.C). Multilaminar primer foliküllerin bir kısmında granüloza hücre bazal membranında kalınlaşma ve ondülasyon gösteren düzensizlikler gözlenirken (Şekil 4.15.C ve 4.15.D), granüloza hücrelerinde artmış lipid vakuolleri ve mitokondriyonlarında dejenerasyon ve vakuoller bulunmaktaydı (Şekil 4.16.A, 4.16.B). Bazı multilaminar primer ve sekonder foliküllerde granüloza hücrelerinin apoptotik hücre parçacıklarının arttığı saptandı (Şekil 4.19.C). Ayrıca ovaryan stromada farklı aşamalarda çok sayıda foliküler kistik yapılara rastlandı. Kistlerin bir kısmında dejenere olmuş oosit parçacıkları görülmekteydi (Şekil 4.19.D). Bazı sekonder ve tersiyer foliküllerdeki teka hücrelerinde granüllü endoplazma retikulum genişlemeleri ve artmış lipid vakuolleri de bulunmaktaydı (Şekil 4.16.C). Ayrıca granüloza hücrelerinde, granüllü endoplazma retikulum ve golgi sisternalarında genişlemeler görüldü (Şekil 4.16.D). Oositleri çevreleyen ZP'nin diğer gruplardakine göre daha dens bir görünümde olduğu saptandı. ZP'de oosit ve granüloza hücrelerini sitoplazmik uzantılarının belirgin olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.17.C). Ovaryan stromal hücrelerde ise lipid vakuolleri artmıştı (Şekil 4.18.C).



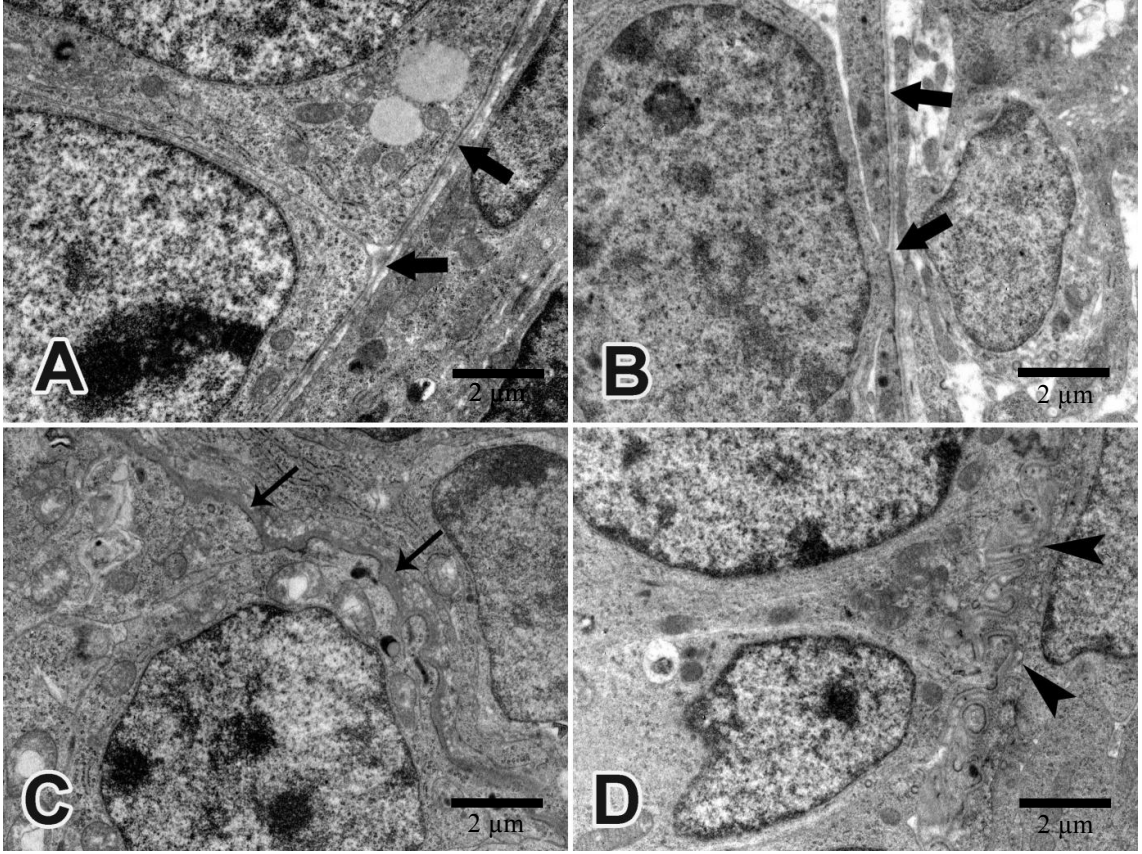
**Şekil 4.12.** Primordiyal foliküllerde normal yapıda oosit (asteriskler) ve pregranüloza hücreleri (oklar) Grup I (A), Grup II (B), Grup III (C) (Uranil asetat-kurşun sitrat x7500).



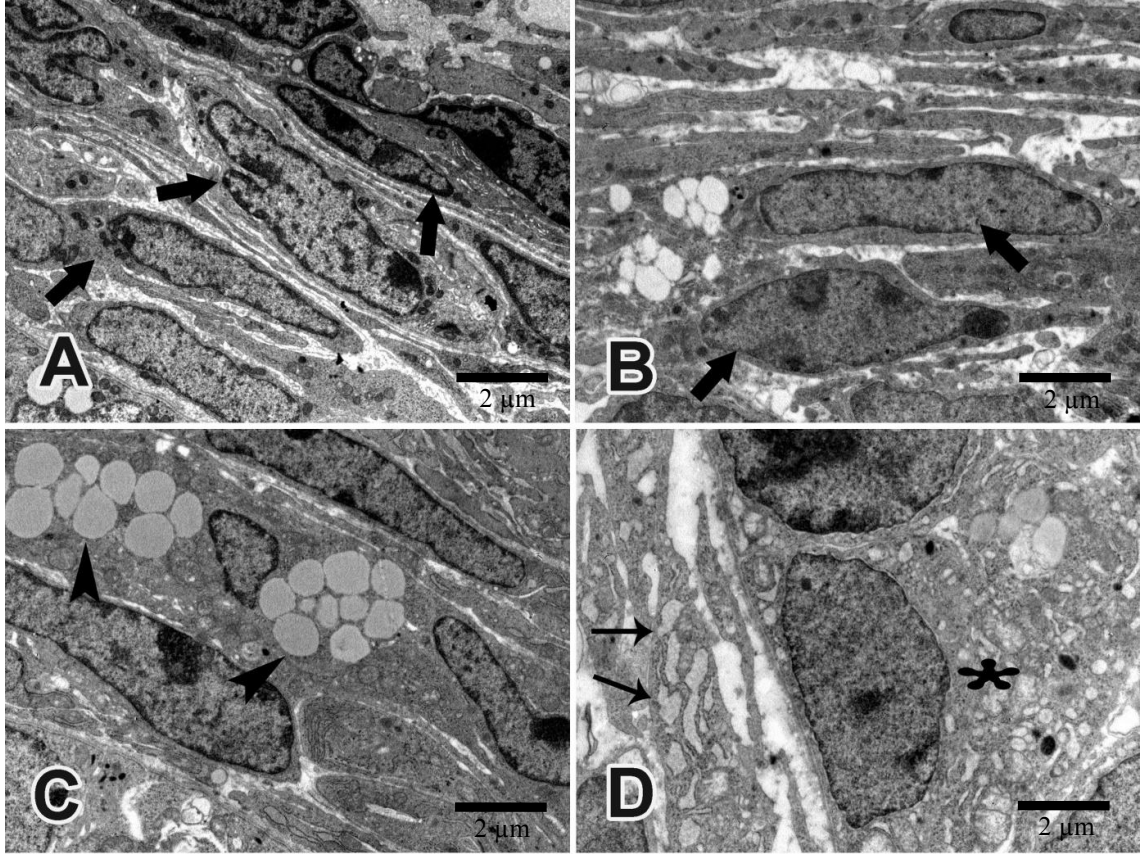
**Şekil 4.13.** Primer foliküllerde normal yapıda granüloza hücreleri (oklar) Grup I (A), Grup II (B), Grup III(C) (Uranil asetat-kurşun sitrat x7500).



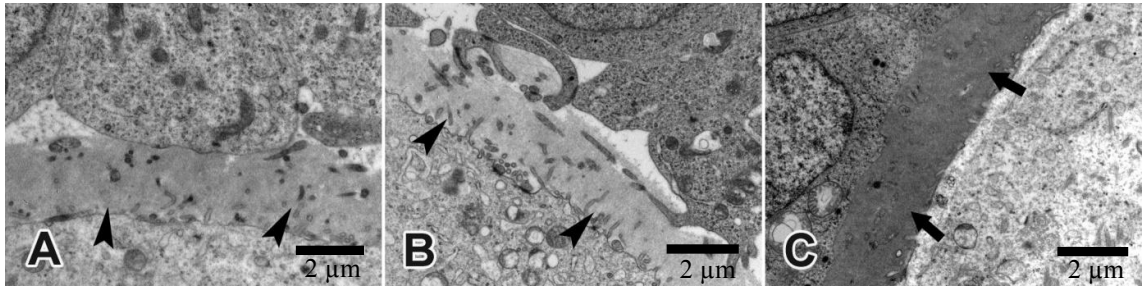
**Şekil 4.14.** Multilaminar primer foliküllerde normal yapıda granüloza hücreleri (kalın oklar) ve onu çevreleyen teka hücreleri (ince oklar), lipid vakuolleri (ok başları) Grup I (A), Grup II (B), Grup III (C) (Uranil asetat-kurşun sitrat x7500).



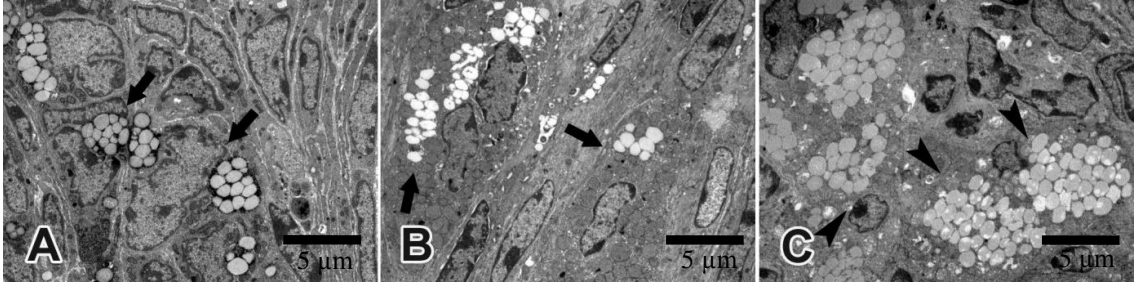
**Şekil 4.15.** Grup I (A) ve Grup II (B)'de normal yapıda granüloza hücre bazal membranı (kalın oklar). Grup III de granüloza hücre bazal membranında kalınlaşma (ince oklar) (C) ve ondülasyon gösteren düzensizlikler (ok başları) (D) (Uranil asetat-kurşun sitrat x15000).



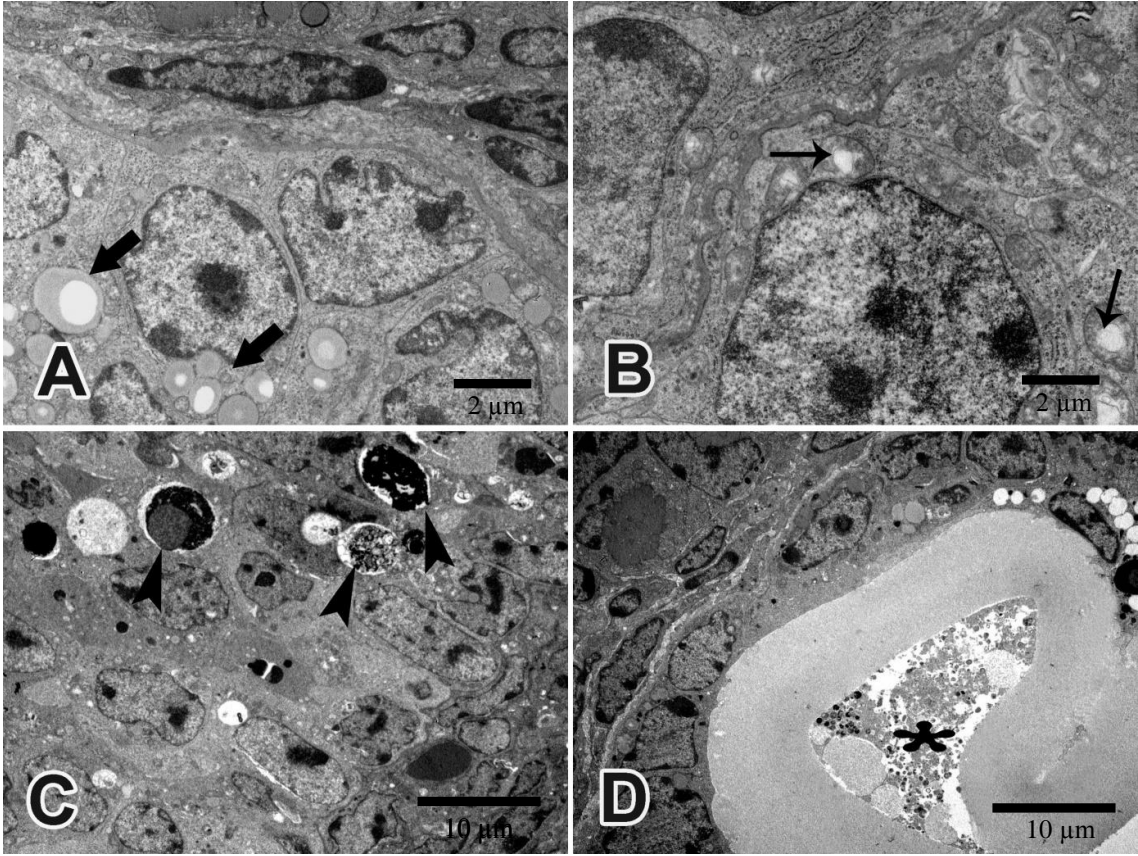
**Şekil 4.16.** Grup I (A) ve Grup II (B)'de sekonder foliküllerde normal yapıda teka hücreleri (kalın oklar). Grup III de sekonder foliküllerde teka hücrelerinde artmış lipid vakuolleri (ok başları) (C) ve granüllü endoplazma retikulum genişlemeleri (ince oklar) (D), granüloza hücrelerinde granüllü endoplazma retikulumu ve golgi sistenalarında genişleme (asterisk) (D) (Uranil asetat-kurşun sitrat A, B, C; x7500, D; 10000).



**Şekil 4.17.** Grup I (A) ve Grup II (B)'de normal yapıda ZP ve ZP'de çok sayıda oosit ve granüloza hücre sitoplazmik uzantısı (ok başları). Grup III (C)'de dens görünümde ZP, ZP'de belirgin olarak azalmış oosit ve granüloza hücre sitoplazmik uzantısı (kalın oklar) (Uranil asetat-kurşun sitrat x15000).



**Şekil 4.18.** Grup I (A) ve Grup II (B)'de sitoplazmalarında lipid vakuolları içeren normal yapıda ovaryan stromal hücreler (kalın oklar). Grup III (C) de sitoplazmalarında artmış miktarda lipid vakuolları içeren ovaryan stromal hücreler (ok başları) (Uranil asetat-kurşun sitrat x5000).



**Şekil 4.19.** Grup III'de preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde artmış lipid vakuolları (kalın oklar) (A) ve mitoknriyonlarında vakuolizasyon (ince oklar) (B), artmış miktarda apoptotik granüloza hücreleri (ok başları) (C), tek katlı granüloza hücreleri ile çevrelenmiş foliküler kistik yapı ve dejenere olmuş oosit parçacıkları (asterisk) (D) (Uranil asetat-kurşun sitrat A; x7500, B; 15000, C ve D; 3000).

## 5. TARTIŞMA

PKOS, %6-8 prevalansı ile reproduktif çağıdaki kadınlarda en sık gözlenen endokrinopatidir (18). Hastalığın patogeneziyle ilgili olarak, ovaryan hiperandrojenizm, insülin rezistansı ve hiperinsülinemi, intraovaryan parakrin sinyallerin değişmesiyle folikül gelişiminde bozulma gözlenmektedir (2). Foliküler gelişim duraksaması ile menstrual siklus düzensizliği, anovuluar subfertilite veya infertilite, küçük antral foliküllerin over periferinde birikimine bağlı olarak da overin polikistik morfolojisi belirgin olarak göze çarpmaktadır (3).

Yapılan çalışmalarda farklı büyüme faktörlerinin PKOS'da olası etki mekanizmaları açıklanmaya çalışılmış olmakla birlikte PKOS gelişiminde rol alan patolojik mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Histolojik olarak PKOS'da overde primordiyal folikül sayısının normal overdekinden farklı olmadığı, primer ve sekonder folikül sayılarının ise normal overdekinden anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (23). Ancak folikülogenezin hangi aşamalarında, folikül mikroçevresindeki otkrin-parakrin etkili hangi faktörlerin değişkenlik gösterdiği bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda GDF-9 ve BMP-15'in PKOS'da folikülogenezin hangi aşamalarında ekspresyonlarının değiştiğini göstermeyi planladık.

Hreinsson ve ark. (56) in vitro olarak GDF-9'un granüloza hücrelerinin çoğalmasını uyardığı, farklılaşmasını ise baskıladığı, bu nedenle folikül büyümesinde ve fonksiyonel folikül yaşamının devamında gerekli olduğunu göstermişlerdir. İn vitro olarak rekombinant fare GDF-9'u verilen yenidoğan sıçanlarda, overde primordiyal folikül büyümesini etkilemediği, ancak primer folikül büyümesini uyardığı gösterilmiştir (84). Başka bir çalışmada GDF-9'un in vitro olarak sıçanlarda, overde preantral folikül büyümesini ve teka hücre farklılaşmasını uyardığı raporlanmıştır (85).

Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda kontrol grubunda primordiyal folikül aşamasından tersiyer aşamaya kadar, oositte ve granüloza hücrelerinde, artan miktarlarda GDF-9 immünoreaktivitesini saptadık. Bu sonuç, GDF-9'un primordiyal folikül miktarını arttırdığı, primordiyal foliküllerin gelişim aşamalarının tamamlanmasında, granüloza hücre proliferasyonu ve oosit maturasyonun da etkili



olduğu görüşünü desteklemektedir. Zhao ve ark. (16) PKOS'da matür oositler ve kumulus hücrelerinde GDF-9 ekspresyonunun düşük olduğunu ve PKOS kumulus granüloza hücrelerinde GDF-9 ekspresyonunda azalmanın azalmış granüloza hücre çoğalmasıyla ilişkili olabileceğini öne srmşlerdir. Çalışmamızda kontrol grubunda primer folikülden tersiyer foliküle doğru GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğunun arttığını saptadık. Ancak PKOS grubunda, GDF-9 immün işaretlenme yoğunluğu kontrol grubundakilere göre azalmıştı. Bununla ilişkili olarak primer folikülden itibaren GDF-9 ekspresyonunun azalmasının sonraki aşamalarda granüloza hücre çoğalmasını, oosit maturasyonunu etkileyerek fonksiyonel folikül gelişimini bozduğu sonucunu dşndrmektedir.

GDF-9, granüloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunun uyarılmasını sağlayarak foliküler büyümeyi desteklemektedir (10). FSH'nın kendi reseptörüne bağlanması granüloza hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve östrojen üretimini uyarılmaktadır (14). Çalışmamızda PKOS grubunda, kontrol grubuna göre overde artmış miktarda preantral folikül görüldü. Bu artış GDF-9 ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olabilir. Preantral aşamada GDF-9 ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak granüloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunda azalma, folikül gelişiminde duraksama ve dominant folikül seçiminin bozulmasına neden olabilir. Nitekim yapılan çalışmalarda, GDF-9'un ovulasyon öncesi folikül büyümesinde önemli rolü olduğu ortaya konulmuş ve LH dalgalanması öncesi kumulus hücrelerinde sterol biyosentezi ve glikoliz gibi metabolik kaskatları desteklemek için gerekli olduğu öne sürülmüştür (51, 61).

BMP-15 folikülogenezde etkili büyüme faktörlerinden biridir. Primer foliküllerin pre-antral ve antral folikül evresine geçişinde önemli rol oynamaktadır (39). Ayrıca BMP-15'in folikülogenezin erken aşamalarında, granüloza hücrelerinde FSH uyarılmış steroidojenik fonksiyonları etkilediği gösterilmiştir (39). Literatürde BMP-15 geni baskılanmış farelerde ovulasyon bozukluğu ve foliklogezin ileri aşamalarında gelişim bozukluğuna bağlı olarak subfertilite gözlendiği raporlanmıştır (47). Wei ve ark. (15) alışmalarında, PKOS'lu hastalardan topladıkları immatür (GV ve MI) ve matür oositlerde (MII) BMP-15 mRNA düzeylerinin normal oositlere göre daha düşük düzeyde olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada, PKOS'da BMP-15 gen mutasyonlarının grldği ve bununla ilişkili olarak folikülogenezde duraksama, overde çok sayıda küçük antral foliküllerin birikimi ve birkaç tersiyer folikül gelişimi

bildirilmiştir (17). Bu çalışmayla paralel olarak Otsuka ve ark. (14) BMP-15 transgenik farelerde FSH reseptör mRNA ekspresyonunda azalma saptamışlar ve azalmış FSH reseptör sinyalinin özellikle primer folikülden sonraki aşamalarda foliküler gelişimi bozduğunu raporlamışlardır. Çalışmamızda PKOS grubunda overde artmış miktarda preantral folikül ve çok sayıda atretik folikül olduğunu gözledik. Buna ek olarak PKOS grubunda preantral aşamalarda foliküllerde kontrol grubuna göre BMP-15 ekspresyonlarının azaldığı görülmekteydi. Bu sonuç bize, PKOS'da BMP-15 ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olarak granüloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunun azaldığını ve preantral aşamadan antral aşamaya geçişteki azalmış FSH etkinliğinin nedeni olabileceğini düşündürmüştür.

Yapılan çalışmalarda PKOS'da foliküler hücrelerde ultrastrüktürel değişiklikler tanımlanmış olmakla birlikte bu değişikliklerin folikülogenezin hangi aşamalarında görüldüğü gösterilmemiştir. Çalışmamızda PKOS grubunda multilaminar foliküller ve sekonder foliküllerin çoğunda granüloza hücre bazal laminalarında kalınlaşma ve ondülasyon gösteren düzensizliğe rastladık. Bazal lamina düzensizliği gösteren granüloza hücrelerinde lipid vakuelleri de artmıştı. Irving-Roders ve ark. (86) çalışmalarında sağlıklı sığırlardan elde ettikleri preantral foliküllerin ve antral foliküllerin bazılarında granüloza hücre bazal laminalarında düzensizlikler gözlemişler ve bu folikülerde, oositlerde maturasyon yetersizliği olduğunu raporlamışlardır. Ayrıca bazal lamina düzensizliği gösteren foliküllerde granüloza hücre çoğalması ve antrum genişlemesinde yetersizlik, atrezi oranında artış olduğunu da bildirmişlerdir. Bazal laminadaki düzensizliğin, folikül mikroçevresindeki GDF-9 ve BMP-15 gibi faktörlerle ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Nitekim yapılan in vitro çalışmalarda PKOS'da kumulus granüloza hücrelerinde ve oositlerde GDF-9 ve BMP-15'in düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (15, 86). Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda in vivo olarak folikülogenezde ilk olarak primer folikülde GDF-9 ve BMP-15 düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığını saptadık. Bu sonuç bize primer folikülden itibaren GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonlarının azalmasının, özellikle bu aşamada granüloza fonksiyonunda ve yapısında değişikliğe neden olarak granüloza hücre bazal lamina yapısını değiştirdiğini düşündürmüştür. Bazal lamina tüm hücrelerde olduğu gibi granüloza hücrelerinde de çoğalma, farklılaşma ve çevre hücrelerle moleküler etkileşimde önemli role sahiptir. Granüloza hücre bazal laminalarında gözlenen yapısal değişiklikler,

granüloza hücreleriyle mikroçevre etkileşimini bozarak primer folikülden sonraki aşamalarda foliküler gelişimin bozulmasına PKOS'daki foliküler patolojik süreçlerin gelişmesine neden olabilir.

GDF-9'un teka hücrelerinde LH ile uyarılmış androjen sentezini baskılayarak, BMP-15'in ise granüloza hücrelerinde FSH ile uyarılmış androjen sentezini azaltarak normal foliküler gelişimde prematür luteinizasyonun önlediği bildirilmiştir (14, 62). Çalışmamızda ovaryan stromal hücrelerde ve pre-antral, antral folikül çevresindeki teka hücrelerinde luteinizasyonun arttığını gördük. Bunun PKOS'da azalmış GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonuna bağlı olarak artmış LH ve FSH aracılı steroidogenez ile ilişkili olabileceğini düşündük.

GDF-9 ve BMP-15 anti-apoptotik etkilere sahiptir. Antral aşamaya geçişte GDF-9'un granüloza hücre apoptozunu ve foliküler atreziyi baskıladığı bildirilmiştir (14). BMP-15'in ise kumulüs hücre apoptozunu azalttığı görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada sığır overlerinde COC'den oositin çıkarılmasıyla kumulüs hücrelerinde apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir. BMP-15'in ovulasyona kadar COC'nin apoptoz sıklığının azalmasına katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (63). Bu çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak çalışmamızda PKOS grubunda erken foliküler dönemlerde apoptotik granüloza hücrelerinin arttığını saptadık. PKOS'da özellikle erken foliküler dönemlerde bu faktörlerin azalmasının folikülün gelişim süreci yerine atretik süreçlere girmesine neden olduğu ve apoptotik süreçlerin aktive olabileceği kanısına varmamıza neden olmuştur. Ancak PKOS'da GDF-9 ve BMP-15 ile apoptoz ilişkisini açıklayacak ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda PKOS grubunda antral foliküllerin bazılarında oositi çevreleyen ZP'nin dens bir görünümde olduğu görüldü. Wei ve ark. (15) PKOS'da GDF-9 ve BMP-15'in yetersiz ekspresyonuna bağlı olarak, oositte nükleer ve sitoplazmik maturasyonun yetersiz olduğu, fertilizasyon ve gebelik oranlarının da düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bununla ilişkili olarak folikülogenezin erken aşamalarında GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonunun azalmasının, oosit maturasyonu etkileyerek fonksiyonel ZP oluşumunu bozduğu ve fertilizasyon kusuru ortaya çıkarabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda in vivo olarak, PKOS'da folikülogenezin primer folikül aşamasından itibaren GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonlarının azalmasının, folikül gelişim bozukluğu, yetersiz oosit maturasyonuna neden olarak subfertilite veya

infertilitenin ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca folikül gelişimi ve oosit mayotik maturasyonu süresince GDF-9 ve BMP-15'in rolü ile ilgili daha fazla çalışmayla, PKOS patogenezindeki mekanizmaları düzenleyen bu faktörler daha iyi anlaşılacaktır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda deneysel PKOS oluşturulmuş fare modelinde, overde GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonlarının kontrol grubuna göre azalmış olduğu bulunmuştur. PKOS fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamış bir endokrinopati olmakla birlikte, hastalığın ortaya çıkmasında birçok moleküler yolakların etkili olduğu raporlanmıştır. Bu çalışma sonucunda PKOS'un ortaya çıkmasında GDF-9 ve BMP-15 azalmasının özellikle foliküler mikroçevredeki otokrin-parakrin etkileşimlerin bozulmasına neden olan önemli faktörler olduğu sonucuna varılmıştır.
2. PKOS'da folikülogenezin primer folikül aşamasından itibaren GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonunun azalması, foliküler gelişim duraksamasına, folikül atrezisinin artmasına ve ovulasyona girecek antral folikül yetersizliğine neden olmaktadır. Bu nedenle PKOS'da normal folikülogenez sürecinin gerçekleşebilmesinde lokal veya sistemik GDF-9 ve BMP-15 uygulamasının etkili olacağını ve bununla ilgili klinik çalışmaların gerekli olduğunu düşündük.
3. Çalışmamızda ovaryan stromal hücrelerde ve pre-antral, antral folikül çevresindeki teka hücrelerinde luteinizasyonun arttığını gördük. Bunun PKOS'da azalmış GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonuna bağlı olarak artmış LH ve FSH aracılı steroidogenez ile ilişkili olabileceğini düşündük.
4. Granüloza hücrelerinde apoptotik hücre parçacıklarının arttığı saptandı. Stromada farklı aşamalardaki foliküler kistik yapılarda dejenere olmuş oosit parçacıkları görüldü. PKOS'da özellikle erken foliküler dönemlerde bu faktörlerin azalmasının foliküllerin atretik süreçlere girmesine ve apoptotik yolakların aktivasyonuna neden olduğu düşünüldü. Ancak PKOS'da GDF-9 ve BMP-15 ile apoptoz ilişkisini açıklayacak hücreler arası sinyal mekanizmaları ile ilgili daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.
5. PKOS'da folikülogenezin erken aşamalarında GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonunun azalmasının, oosit maturasyonunu ve fonksiyonunda yetersizliğe bağlı olarak ZP yapısını bozduğu sonucuna varıldı. Ayrıca ZP'de granüloza hücreleri ve oosit sitoplazmik uzantılarında gözlenen azalmanın, hücreler arası

etikileşimi olumsuz yönde etkilediği düşünöldü. Bu sonuç PKOS'lu kadınlarda yapısı bozulmuş ZP'nin fertilizasyon kusuru oluşturarak infertiliteye neden olabileceğini de düşöndürmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Lakhani K, Seifalian AM, Atiomo WU, Hardiman P.** Polycystic ovaries. *The British Journal of Radiology*, **2002**; 75:9-16.
2. **Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R.** Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Endocrinology*, **2011**; 7:219-231.
3. **Maciel GAR, Baracat CE, Benda JA, Markham SM, Krista Hensinger K, Chang RJ, Erickson GF.** Stockpiling of Transitional and Classic Primary Follicles in Ovaries of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **2004**; 89(11):5321-5327.
4. **Moore KL, Persaud TVN. Ed. Dalçık H, Yıldırım M.** *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. 8. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2009**: 20-23.
5. **Kidder Gerald M, Vanderhyden Barbara C.** Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **2010**; 88(4):399-413.
6. **Öktem Ö, Urman B.** Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction*, **2010**; 25(12):2944–2954.
7. **Hillier SG.** Paracrine support of ovarian stimulation. *Molecular Human Reproduction*, **2009**; 15(12): 843-850.
8. **Öktem Ö, Oktay K.** The Ovary: Anatomy and Function throughout Human Life. *New York Academy of Sciences*, **2008**; 1127:1-9.
9. **Knight PG, Glistler C.** TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, **2006**; 132(2):191-206.
10. **Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ.** Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granuloza cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction*, **2000**; 62(2):370-377.

11. **Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA.** Characterization of Ovarian Follicular Wave Dynamics in Women. *Biology of Reproduction*, **2003**; 69:1023-1031.
  
12. **Otsuka F, Shimasak S.** A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *PNAS*, **2002**; 99(12): 8060-8065.
  
13. **Gilchrist RB, Ritter LJ, Cranfield M, Jeffery LA, Amato F, Scott SJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Lankinen H, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O.** Immunoneutralization of Growth Differentiation Factor 9 Reveals It Partially Accounts for Mouse Oocyte Mitogenic Activity. *Biology Of Reproduction*, **2004**; 71:732-739.
  
14. **Otsuka F, McTavish K, Shimasaki S.** Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Molecular Reproduction Development*, **2011**; 78(1): 9-21.
  
15. **Wei LN, Liang XY, Fang C, Zhang MF.** Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **2011**; 96:464-468.
  
16. **Zhao SY, Qiao J, Chen YJ, Liu P, Li J, Yan J.** Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **2010**;94:261-267.
  
17. **Liu J, Wang B, Wei Z, Zhou P, Zu Y, Zhou S, Wen Q, Wang J, Cao Y, Ma X.** Mutational analysis of human bone morphogenetic protein 15 in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, **2011**; 60(11):1511-1514.
  
18. **Franks S, Stark J, Hardy K.** Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*, **2008**; 14(4):367-378.
  
19. **Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH.** Polycystic Ovary Syndrome and Oocyte Developmental Competence. *Obstetrics Gynecology Survey*, **2008**; 63(1): 39-48.
  
20. **Qiao J, Feng HL.** Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Human Reproduction Update*, **2011**; 17(1):17-33.
  
21. **Schriock E, Martin MC, Jaffe RB.** Polycystic Ovarian Disease. *The Western Journal Medicine*, **1985**; 142:519-522.



22. **Jonard S, Dewailly D.** The follicular excess in polycystic ovaries, due to intraovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Human Reproduction Update*, **2004**; 10(2):107-117.
23. **Van der Spuy ZM, Dyer SJ.** The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *Best Practice Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, **2004**; 18(5):755–771.
24. **Sadler TW.** *Langman Medikal Embriyoloji*. 9. Baskı, **2005**: Bölüm 1.
25. Erişim :<http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>. Erişim tarihi: 18.11.2012.
26. **Motta PM, Makabe S, Nottola SA.** The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction*, **1997**; 3(3):281-295.
27. **Dumesic DA, Abbott DH.** Implications of Polycystic Ovary Syndrome (PKOS) on Oocyte Development. *Seminars in Reproductive Medicine*, **2008**; 26(1): 53-61.
28. **Richards JS.** Perspective: The Ovarian Follicle-A Perspective in 2001. *Endocrinology*, **2001**; 142(6): 2184.
29. **Fair T.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, **2003**; 78(3-4):203-216.
30. **Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordiyal follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, **2003**; 78(3-4): 135-163.
31. **Salha O, Abusheikha N, Sharma V.** Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. *Human Reproduction Update*, **1998**; 4(6):816-832.
32. **Ross HM, Kaye GI, Pawlina W.** *Histology: A Text and Atlas*. 4<sup>th</sup> Ed., USA: Lippincott Williams & Wilkins, **2003**; 726-757.
33. **Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL.** The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, **2008**; 136(6):703-15.
34. **Speroff L, Glass RH, Kase NG.** *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, **1999**.

35. **Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF.** The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocrine*, **2004**; 25(1):72-101.
36. **Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura SI, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF.** A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *PNAS*, **1999**; 96:7282-7287.
37. **Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B.** *Gametler (Sperm/Oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim*. 1. Baskı, Serono Yayınları, **2000-2001**.
38. **Otsuka F, Moore R, Iemura S; Ueno N, Shimasaki S.** Follistatin Inhibits the Function of the Oocyte-Derived Factor BMP-15. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2001**; 289:961-966.
39. **Otsuka F, Yao Z, Lee ,T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S.** Bone Morphogenetic Protein-15: Identification Of Target Cells And Biological Functions. *The Journal of Biological Chemistry*, **2000**; 275(50): 39523-39528.
40. **Öktem Ö, Urman B.** Reprodüktif Yaşam Siklusu: Folikülogenez ve Menstruasyon. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, **2012**; 9(1):1-24.
41. **Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N.** Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, **2006**;147(5):2280-2286.
42. **Anwar A, Moussa MD.** In vitro maturation of oocytes. OBGYN.net Advertisement, **2002**.
43. **Heikinheimo O, Gibbons WE.** The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Reproduction*, **1998**; 4(8):745-756.
44. **Knight GP, Glistler C.** Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science*, **2003**; 78:165-183.
45. **Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O.** Human Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) and Its Novel Homolog GDF-9B Are Expressed in Oocytes during Early Folliculogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **1999**; 84(8): 2744-2750.

46. **Dumesic DA, Abbott DH.** Implications of Polycystic Ovary Syndrome (PKOS) on Oocyte Development. *Seminars in Reproductive Medicine*, **2008**; 26(1):53-61.
47. **Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF.** High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development *Human Reproduction*, **2007**; 22(6):1526-1531.
48. **Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M.** Interaction of Extracellular Matrix and Activin-A in the Initiation of Follicle Growth in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction*, **2000**; 63:457-461.
49. **Juengel JL, McNatty KP.** The role of proteins of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction*, **2005**; 11(2):144-161.
50. **Saragüeta PE, Lanuza GM, Baranao JL.** Autocrine Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  on Rat Granuloza Cell Proliferation. *Biology of Reproduction*, **2002**; 66:1862-1868.
51. **Su1 YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit1 JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ.** Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, **2008**; 135:111-121.
52. **Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB.** Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*, **2006**; 296:514-521.
53. **Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, Lane M.** Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Human Reproduction*, **2008**; 23(1):67-73.
54. **Mazerbourg S, Hsueh AJW.** Growth differentiation factor-9 signaling in the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2003**; 202:31-36.
55. **Thomas FH, Vanderhyden BC.** Oocyte-granuloza cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2006**; 4:1-8.
56. **Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O.** Growth Differentiation Factor-9 Promotes the Growth, Development, and Survival of Human Ovarian Follicles in Organ Culture. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **2002**; 87(1):316-321.

57. **Carabatsos MJ, Evlin J, Matzuk MM, Albertini DF.** Characterization of Oocyte and Follicle Development in Growth Differentiation Factor-9-Deficient Mice. *Developmental Biology*, **1998**; 204:373-384.
58. **Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM.** Molecular Characterization of the Follicle Defects in the Growth Differentiation Factor 9 Deficient Ovary. *Molecular Endocrinology*, 3(6):1018-1034.
59. **Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ.** Recombinant Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) Enhances Growth and Differentiation of Cultured Early Ovarian Follicles. *Endocrinology*, **1999**; 140(3):1236-1244.
60. **Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, Kotsuji F, Tsang BK.** Growth Differentiation Factor 9 Promotes Rat Preantral Follicle Growth by Up-Regulating Follicular Androgen Biosynthesis. *Endocrinology*, **2009**; 50(6):2740-2748.
61. **Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ.** Oocyte control o between oocytes and companion granuloza cells: energy metabolism. *Developmental Biology*, **2005**; 279(1):20-30.
62. **Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S.** Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276(14):11387-11392.
63. **Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB.** Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, **2005**; 118( 22):5257-5268.
64. **Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S.** A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *PNAS*, **2006**; 103(28):10678-10683.
65. **Su YQ, Sugiura K, Li Q, Wigglesworth K, Matzuk MM, Eppig JJ.** Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. *Molecular Endocrinology*, **2010**; 24(6):1230-1239.
66. **Dunaif A, Chang RJ, Franks S, Legro RS.** *Polycystic Ovary Syndrome*. *Contemporary Endocrinology*, **2008**:1-19.
67. **Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S.** Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*, 2003;362(9389):1017-1021.

68. **Maciel GAR, Baracat CE, Benda JA, Markham SM, Krista Hensinger K, Chang RJ, Erickson GF.** Stockpiling of Transitional and Classic Primary Follicles in Ovaries of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **2004**; 89(11):5321-5327.
69. **Elvin JA, Yan C, Matzuk MM.** Oocyte-expressed TGF- $\beta$  superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2000**; 159(1-2):1-5.
70. **Teixeira FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF.** Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **2002**; 87:1337-1344.
71. **Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S.** Premature Response to Luteinizing Hormone of Granulosa Cells from Anovulatory Women with Polycystic Ovary Syndrome: Relevance to Mechanism of Anovulation. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **1998**; 83(11):3984-3991.
72. **Ludwig M, Finas DF, Al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O.** Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Human Reproduction*, **1999**; 14(2):354-358.
73. **Kurzawa R, Ciepiela P, Baczkowski T, Safranow K, Brelik P.** Comparison of embryological and clinical outcome in GnRH antagonist vs. GnRH agonist protocols for in vitro fertilization in PKOS non-obese patients. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, **2008**; 25:365-374.
74. **Sengoku K, Tamate K, Takuma N, Yoshida T, Goishi K, Ishikawa M.** The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction*, **1997**;12(3):474-477.
75. **Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D.** Elevated Serum Level of Anti-Mullerian Hormone in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: Relationship to the Ovarian Follicle Excess and to the Follicular Arrest. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **2003**;88(12):5957-62.
76. **Das M, Gillott DJ, Saridogan E, Djahanbakhch O.** Anti-Mullerian hormone is increased in follicular fluid from unstimulated ovaries in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, **2008**;23(9):2122-2126.
77. **Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Elia E, Di GG, Gonzalez C, Motta AB.** Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*, **2006**; 131:591-602.
78. **Zhu JQ, Zhu L, Liang XW, Xing FQ, Schatten H, Sun QY.** Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction*, **2010**; 16(4): 260-266.
79. **Kanter M, Metin MS, Ömürlü İK.** Balb/C Türü Dişi Farelerde Uniseksüel Gruplamannın Östrus Siklusu Üzerine Etkileri. *Yeni Tıp Dergisi*, **2010**; 7:235-239.

80. **Solano ME, Sander VA, Ho H, Motta AB, Arck PC.** Systemic inflammation, cellular influx and up-regulation of ovarian VCAM-1 expression in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Journal of Reproductive Immunology*, **2011**; 92(1-2):33-44.
81. **Prophet EB, Mills B, arrington JB, Sobin LH.** *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology. Washington: American Registry of Pathology, **1992**.
82. **Demir R.** *Histolojik Boyama Teknikleri*. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, **2001**:296-298.
83. **Hayat MA.** *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications*. 4th Ed., Cambridge university, **2000**:85-130.
84. **Wang C, Roy SK.** Expression of Growth Differentiation Factor 9 in the Oocytes Is Essential for the Development of Primordiyal Follicles in the Hamster Ovary. *Endocrinology*, **2006**; 147(4):1725-1734.
85. **Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victorin E.** A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*, **2007**; 148(8):3781-3791.
86. **Irving-Rodgers HF, Morris S, Collett RA, Peura TT, Davy M, Thompson JG, Mason HD, Rodgers RJ.** Phenotypes of the ovarian follicular basal lamina predict developmental competence of oocytes. *Human Reproduction*, **2009**; 24(4): 936-944.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında ADANA’da doğdum. İlkokulu ve ortaokulu Hayriye Kemal Kusun ilköğretim okulunda okudum. Lise eğitimimi Abdulkadir Paksoy Lisesinde tamamladım.

2010 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2011 yılı ocak ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.