



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN  
POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA VİTAMİN D'NİN  
OVARYUM İNFLAMASYONUNA ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Seçil TAN**

**Temmuz 2017  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN  
POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA VİTAMİN D’NİN  
OVARYUM İNFLAMASYONUNA ETKİSİ**

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Seçil TAN**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE**

**Denizli, 2017**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Seçin TAN tarafından Prof. Dr. Gülçin METE yönetiminde hazırlanan "Sıçanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Polikistik Over Sendromunda Vitamin D' nin Ovaryum İnflamasyonuna Etkisi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Prof. Dr. Güven ERBİL.....  
Dokuz Eylül Üniversitesi



Üye(DANIŞMAN):

Prof. Dr. Gülçin METE.....  
Pamukkale Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Hülya ÇETİN.....  
Pamukkale Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03.10.2017  
Tarih ve ...1253...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA

Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Seçil TAN

İmza :



**ÖZET****SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA VİTAMİN D'NİN OVARYUM İNFLAMASYONUNA ETKİSİ**

Seçil TAN

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Haziran 2017, 88 Sayfa

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarda yaygın bir endokrin bozukluktur. Kronik anovulasyon, infertilite, hiperandrojenizm, hirsutizm gibi tanı kriterlerinin yanında insülin direnci, obezite, endotel disfonksiyonu ve metabolik sendrom gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda PKOS'la birlikte seyreden hastalıklar ve PKOS arasındaki ilişkinin kronik inflamasyon ve D vitamini eksikliği olabileceği düşünülmüştür. Ancak D vitamininin PKOS'la ilişkisini araştıran çalışmaların sonuçları çelişkilidir ve inflamasyon durumunda arttığı düşünülen sitokinler IL-1 beta IL-6 ve TNF-alfa'nın ovaryum dokusunda nasıl etki gösterdiğini açıklayan immünohistokimya çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada sıçanlarda dehidroepiandrosteron (DHEA) ile deneysel PKOS oluşturularak, vitamin D 'nin ovaryum dokusunda proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 beta, IL-6 ve TNF-alfa üzerine kısa ve orta dönemde etkisine bakılmıştır. D vitamininin önce uygulanmasıyla (20 gün boyunca ve DHEA enjeksiyonundan 2 saat önce), sonra uygulamasının (ilk 20 gün boyunca sadece DHEA enjeksiyonu, 20. günden sonra 20 gün boyunca DHEA'dan 2 saat önce D vitamini enjeksiyonu) DHEA ile indüklenmiş deneysel PKOS modeli oluşturulan sıçanlarda etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. D vitamininin kısa dönemde ovaryumda IL-1 beta IL-6 ve TNF-alfa belirteçlerine anlamlı bir etkisi olmadığı fakat kistik folikül sayısını azalttığı görülmüştür. Bunun yanında DHEA'ya daha uzun süre maruz kalan grupta IL-6, IL-1 beta ve TNF-alfa ekspresyonlarında artış görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Polikistik over sendromu, Vitamin D, inflamasyon, immünohistokimya, ovaryum

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2015SBE005).**

**ABSTRACT****THE EFFECT OF VITAMIN D ON OVARIAN INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL  
POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME IN RATS**

TAN, Seçil

M.Sc. Thesis in Histology and Embryology

Supervisor: Prof. Gülçin ABBAN METE (PhD)

Jun 2017, 88 Pages

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder in women of reproductive age. In addition to diagnostic criteria such as chronic anovulation, infertility, hyperandrogenism, hirsutism; it is associated with diseases such as insulin resistance, obesity, endothelial dysfunction and metabolic syndrome. In recent years, the relationship between PCOS-associated diseases and PCOS has been thought to be chronic inflammation and vitamin D deficiency. However, the results of studies investigating the association of vitamin D with PCOS are contradictory, and immunohistochemical studies have not been found to explain how the cytokines IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha, which are thought to increase in the case of inflammation, affect the ovarian tissue. In this study, short-time and mid-term effects of vitamin D on IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha in the ovary were investigated in dehydroepiandrosterone-induced PCOS rat model. We investigated whether pre-administration (daily from 2 hours before PCOS induction) and post-administration (DHEA injection daily for 20 consecutive days and 20 days after the first injection of DHEA, daily from 2 hours before DHEA injection) of vitamin D could have effect dehydroepiandrosterone-induced PCOS rat model. Vitamin D has not been shown to have a significant effect on the IL-1 beta IL-6 and TNF-alpha markers in the short-term in the ovary, but it has been shown to reduce the number of cystic follicles. However, increased expression of IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha was observed in the longer exposure group to DHEA.

**Keywords** : Polycystic ovary syndrome, vitamin D, inflammation, immunohistochemistry, ovary

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects**

**Coordination Unit through project numbers 2015SBE005.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yanımda olan, tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında ve tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE' ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın ve deneylerimin yürütülmesi sırasında laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı hocalarına, tez çalışmamın her aşamasında tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan, deneylerimde yardımlarını esirgemeyen Uzm Dr. Nazlı ÇİL'e ve Arş. Gör. Semih Tan'a tezimin deney aşamasında her türlü imkanı sağlayan Veteriner Hekim Barbaros ŞAHİN' e ve yardımları için Gül Neşet'e, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve emeği geçen herkese ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

<b>ÖZET .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>VII</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>X</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>XI</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Amaç .....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....</b>	<b>3</b>
2.1. Ovaryum Gelişimi.....	3
2.2. Ovaryum Histolojisi .....	4
2.2.1. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi .....	4
2.3. Polikistik Over Sendromu .....	6
2.3.1. Tanımı ve tarihçesi.....	6
2.3.2. Tanı Kriterleri .....	7
2.3.3. Klinik Bulgular .....	8
2.3.4. Laboratuvar bulguları .....	9
2.3.5. Histopatolojisi.....	10
2.3.6. Fiziopatolojisi .....	11
2.3.6.1. Gonadotropin sekresyon bozuklukları.....	11
2.3.6.2. Steroidogenez değişiklikleri .....	12
2.3.6.3. İnsülin etki ve salınım bozuklukları .....	12
2.3.6.4. Genetik faktörler .....	14
2.3.7. Uzun Dönemde Metabolik Etkileri .....	14
2.3.7.1. Obezite ve dislipidemi.....	15
2.3.7.2. Kanser.....	15
2.3.7.3. Kardiyovasküler hastalık ve metabolik sendrom .....	17
2.4. Vitamin D ve Polikistik Over Sendromu .....	18
2.5. İnflamasyon ve Polikistik Over Sendromu .....	21
2.6. Tümör Nekrosis Faktör-Alfa .....	22
2.7. İnterlökin 6 .....	24



2.8.	İnterlökin-1 Beta.....	25
2.9.	Hipotez.....	25
<b>3.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>26</b>
3.1.	Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Hayvanlarının Bakımı .....	26
3.2.	Deney Gruplarının Ayrılması ve Deneysel PKOS Oluşturma İşlemi .....	26
3.3.	Vajinal Smear Örneklerinin Alınması ve Menstrual Siklus Evrelerinin Belirlenmesi ..	27
3.4.	Dokuların Hazırlanması ve Kesitlerin Alınması .....	28
3.5.	Fiksatif Çözelti Hazırlanması.....	28
3.6.	İmmunohistokimyasal boyama .....	29
3.8.	c-DNA sentezi .....	32
3.9.	Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR) .....	32
3.10.	Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi .....	33
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
4.1.	Hematoksilen Eozin Boyama .....	34
4.2.	İmmunohistokimyasal Bulgular.....	39
4.3.	Real Time PCR Bulguları .....	50
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ.....</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>76</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 4.1</b> Grup 1 ovaryum HE boyama sonuçları:.....	35
<b>Şekil 4.2</b> Grup 2 ovaryum HE boyama sonuçları:.....	36
<b>Şekil 4.3</b> Grup 2 ovaryum HE boyama sonuçları:.....	36
<b>Şekil 4.4</b> Grup 3 ovaryum HE boyama sonuçları:.....	37
<b>Şekil 4.5</b> Grup 4 ovaryum HE boyama sonuçları:.....	37
<b>Şekil 4.6</b> Grup 5 ovaryum HE boyama sonuçları:.....	38
<b>Şekil 4.7</b> Grupların primordiyal folikül sayılarına göre karşılaştırılması:.....	38
<b>Şekil 4.8</b> Grupların primer folikül sayılarına göre karşılaştırılması:.....	38
<b>Şekil 4.9</b> Grupların sekonder folikül sayılarına göre karşılaştırılması:.....	39
<b>Şekil 4.10</b> Grupların tersiyer folikül sayılarına göre karşılaştırılması:.....	39
<b>Şekil 4.11</b> Grupların kistik folikül sayılarına göre karşılaştırılması:.....	39
<b>Şekil 4.12</b> Grup 1 ovaryum IL-1b IHCp sonuçları:.....	41
<b>Şekil 4.13</b> Grup 1 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları:.....	41
<b>Şekil 4.14</b> Grup 1 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları.....	41
<b>Şekil 4.15</b> Grup 2 ovaryum IL-1b IHCp sonuçları.....	42
<b>Şekil 4.16</b> Grup 2 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları.....	42
<b>Şekil 4.17</b> Grup 2 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları.....	42
<b>Şekil 4.18</b> Grup 3 ovaryum IL-1b IHCp sonuçları.....	43
<b>Şekil 4.19</b> Grup 3 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları.....	43
<b>Şekil 4.21</b> Grup 3 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları:.....	44
<b>Şekil 4.20</b> Grup 3 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları:.....	43
<b>Şekil 4.22</b> Grup 3 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları:.....	44
<b>Şekil 4.23</b> Grup 3 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları:.....	45
<b>Şekil 4.24</b> Grup 4 ovaryum IL-1b IHCp sonuçları:.....	45
<b>Şekil 4.25</b> Grup 4 ovaryum IL-1b IHCp sonuçları:.....	46
<b>Şekil 4.26</b> Grup 4 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları:.....	46
<b>Şekil 4.27</b> Grup 4 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları:.....	46
<b>Şekil 4.28</b> Grup 4 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları:.....	47
<b>Şekil 4.29</b> Grup 5 ovaryum IL-1b IHCp sonuçları:.....	47
<b>Şekil 4.30</b> Grup 5 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları.....	47
<b>Şekil 4.31</b> Grup 5 ovaryum IL-6 IHCp sonuçları :.....	48
<b>Şekil 4.32</b> Grup 5 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları:.....	48
<b>Şekil 4.33</b> Grup 5 ovaryum TNF-a IHCp sonuçları:.....	49

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 2.1</b> PKOS'un klinik belirti ve bulguları .....	8
<b>Tablo 2.2</b> Polikistik over sendromunun kısa ve uzun dönemde etkilediği riskler.....	14
<b>Tablo 3.1</b> cDNA sentez karışımı .....	32
<b>Tablo 3.2</b> Çalışmada kullanılan 4 adet genin forward ve reverse primer dizileri .....	33
<b>Tablo 4.1</b> IL-1b ekspresyonu ve dağılımı .....	49
<b>Tablo 4.2</b> IL-6 ekspresyonu ve dağılımı .....	49
<b>Tablo 4.3</b> TNF-a ekspresyonu ve dağılımı .....	50
<b>Tablo 4.4.</b> Kontrol grubu ile diğer grupların PCR verilerinin karşılaştırması.....	50
<b>Tablo 4.5</b> Kontrol grubu ile diğer grupların PCR verilerinin karşılaştırması.....	50



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A.....	Androstenedion
ACTH.....	Adrenokortikotropin hormon
AMH.....	Antimülleryan hormon
AF.....	Antral follikül
DHEA.....	Dehidroepiandrosteron
DHEAS.....	Dehidroepiandrosteron sülfata
DHT.....	Dihidrotestosteron
DM.....	Diabetes mellitus
E2.....	Östradiol
FSH.....	Folikül stimulan hormon
GLUT-4.....	Glukoz Taşıyıcı Tip-4
GnRH.....	Gonadotropin releasing hormon
HDL.....	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HOMA-IR.....	Homeostatik Model İle İnsulin Direnci Değerlendirmesi
IL-1b.....	İnterlökin-1 Beta
IL-6.....	İnterlökin-6
İD.....	İnsülin direnci
IRS-1/2.....	İnsülin Reseptör Substratı-1/2
KF.....	Kistik Follikül
KL.....	Korpus Luteum
LDL.....	Düşük dansiteli lipoprotein
LH.....	Lüteinizan hormon
mRNA.....	Mesajcı Ribonükleik Asit
OGTT.....	Oral glukoz tolerans testi
PAI-1.....	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PON1.....	Paroksanaz 1
PKO.....	Polikistik over
PKOS.....	Polikistik over sendromu
PPAR-γ.....	Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama
SHBG.....	Seks hormonu bağlayan globülin
T.....	Testosteron
T2DM.....	Tip 2 Diyabetes Mellitus
TNF-a.....	Tümör Nekrozis Faktör - alfa
TNFR.....	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TNFR1.....	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 1
TNFR2.....	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 2
VKİ.....	Vücut kitle indeksi
WHR.....	Bel kalça oranı

## 1. GİRİŞ

İlk olarak 1935 yılında tanımlanan polikistik over sendromu (PKOS) hiperandrogenizm, hirsutizm ve ovaryumların polikistik görünümü ile karakterize bir semptomlar kompleksidir. Uzun dönemde metabolik ve kardiyovasküler problemlerle birliktelik gösteren PKOS üreme çağındaki kadınlarda yaygın olarak karşılaşılan endokrinolojik sorunlardan biridir (Frank S 1995, Yildiz BO vd 2012). Klinik çalışmalar PKOS'lu hastalarda artmış glikoz intoleransı, kardiyovasküler hastalıklar, tip II diyabet, folliküler maturasyonda duraklama, teka hücrelerinde anormal androjen üretimi, obezite, endometrial hiperplazi, endometrial ve ovaryan kanserler ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Daan NM vd 2014, Henmi H vd 2001). Yapılan birçok araştırma sonucunda etiyolojisi tam olarak bilinmese de genetik ve çevresel faktörlerin PKOS patogenezinde etkili olduğu görüşü kabul görmektedir. Sendromun tanı kriterleri ile ilgili tartışmalar süregelmekle birlikte, PKOS ve metabolik komplikasyonlar arasındaki patogenetik yollar da halen tartışılmakta olup açık değildir. Son dönemde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, kronik düşük dereceli inflamasyonun PKOS patogenezinde, ve metabolik komplikasyonların meydana gelmesinde etkili faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (Janssen OE vd 2008). 2014 yılında yapılan bir çalışmada polikistik overlerin teka tabakasında ve stromada makrofaj sayısında, TNF-a, IL-1b, IL-6 ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır (Jang M vd 2014). Bir başka çalışmada serumda ve follikül sıvılarında TNF-a, IL-1b, IL-6'nın arttığı belirtilmiştir (Amato G vd 2003). TNF-a, IL-1b, IL-6 ekspresyonlarında değişme olmadığını belirten çalışmalar da mevcuttur (Guo R vd 2015).

PKOS tedavisinde metformin ve ovulasyonun düzeltilmesinde kломifen sitrat en yaygın kullanılan ilaçlardır. Ancak uzun dönem kullanılması durumunda çoklu follikül gelişimi, ovaryan hiperstimulasyonu, çoklu ve ektopik gebelik ve nöral tüp defektleri yan etki olarak karşımıza çıkmaktadır (Kousta E 1997). Bu nedenle alternatif tedavilere gereksinim vardır. Günümüzde antioksidanlar, D vitamini gibi çeşitli ajanların PKOS

tedavisinde etkinliği araştırılmaktadır. D vitamini kalsiyum metabolizması ve kemik minerilizasyonu dışında üreme işlevinde de önemlidir. D vitamini eksikliğinin infertiliteyle ilişkili olduğu ve yeterli D vitamini alımının in vitro fertilizasyon tedavisinde daha iyi sonuçlar alınmasını sağladığı bildirilmektedir (Kousta E 1997, Kim JJ vd 2014). Ayrıca primer dismenoreyi tedavi edebileceği de iddia edilmektedir (Kim JJ vd 2014). PKOS' lu hastalarda yapılan çalışmalarda D vitamininin VKİ'yi (vücut kitle indeksi), İD'yi (insülin direnci), hiperandrogenezi ve menstrual siklusu düzenlediği gösterilmiştir (Tehrani HG 2014).

### 1.1. Amaç

D vitamininin PKOS'ta menstrual siklusu düzenlediği, hipoandrogenizmi ve insulin direncini düzelttiği gösterilmiştir (Tehrani HG 2014). Ancak PKOS'un D vitamini ile ilişkisini araştıran birçok çalışma olmasına rağmen bu çalışmaların sonuçları PKOS ve D Vitamini ilişkisini kesin olarak açıklayamamaktadır. PKOS'ta görülebilen düşük dereceli inflamasyona D vitamininin, over dokusu üzerinde etkilerini inceleyen bir çalışma henüz mevcut değildir. Bu çalışmada hedefimiz, PKOS patogenezinin oluşmasında rol aldığı düşünölen inflamasyon mekanizmasında, D vitamininin inflamasyonu düzeltici etkisinin olup olmadığını araştırmaktır. Yapılan literatür taramasında D vitaminin polikistik over dokusunda inflamatuvar sitokinler üzerine etkisiyle ilgili histolojik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada PKOS oluşturulan sıçan ovaryumunda vitamin D 'nin proinflamatuvar sitokinlerden IL-1b, IL-6 ve TNF a üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Ovaryum Gelişimi

Erkek ve dişi morfolojik karakterleri embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamazlar. Bu nedenle genital sistemin gelişimi başlangıç döneminde seksüel gelişimin farklanmamış safhası olarak adlandırılır. Farklanmamış gonadlar üç kaynaktan köken alır (Moore KL vd 2008):

- I. Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel
- II. Embriyonik bağ dokusu
- III. Primordiyal germ hücreleri

5. haftada mezonefrozun medialinde mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin altındaki mezenşim ile oluşturduğu kabartı gonadal kabartı olarak adlandırılır. Parmak şeklinde uzantılar veren mezotel, altındaki mezenşim içine doğru gonodal kordonları verir ve kısa sürede farklanmamış gonad dışta korteks ve içte medulla olacak şekilde oluşur. Farklanmamış gonadın bundan sonraki gelişimi eşey kromozomları tarafından belirlenir. Embriyo XX eşey kromozomuna sahipse farklanmamış gonad korteksi overe farklılaşır.

4.hafta başında eşey hücreleri vitellüs kesesi duvarında allantoin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasından farklanmaya başlar. Embriyo katlanması sırasında vitellusun dorsal parçasının embriyo içine dahil olması ile primordiyal germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenterisi boyunca gonadal kabartılara göç eder. 6. haftada primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içine göç ederek gonadal kordonlara dahil olurlar. 10. haftaya kadar overler histolojik olarak ayırt edilemezler. Gonadal kordonlar, medulla içerisine sokularak 'rete ovarii'yi oluştururlar. Bu oluşan yapı ve gonodal kordonlar normalde dejenerer olup kaybolurlar. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordiyal germ hücreleri onların içine girer. 16. haftada primordiyal germ hücrelerini barındıran kortikal kordonlar izole hücre kümeleri oluşturacak şekilde

parçalanır ve primordiyal follikülleri oluştururlar. Fetal yaşam sırasında aktif mitoz sonucu binlerce primordiyal follikül meydana gelir.

## 2.2. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar, temelde iki ana fonksiyonla görevli internal dişi üreme organlarıdır. Dişi gametlerin üretimi olan gametogenez ve steroid hormonlar olan östrojen ve progesteronların üretimi olan steroidogenezden sorumludur. Nulliparlarda ovaryumlar yaklaşık 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde, 1 cm kalınlığında badem şeklinde, çok açık pembe renkli bir çift organdır. Pubertaya kadar yüzeyi düzgün hatlı seyrederken, puberte sonrasında tekrarlanan ovulasyonlar sayesinde yüzeyi skarlı ve düzensiz bir hal alır. Postmenopozal dönemde ovaryumların boyutu üreme çağındakinin dörtte biri büyüklüğüne gerilemektedir. Ovaryumlar histolojik açıdan korteks ve medulladan oluşmaktadır. Medullar bölge ovaryumun merkezinde gevşek bağ dokusu, nispeten büyük, kıvrımlı kan ve lenf damarlarını ve ayrıca sinirleri içeren bölgesidir. Kortikal bölgesi, medullayı çevreleyen, bağ dokusu içine gömülü ovaryum folliküllerini içeren, ovaryumun periferik bölgesidir. Folliküllerin etrafında dağınık halde düz kas lifleri bulunmaktadır (Ross MH 2011).

Ovaryum yüzeyi germinal epitelle döşelidir. Germinal epitel tek katlı kübik veya bazı bölgelerde yassı epitelden oluşmaktadır. Germinal epitel geçmişte germ hücresi üretim yeri olarak düşünüldüğünden verilmiş yanlış bir isimlendirmedir. Günümüzde primordiyal germ hücrelerinin embriyonik yolk kesesinden gonadların korteksi içine göç edip burada farklılaşarak ovaryum farklanmasını indüklediği bilinmektedir. Germinal epitelle korteks arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır.

### 2.2.1. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi

Üç temel tipte follikül tanımlanabilir;

- I. Primordiyal follikül
- II. Büyümekte olan folliküller: Primer follikül, Sekonder(antral) follikül
- III. Olgun (Graaf) follikül



Primordiyal folliküller fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkar ve ovaryumun korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yer alırlar. Oositi çevreleyen tek sıra yassı follikül hücreleri ve follikül hücrelerini dıştan saran bazal lamina ile sınırlıdır. Primordiyal folikül oositin büyümesi ile büyümeye başlar. Yassı follikül hücreleri proliferasyon olarak kübik şekil alırlar. Bu evrede follikül primer follikül olarak adlandırılır. Oosit büyüdükçe salgıladığı özel bazı proteinler ile oositin çevresinde ekstraselüler bir örtü olan zona pellusidayı oluşturur. Follikül hücreleri zona pellusida oluşumu ile granuloza tabakasını oluşturmak için tabakalaşmaya başlar. Dışta bazal lamina ve bazal lamina üzerine oturmuş prizmatik granuloza hücreleri oluşur. Follikülü dıştan saran stroma hücreleri arasında bağ dokusu hücreleri sarmaya başlar ve bağ dokusu hücreleri primer follikülün teka tabakasını oluşturur. Gelişen follikülde granuloza hücreleri arasında kurulan oluklu bağlantılar testiste sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar gibi olmadığından kan-follikül bariyeri oluşmaz ve oositin follikül gelişimi bu yolla kandan follikül sıvısı içine besinlerin ve bazı makromoleküllerin geçişi ile sağlanır.

Follikülün büyümesi ile etrafındaki teka yapısı, follikülü iki tabakaya ayırır. Teka interna; kübik salgı hücrelerinden oluşan, yüksek düzeyde vaskularize iç tabakadır. Teka interna hücreleri çok sayıda LH (luteinizan hormon) reseptörüne sahiptir. LH uyarımı ile androjenleri sentezler. Teka interna salgı hücreleri dışında fibroblastlar, kollojen demetleri de içermektedir. Teka eksterna; dış bağ dokusu tabakasıdır. Düz kas hücreleri ve kollojen lif demetleri içerir.

Oosit olgunlaştıkça organellerinin dağılımı değişir. Oositten salınan proteinler ile zona pellusida oluşurken oositin oolemması ile çevre granuloza hücreleri arasında perivitellin aralık bulunur. Oositten perivitellin aralığa doğru çok sayıda mikrovillus uzanır. Aynı zamanda granuloza hücrelerinin uzantıları oositin plazma membranına kadar uzanır ve oositin mikrovillusları ile iç içe geçerek aralarında oluklu bağlantılar kurulur.

Stratum granulozum 6-12 hücre kalınlığına ulaştığında granuloza hücreleri arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlar. Sekonder follikül bu içi sıvı dolu kaviteler ile karakterizedir. Bu kaviteler hiyalüronik asit yönünden zengin bir sıvı içerir ve bu kavitelerin birleşmesi ile antrum oluşur. Bu nedenle sekonder follikül antral follikül olarak da anlandırılır. Sekonder follikül boyutu arttıkça antrum da genişler. Granuloza hücrelerinin oosit ile ilişkili olduğu bölgede kumulus ooforus adı verilen antruma doğru uzanan bir granuloza hücreleri tümseği oluşur. Oositin hemen etrafını çevreleyen kumulus hücreleri korona radiata adını alır ve ovulasyon sırasında oositle birlikte atılacaktır.

Graaf follikül, çapı yaklaşık 10 mm veya daha fazla olup korteks kalınlığı boyunca uzanır ve ovaryum yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Follikül maksimum boyutuna ulaşırken granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi de giderek azalır. Antrum boyutu arttıkça stratum granulozum tabakası incelik ve granuloza hücreleri arası boşluk genişler. Oosit ve kumulus hücreleri ile geri kalan granuloza hücreleri arası yakınlık gevşer ve ovulasyona hazırlanılır. Oosit çevresindeki kumulus hücreleri korona radiatanın tek hücre tabakasını oluşturur. Bu hücreler ve bunlara gevşek bağlanmış kumulus hücreleri ovulasyonda oositle birlikte atılır.

### 2.3. Polikistik Over Sendromu

#### 2.3.1. Tanımı ve tarihçesi

Polikistik over sendromu, kadınlarda prevalansı oldukça yüksek (% 4-10) olan, üreme çağında görülen endokrin bir bozukluktur. Merkezi sinir sistemi, hipofiz, overler, ekstraplanduler dokular ve adrenal glandlar arasındaki etkileşimin bozulması sonucunda üreme çağının herhangi bir döneminde ortaya çıkabilen ve kronik seyreden kompleks bir hastalıktır (March WA vd 2010). PKOS; hirsutizm, oligomenore, polikistik görünümlü overler, infertilite, obezite ve insülin direnci ile karakterize heterojen bir kliniğe sahip olmakla birlikte; uzun dönemde diyabet, kanser, KVH (kardiyovasküler hastalıklar) gibi önemli sağlık sorunları ile birlikte seyredabilen karmaşık bir rahatsızlıktır (Groot PC vd 2011, Diamanti-Kandarakis E ve Dunaif A 2012).

Achard ve Thiers (1921) hiperandrojenizm ve insülin ilişkisine dikkat çekmiştir. Stein ve Leventhal (1935) tarafından ilk kez büyümüş polikistik overler, amenore, kronik anovulasyon ve hiperandrojenizmi olan 4'ü obez, 7 olgu tanımlanmıştır. 1950'li yıllarda sendromun hipertansiyon ve obezite ile olan metabolik ilişkileri dikkat çekmiştir. Sendrom 1935'den 1980'li yıllara kadar, 'overlerin kistik distrofi, kistik sklerotik overler, hipertekozis ovarii' gibi birçok farklı isimle anılmıştır. McArthur JW vd (1950) PKOS'lu kadınlarda idrar LH seviyelerinin arttığını göstermişlerdir. Kahn vd (1976) ile Burghen vd (1980) bu hastalarda İD'yi göstermişlerdir. 1960'lı yılların sonuna doğru hipotalamus-hipofiz aksı arasındaki bozukluk rapor edilerek serumda yüksek LH seviyelerine dikkat çekilmiştir (Lobo RA 1983). 1970'lerde radyoimmunoassay (RIA) tekniklerinin geliştirilmesiyle biyokimyasal tanı daha da önem kazanmış ve 80'li yıllara gelindiğinde pelvik ultrasonun da yardımıyla Swanson ve arkadaşları tarafından PKOS'lu kadınlarda

ultrason bulguları tanımlanmıştır (Swanson M 1981, Kahn CR 1989). Yapılan son çalışmalarda ise PKOS'ta artış gösteren adipoz dokunun endokrin işlevinin önemine ve inflamasyon mekanizmasıyla ilişkisine vurgu yapılmaktadır (Ebejer K vd 2013, Gonzalez F vd 2012).

### 2.3.2. Tanı Kriterleri

PKOS tanısında, benzer kliniğe yol açabilecek diğer nedenler elimine edildikten sonra tanı için kullanılan geçerli kriterlerin sınanması gerekmektedir. Polikistik over sendromunun belirtileri; hirsutizm (%60-90), oligomenore (%50-90), polikistik over (%50-75), infertilite (%55-75), obezite (%40-60), amenore (%25-50), disfonksiyonel uterus kanaması (% 30), ve akne (% 25) şeklinde tanımlanmıştır (Moran LJ 2010).

PKOS tanısı için çeşitli kriterler kullanılmaktadır. NIH kriterleri gözden geçirilerek 2003 yılında Rotterdam kriterleri oluşturulmuştur (The Rotterdam ESHRE/ASRM, 2004).

1990 NIH tanı kriterleri:

1. Kronik anovülasyon
2. Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ve diğer etiyolojik nedenlerin elimine edilmesi

2003 Rotterdam yeniden gözden geçirilmiş tanı kriterleri

1. Oligo-anovülasyon
2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
3. Polikistik overlerin görülmesi ve diğer etiyolojik nedenlerin ekarte edilmesi

PKOS tanısı kliniklerde Rotterdam kriterlerine göre bu kriterlerden en az ikisinin görülmesiyle yapılmaktadır.

2006 yılında yapılan geniş katılımlı konsensusta açıklanan rapora göre (Azziz R vd 2006). Sendromun özellikleri ovulatuvar ve menstrual disfonksiyon, polikistik over(ler) hiperandrojenemi ve hiperandrojenizmin klinik özellikleri konuları altında incelenmiştir. Gonadotropin anormallikleri, İD, obezite gibi belirtiler tanı ölçütleri arasında yer almadığı gibi raporda da bu belirtilerin tanı ölçütlerinden olması gerekliliğini ortaya koyan kanıta rastlanmadığı belirtilmiştir (Azziz R vd 2006).

### 2.3.3. Klinik Bulgular

PKOS'ta görülen klinik semptomlar menarşla başlamaktadır ve hastalığın klinik seyrini birçok faktör etkilemektedir (tablo 2.1). Bazı durumlarda erken yaşlarda menstrual düzensizlikler daha fazla görülürken, daha ileri yaşlarda hirsutizm ve infertilite ön plana çıkmaktadır (Speroff L vd 2005). Orta ve ileri seviyede PKO görülen bazı vakalarda, ovaryan disfonksiyona neden olacak seviyede adipoz doku birikimi olana kadar semptom görülmeyebilir. Bu hastaların yaklaşık %20'sinde reglin düzenli olabileceği de bildirilmiştir (Elting MW vd 2000).

**Tablo 2.1** PKOS'un klinik belirti ve bulguları

PKOS'ta Görülen Klinik Belirti ve Bulgular	
Polikistik over	%50-75
İnfertilite	%55-75
Hirsutizm	%60-90
Obezite	%40-50
Amenore	%25-50
Oligomenore	%50-90
Akne	%25-30

Kronik anovulasyon, klinikte, düzensiz menstrüel siklus, oligomenore ya da amenore belirtileriyle karşımıza çıkmaktadır. Endometrial hiperplazi ile sonrasında gelişebilecek neoplastik değişiklik riskleri olduğu için PKOS'un tedaviye ihtiyaç gösteren semptomlarından birisi şiddetli oligomenoredir (Diamanti-Kandarakis E vd 1999). Bu tipteki hastaların endometrial kalınlıklarını, pelvik ultrasonografi ile ölçerek takip etmek mümkün olsa da malign değişim için risk altındaki kadınların belirlenmesi için ultrason görüntülemesinin hassas derecede etkili olup olmadığı kesin değildir (Elting MW vd 2000). Kronik anovulasyonlu PKOS'da anormal follikülogenezis görülür (V.A. Sander 2011). Anormal follikülogenezis de bu hastalarda infertilite şikayetlerine neden olmaktadır.

Nadiren ovulasyon ve spontan gebelik meydana gelse de gebeliklerde spontan abortus ve hipertansif durumlara yatkınlık artmaktadır (Speroff L vd 2005). Menstrual kanama

problemleri, infertilite ve endometriyal kanser riskleri ile hirsutizm, akne, kardiovasküler sistem hastalıklarında artış gibi etkiler sürekli anovulasyonun klinik sonuçları olarak, sayılabilmektedir.

Polikistik over sendromu olan kadınlarda VKİ genelde normal sınırdan yüksektir (Moran LJ vd 2010). Obezite, vücuttaki yağ dağılımına göre santral veya periferal olarak ayrılmaktadır. Santral yağ dağılımlı kadınlarda daha yüksek LH, östron, androstenedion, insülin, trigliserit, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein), apolipoprotein B seviyeleri görülmektedir. HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) seviyeleri de düşüktür (Pereira Santos M vd 2015). Yüksek WHR'nin (bel kalça oranı) artan menstrual düzensizlik ve infertilite sıklığıyla birlikte seyrettiği gösterilmiştir. PKOS'lu hastalarda daha çok WHR'nin arttığı santral obezite görülmekte ve beraberinde PKOS'lu hastalara ek riskler getirmektedir (Hahn S vd 2006).

#### 2.3.4. Laboratuvar bulguları

Normal bir kadının günde 0.2- 0.3 mg üretebildiği testesteronun %50'si androstenedionun periferik dönüşümünden, %25'i de eşit miktarlarda olmak üzere overlerden ve adrenal bezden salgılanır. Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) salgısının tamamına yakını, DHEA'nın ise %90'ı adrenal bez kaynaklı salgılanmaktadır (Guyton AC 2006). Dolaşımdaki testesteronun %69'u SHBG (seks hormonu bağlayan globülin), %30'u albumine bağlı olarak ve %1'i serbest durumda bulunmaktadır. Androjen etkisi, serbest kısım ile bir miktarda albumine bağlı olan kısma bağlıdır. DHEA, DHEAS ve A, ölçülen rutin testler, belirgin şekilde bir proteine bağlı olmadıkları için biyolojik aktif düzeyleri göstermektedir. T (testosteron) için yapılan rutin testlerde bağlı ve bağlı olmayan total T seviyeleri ölçülmektedir. Östrojen ve tiroid hormonu SHBG düzeylerini artırırken, artmış androjen ve hiperinsülinemi durumu, SHBG'yi düşürür. Hirsutizmde over kaynaklı artmış T ve A gösterilmiştir. Hiperandrojenemiye değerlendiren en hassas ölçümler serumda ölçülen serbest T seviyesi ve serbest androjen indeksidir ( $SAi = \frac{\text{total testesteron mol / L}}{\text{SHBG (nmol / L)}} \times 100$ ) (Moran C vd 1999). PKOS'lu kadınların yaklaşık %60-80'inde artmış androjen düzeyleri ölçülmüştür. Genel olarak serbest T düzeyleri yükselirken bu sonuca total T ölçümünün katkısı azdır. DHEAS, PKOS hastalarının %25'inde normal değerlerden yüksek çıkmaktadır (Moran C vd 1999). Androgen Excess Society 2006 raporunda DHEA ve serbest T ölçümü dahil androjenlerin serum düzeylerinin hiperandrojenemi tanısında tek ölçüt olamayacağı ve klinik değerlendirmenin tanı için daha önemli olduğu da belirtilmiştir. Total T seviyelerinin 200 ng/dL nin üzerinde olduğu durumlarda over ve adrenal tümör, DHEAS seviyelerinin

normalden iki kat yüksek olduğu durumlarda adrenal tümör araştırılmalıdır (Dumitrescu R vd 2015). Luteal fazın ortasında yapılacak progesteron ölçümü ile ovulasyon gösterilebilir. Bazal folliküler faz 17-(OH)-P ölçümü ise PKOS'un geç başlangıçlı konjenital adrenal hiperplazilerden ayırımı için gereklidir (Dumitrescu R vd 2015). LH ile FSH (follikül stimulan hormon) oranı premenopozal kadınlarda 1:1 iken, PKOS' lu kadınlarda bu değer 2:1' den daha büyük olmaktadır. FSH seviyesi normal veya normalin altındadır. LH seviyesi artmıştır. En geçerli test parametrelerden birisi total T veya serbest T düzeyleri artmış olmasıdır. Prolaktin düzeyleri normal veya artmış olabilir. DHEA-S düzeylerinin çok az arttığı görülebilir. SHBG seviyesinin azaldığı, östrojen seviyesinin normal veya yüksek değerde olduğu görülebilir (Krul-Poel YHM vd 2013). Lipit profiline bakılacak olursa; kolesterol, LDL trigliserit düzeylerinin artmış olduğu, HDL düzeyinin ise azalmış olduğu görülebilir. İnsülin genellikle artmış olarak görülmektedir (Wild RA vd 2011).

### 2.3.5. Histopatolojisi

Deneysel PKOS çalışmalarında overlerin morfolojik değişiklikleri dikkat çekmektedir. PKOS oluşturulmuş sıçanlarda overlere bakıldığında yüzey alanlarının yaklaşık iki kat arttığı görülmektedir. Yüzey alanının yanısıra over hacmi de 2-8 kat arasında bir artış göstermektedir. Morfolojik olarak ovaryumlar sıkı bir bilye paketiyle dolu küçük, beyaz bir balona benzemektedirler (Ross MH 2011). İstiridyeye ovaryumlar olarak adlandırılan, etkilenmiş ovaryumların yüzeyi düzdür. İnci beyazı renginde izlenir ve ovulasyon gerçekleşmediği için yüzey skarlaşması yoktur. Bu durum alışılmadık düzeyde kalın bir tunika albugineanın altında uzanan çok sayıda, sıvı dolu folliküler kistlerle ve atrofik sekonder folliküllerle ilişkilendirilebilmektedir. Primordiyal follikül sayısında anlamlı bir değişme görülmezken büyümekte olan ve atreziye uğramış follikül sayıları yaklaşık iki kat kadar artmaktadır. Kortikal stromada 1/3 kat kadar artış görülürken subkortikal stromada 5 kat artış görülmektedir. Overlerde hilus hücrelerinde hiperplazi, normalden 4 kat fazladır.

Polikistik overi, multifolliküler over ile normal overden ayıran, daha fazla follikül içermesi, overlerin daha büyük olması ve hipertrofik stromasıdır (March WA vd 2010). Ultrasonografik kriterler ikiye ayrılır; ovaryan alanın ve hacmin artması, yuvarlak indeks (ovaryan genişlik/uzunluk) artışı, uterin genişlik ile ovaryan uzunluk oranının azalması eksternal morfolojik bulgular; çok sayıda periferal dağılımlı mikrokist (<10 mm), ovarian stromanın artmış ekojenitesi ve ovarian stromanın yüzeyinin artması internal morfolojik bulgular olarak adlandırılmaktadır.

### 2.3.6. Fizyopatolojisi

PKOS etiyolojisi tam olarak çözümlenmemiş olmakla beraber, çevresel faktörlerin de etkileşimiyle birçok metabolik rahatsızlıkla birlikte seyreden ve sık görülen karmaşık bir sendrom olarak değerlendirilebilir. Sendromun fizyopatolojisinde ise gonadotropin mekanizmasında değişiklikler, steroidogenez bozuklukları, insülin salınım ve etki yollarındaki bozukluklarla birlikte genetik faktörler de ön plana çıkmaktadır (Agrawai R vd 1998)

#### 2.3.6.1. Gonadotropin sekresyon bozuklukları

PKOS'ta hipotalamus-hipofiz-over aksın fonksiyonunda bozukluklar tanımlanmaktadır. Menstrual döngü için hipotalamik arkuat çekirdekte pulsatil GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) salınımına bağlı olarak ön hipofizden pulsatil gonadotropin (LH ve FSH) salınımı gerekmektedir. PKOS'lu kadınlarda görülen anovulasyon, uygun olmayan gonadotropin salgılanması ile karakterizedir. GnRH pulsatilitesindeki değişiklikler, FSH'ya göre LH'nin daha baskın olarak üretilmesine sebep olur (Hayes FJ vd 1998). LH, ovaryum kaynaklı androjen üretimini uyarırken, göreceli FSH azlığı GH (büyüme hormonu) aromataz enziminin uygun olarak uyarılmasını engelleyerek androjenin etkin haldeki östrojen olan E2'ye (östradiol) dönüşümünün azalmasına neden olur. Yüksek serum androjenlerinden olan A (androstenedion) periferde öncelikle östron (E1) olmak üzere östrojenlere dönüşür. Bu dönüşüm öncelikle yağ dokusunun stromal hücrelerinde görüldüğü için östrojen üretimi obez PKOS olgularında daha fazla olacaktır. Artan östrojen hipotalamus ve hipofiz bezinin kronik negatif geri bildirim ile sonuçlanacak ve gonadotropin salınımının pulsatilitesinde değişikliğe yol açacaktır.

Göreceli LH yüksekliği teka hücrelerinde androjen yapımını özellikle de A yapımını arttırmaktadır. Sonuç olarak daha fazla A perifer dokularda testosterona (T) dönüşmektedir (Speroff L ve Fritz MA 2005). Bu değişikliklere Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) puls sıklığının artışı, GnRH'ya yanıt artışı ve yüksek östrojen seviyelerinin sebep olduğu düşünülmektedir. PKOS'lu hastalarda LH artışının aksine hipofizer FSH salgısı erken folliküler fazda belirgin olarak düşük tespit edilmiştir (Azziz R vd 2006).

### 2.3.6.2. Steroidogenez değişiklikleri

PKOS'da over ve adrenal bez steroidogenezinde birçok değişiklik görölmektedir. Artan LH seviyeleri overlerde cAMP (siklik adenozin monofosfat artışı) ile steroidogenezi androjenlerin üretimi yönünde etkileyerek, follikül gelişiminde duraklamaya sebebiyet vermektedir (Azziz R 2005). Artmış LH düzeylerine cevap olarak androjen salınımı hızlanır ve sonrasında bir kısır döngüye girerek, yükselmiş olan androjen seviyeleri ekstraglandüler olarak androjen-östrojen dönüşümünü arttırırken, SHBG sentezini baskılamaktadır. Bunun sonucunda da östrojen seviyelerinde artış olmaktadır. Ek olarak SHBG sentezinin baskılanarak azalması nedeniyle serbest T seviyesinde iki kat artış gerçekleşir. Artan androjenler, over içerisinde normal follikül gelişiminin engellenmesinde etkili olmakta ve prematür atreziyi uyarmaktadır (Franks S vd 2000). Bölgesel androjen bloğu, sürekli anovulasyonun devam etmesinin temel sebeplerinden biridir.

Klinik olarak GnRH agonistlerinin PKOS' lu hastalarda kullanılması ile normal kadınlara göre teka hücrelerinde artmış A ve 17-OH-P saptanması bu hücrelerde de sitokrom P450c17 gen ekspresyonunu düşündürmektedir. LH'nın bu sistemi seçici olarak etkilediği düşünölmektedir (Moran C 1999). Teka hücrelerinde bulunan insülin, IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktör 1), IGF-2 (insülin benzeri büyüme faktörü 2) reseptörlerinin uyarılmasının overlerde androjen üretiminde etkileri olduğu saptanmıştır ve hiperinsülineminin düzeltilmesiyle birlikte LH düzeyinde değişiklik olmadan, serum androjen düzeylerinde azalma gösterilmiştir (Yıldız BO 2004).

PKOS'lu olguların bir kısmında yükselmiş olan DHEAS düzeyleri adrenal bezde androjen üretiminin arttığını göstermektedir. Fakat ACTH (adrenokortikotropin hormon) seviyelerinin PKOS'lu olmayan kadınlarda da benzer olması nedeniyle aradaki farkın ACTH'ya verilen cevap sonucunda olduğu ya da ACTH dışındaki faktörler ile adrenal bezin uyarılmış olabileceği düşünölmektedir. PKOS'da DHEAS seviyeleri ile bazal ve ACTH uyarısıyla artmış olan adrenal androjen salgılanmasının yanıtında genetik faktörler oldukça önemlidir (Burghen GA 1980).

### 2.3.6.3. İnsülin etki ve salınım bozuklukları

Anabolik etkili bir hormon olan insülin, hücreye glukoz ve aminoasit girişini, lipogenezi ve mitogenezi arttırmak gibi etkilere sahiptir. İnsülin, karaciğerde hepatik glukoz üretimini, glukoneogenezi ve glukojenolizi inhibe ederek baskılarken glukozu da



kas doku ve adipoz doku gibi periferik dokulara taşımakta ve bu dokularda depolanmasını ya da enerji üretmek amacıyla okside olmasını sağlamaktadır (Guyton AC ve Hall JE 2006). İnsülin reseptörü, iki alfa ve iki beta birimlerinden oluşmuş bir heterodimer yapısındadır. İnsülini bağlayan alfa birimleri ekstrasellülerdir. Membran boyunca yerleşmiş olan beta birimlerinin intrasellüler bölümü, insülin etkisinin önemli bir kısmından sorumlu olan tirozin kinaz enzimatik aktivitesi içermektedir.

Birçok dokuda büyüme hormonunun işlevini, karaciğerde üretilen ve 12. kromozom tarafından kodlanan 70 aminoasitli bir polipeptit olan IGF-1 aracılığı ile yaptığı kabul edilmektedir (Burghen GA vd 1980). IGF-1 birçok hücrede DNA sentezini arttırarak mitojenik etki yapmaktadır ve reseptörleri insülin reseptörleriyle benzerdir. IGF-2 ise embriyonik ve fetal gelişim üzerinde etkilidir (Talbott EO 2000). IGF-2 lokal büyüme faktörlerinin gerekli olduğu erken folliküler dönem gonadotropinlerden bağımsızdır ve IGF-1'in de burada etkili olduğunu savunan birçok çalışma vardır. VA Sander vd (2011) follikül gelişiminin IGF-1'in inaktif olduğu preantral dönemde durduğunu göstermiştir. PKOS'ta pek çok alanda artan IGF-1, LH'ya ve FSH'ya verilen over cevabını arttırarak gelişen follikül sayısında da artışa neden olmaktadır ancak devamında atrezi gerçekleşir (VA Sander vd 2011).

PKOS hastalarında IGF-1'in etkilerini arttıran diğer bir sebep de IGFBP-1'in azalmasıdır. IGF-1 ve insülin, androjen sentezini arttırmaktadır ve bu etki granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini arttırır (Pasquali R vd 2000). İD, belli miktarda glukoz için gerekli olan uygun insülin cevabın verilmemesidir. İD beraberinde, kompanzatuvar hiperinsülineminin, VKİ'den bağımsız olarak, PKOS'lu kadınlarda sık görülen bir bulgu olduğu belirtilmektedir (Ketel IJ 2011). İlk kez Burghen GA vd (1980) tarafından obez PKOS'lu hastalarda hiperinsülinemi ve hiperandrojenizmin pozitif lineer korelasyonu bulunmuş ve sonrasında yapılan bazı çalışmalarda zayıf ve obez PKOS hastalarında İD olduğu belirtilmiştir. Fakat PKOS hastalarında görülen İD'yi açıklamak için tek başına hiperandrojenizm ya da obezite yeterli değildir (Ketel IJ 2011). PKOS'da İD ve hiperinsülinemi, over androjen sentezi ve SHBG seviyesindeki azalma ile birlikte serbest T seviyesini arttırmaktadır. Son yıllarda yapılan, İD'yi inceleyen çalışmalarda, "artan serin fosforilasyonuna bağlı postreseptör defekt" açıklanmıştır, insülinin reseptöre bağlanması normal olmasına rağmen insülin-aracılı glukoz taşınımının azalmasıyla sonuçlanmaktadır (Dumitrescu R 2015).

PKOS' a neden olan İD iki farklı şekilde gelişebilir. İD, insülin reseptör bölgelerini veya hücredeki giriş kapılarını azaltabilmektedir. PKOS'lu hastalarda hücre başına düşen reseptör sayısı normal kadınlarla karşılaştırıldığında 4 kat daha azdır. Bu nedenle hücre içine glukoz girişi azalırken kandaki glukoz miktarı artmaktadır. Bu olaylar

sonucunda gerçekleşen kilo alımı ve obezite PKOS gelişiminde anahtar rol oynamaktadır. İkinci yolda direkt olarak insülin seviyelerinde meydana gelen artış, insülin direncine neden olur. Sağlıksız yaşam biçimi ve genetik sebeplerden dolayı pankreasta çok miktarda insülin üretimi olur. Hücre, bu fazla insülin salınımından korunmak için insülin reseptör sayısını azaltma gereği duyar. Bu da kandaki insülin seviyesini arttırarak PKOS'lu hastalarda hormon seviyelerinde dengesizliğe neden olmaktadır (Ngo DTM 2011).

#### 2.3.6.4. Genetik faktörler

Genetik faktörler PKOS'un reproduktif metabolik fenotiplerinin ortaya çıkmasında etkili olmaktadır. Yıldız BO vd (2003) tarafından yapılan çalışmada PKOS'lu kadınların annelerinde kontrol grubuna göre artmış T ve kız kardeşlerinde kontrol grubuna göre artmış T, A, DHEAS görülmüştür. Ayrıca anne, baba ve kardeşlerde, İD riski sağlıklı kontrol grubuna göre artmıştır (Yıldız BO vd 2003). PKOS patogenezinde rol oynayabilecek genetik bozuklukların incelendiği çalışmalar sendromun karmaşık bir poligenik bozukluk olabileceğini ortaya koymaktadır

NIH kriterlerine göre, PKOS hastalarının yakınlarında PKOS görülme riski annelerinde %24 ve kız kardeşlerinde %32'dir (Kahsar-Miller MD 2001). Türkiye'de ise bu oran Yıldız BO vd (2003)'nin yaptığı çalışmada % 8 ve %16 olarak bulunmuştur. PKOS'un etyopatogenezinde önemli olabileceği düşünülen aday genlerinin seçiminde 2 yaklaşım söz konusudur; PKOS'ta fenotipik değişikliklerden sorumlu olabilecek proteinleri kodlayan genler ve PKOS'ta fonksiyonları değiştiği bilinen proteinleri kodlayan genler (Ünlütürk U vd 2007).

#### 2.3.7. Uzun Dönemde Metabolik Etkileri

PKOS'un uzun dönemde etkilediği risk faktörleri ve birlikte seyretme eğilimi gösterdiği hastalıklar tablo.2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2** Polikistik over sendromunun kısa ve uzun dönemde etkilediği riskler

Kısa Dönem	Uzun Dönem
Adet düzensizliği	Diabetes mellitus
Hirsutizm, akne, androjenik alopesi	Kardiovasküler hastalıklar

Obezite	Kemik Metabolizmasında Sorunlar
Hiperlipidemi	Endometrial Kanser
Glukoz intoleransı	Abdominal obezite ve dislipidemi
Metabolik bozukluklar	

### 2.3.7.1. Obezite ve dislipidemi

PKOS'la birlikte görülen obezitenin nedeni hala tam bilinmemekle birlikte farklı çalışmalarda %10 ile %75 arasında değişebilen oranlarda obezite varlığı bildirilmektedir. Obez olan hastaların daha düşük LH, SHBG, DHEAS, DHT (dihidrotestosteron), IGF-1, HDL düzeylerine, buna karşın daha yüksek LDL seviyelerine sahip oldukları gösterilmiştir (Silfen ME vd 2003). Epidemiyolojik çalışmalarda PKOS'lu hastalarda yağ dağılım paterni, vücut ağırlığından bağımsız olarak diyabet, hiperinsülinemi, İD, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkması bakımından risk teşkil etmektedir. PKOS'lu kadınlarda ilerleyen yaş ile ilişkili olarak artan kardiyovasküler risk nedeniyle kan basıncı, serum lipitleri ve insülin ölçümleri üzerinde durulmaktadır. PKOS'ta hiperandrojenizm ve diğer hormonal bozukluklarla birlikte, bozulmuş lipid profili görülmektedir (Sam S vd 2005, Pirwany IR vd 2001). PKOS'lu kadınlarda genellikle düşük HDL kolesterol ve yüksek trigliserit seviyeleri görüldüğü bildirilmekle birlikte karakteristik bir dislipidemiye sahip oldukları tam olarak söylenmemektedir (Wild RA vd 2011) İnsülin arteriyel doku ile yağ dokusunda asetil-KoA'nın yapımı ile glukoz ve trigliseritin girişini arttırarak lipogenezi uyarmaktadır. Kardiyometabolik sendromda ortaya çıkan yüksek trigliserit ve düşük HDL düzeyleri, insülinin kolesterol ester transfer proteini üzerindeki etkileri sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu protein kolesterolün HDL'den VLDL'ye transferini göstermekte ve sonucunda Apolipoprotein A katabolizması gelişmektedir (Yıldırım B 2003). İnsülinin yanı sıra testosteron da abdominal yağ hücrelerinde lipoprotein lipaz aktivitesini düşürerek etki etmektedir. İD gibi dislipideminin de PKOS'ta yalnızca obezite varlığında değil, obez olmayan PKOS'lu kadınlarda da görülebildiği vurgulanmaktadır (Ketel IJ vd 2011).

### 2.3.7.2. Kanser

Çalışmaların birçoğunun kontrollü çalışma olmaması ve PKOS tanı kriterlerinin farklılıklar içermesi nedeni ile şu ana kadar PKOS ile kanser ilişkisini destekleyen güçlü

kanıtlara rastlanmamıştır. Ancak mevcut veriler ışığında özellikle başta endometrial kanser olmak üzere PKOS ile jinekolojik kanserlerin ilişkisini göz ardı etmek mümkün değildir.

PKOS'lu kadınlarda artmış endometrium kanseri riskinden sorumlu olduğu düşünülen mekanizma uzamış anovulasyon ve takibinde progesteron ile karşılanmayan, devam eden östrojen sekresyonudur. Karşılanmamış östrojene maruziyet endometrial hücrelerde mitotik aktivitenin artmasına, DNA replikasyon hatalarının artmasına ve sonucunda malign fenotip ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Schindler AE 2009). PKOS'un bir özelliği olan LH hipersekresyonunun endometrium kanseri gelişiminde etkili olabileceği bildirilmiştir. Endometrium adenokarsinomlarında LH ve hCG reseptörleri aşırı eksprese edilmektedir (Piltonen TT vd 2016).

Diyabetes mellitusun endometrial kanser için bir risk faktörü olduğu iyi bilinmektedir. Bu ilişki nispeten obeziteye bağlı olabilir fakat hiperinsülineminin spesifik etkisine dair kanıtlar da mevcuttur. Yapılan çalışmalarda endometrial kanserli kadınlarda, endometrial stromada insülin bağlanma bölgeleri bulunmuş ve plazma insülin konsantrasyonları artmış olarak gösterilmiştir (Akhmedkhanov A vd 2001). PKOS'da artan insülin ve IGF-1 konsantrasyonları in vitro olarak endometrial kanser hücrelerinin büyümesini hızlandırır (Navaratnarajah R vd 2008).

PKOS ile over kanserleri arasındaki doğrudan ilişkiyi ortaya koymaya yönelik az sayıda çalışma vardır. Over kanseri gelişmiş 31 kadın, yaş ve menopozal durum olarak eşleştirilmiş 62 kontrol vakası ile karşılaştırıldığında tanı öncesi A ve DHEA seviyelerinin belirgin olarak yüksek saptanması androjenlerin ovaryan karsinogenezde rol oynadığını desteklemektedir. Obezite ve epitelyal over kanseri arasındaki ilişkiyi açıklamaya çalışan çalışmaların sonucu çelişkili olup bazı çalışmalarda pozitif bir korelasyon saptanmışken (Olsen vd 2008), diğer bazı çalışmalarda saptanmamıştır. Meme kanseri ve PKOS arasındaki doğrudan ilişkiye dair literatür verileri oldukça çelişkilidir. Androjenin AR-pozitif kanser hücrelerini direkt uyarması, östrojen pozitif hücrelerin uyarımı, aromatazın insülin tarafından uyarılması ile testesteronun doku içinde östradiole aromatzasyonu ve hiperandrojenik kadınlarda azalmış SHBG düzeyleri nedeni ile artmış serbest östrojen düzeyleri PKOS'da artmış meme kanseri riskini açıklayabilir. 'Cholesterol sidechain cleavage enzyme' kodlayan CYP11A geni promoter bölgesindeki bir polimorfizmin meme kanseri ve PKOS ilişkisinden sorumlu olabileceği bulunmuştur (Gharani N vd 1997). Sonuç olarak mevcut veriler ışığında genel bir tarama veya önleyici tedavi önermek doğru gözükmemektedir. Bu konuda yapılması gereken risk faktörlerini ortaya koymak ve yüksek risk altındaki hastaları belirlemektir.

### 2.3.7.3. Kardiyovasküler hastalık ve metabolik sendrom

PKOS, insulin direnci, obezite, aterojenik displidemi ve hipertansiyon ile karakterizedir. Metabolik sendrom, artmış KVH (kardiyovasküler hastalıklar) ve T2DM (tip 2 diyabetes mellitus) riski ile ilişkilidir (Schneider J 2006). Metabolik sendrom prevalansı, PKOS olan kadınlarda %45, yaş olarak eşleştirilmiş kontrol grubundaki kadınlarda ise %4 olarak bildirilmiştir (Ford E.S vd 2002).

PKOS'lu kadınlarda artmış KVH sıklığı için kesin kanıtlar olmasa da PKOS, metabolik sendromda da yer alan çeşitli endokrin özellikleri paylaşmaktadır. Ancak, Dahlgren vd (1992) PKOS olan kadınlardan oluşan küçük bir grupta, miyokard infarktüsü için relatif riski 7.4 olarak saptamışlardır. Başka bir 10 yıllık izlem çalışması, obez PKOS hastalarında KVH için relatif riski 5,91 olarak göstermişlerdir (Tallbot E 1995). Böylece kanıtlar PKOS olan kadınların tanımlanabilir ve tedavi edilebilir KVH faktörleri olabileceğini göstermektedir.

Kardiyolojik, kardiyovasküler risk belirteci olarak kabul gören plazma asimetric dimetilarginin, retinol bağlayıcı protein-4 ve leptin düzeyleri, genç ve obez PKOS'lu kadınlarda artmıştır (Yıldızhan R 2011). İD / hiperinsülineminin bir sendrom topluluğu olduğu bulunması ile günümüzde bu bozukluğa metabolik sendrom ya da dismetabolik sendrom denilmektedir. Kardiyovasküler hastalık açısından bir risk faktörü olması nedeniyle tanısal kriterlerin belirlenmesi önemlidir. Belirtilen kriterlerden en az 3 kriterin varlığında tanı doğrulanmaktadır (IDF 2006). Kadınlarda metabolik sendromun tanı kriterleri:

Bel çevresi >88 cm

Trigliserit düzeyi > 150 mg/dl

HDL kolesterol < 50 mg/dl

Açlık glukoz düzeyi : 110-126 mg/dl

HT > 130/85 mmHg

Metabolik sendrom bileşenlerine ek olarak, diğer subklinik hastalık belirteçleri de PKOS ve KVH arasında bağlantı oluşturur. PKOS'lu kadınların sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu için artmış sıklığa ve artmış internal ve eksternal karotid arter sertliğine sahip oldukları bulunmuştur (Lakhani K vd 2000). Ayrıca birçok çalışma ateroskleroz gelişiminde erken olay olarak tanımlanan endotel disfonksiyonun, etkilenmiş kadınlarda daha fazla olduğunu göstermiştir (Orio FJ vd 2004, Death A.K vd 2004). PKOS'lu

kadınlarda yapılan çalışmalar bu kadınlarda makrovasküler hastalık ve tromboza yatkınlık bulunduğunu göstermiştir (Orio F Jr vd 2004). Bu hastalarda artmış PAI-1 (Plazminojen aktivatör inhibitör tip 1) düzeyleri bildirilmiştir. PKOS'da görülen PAI-1 artışı, VKİ'den bağımsız olarak ortaya çıkmakta ve obez olmayan PKOS'lu kadınlarda da görülebilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda artmış PAI-1 düzeyleri doğrudan İD ile orantılı bulunmuştur (Tarkun I vd 2004). PKOS'da aterosklerozun ilk bulgularından olan endotel hasarının gelişiminde İD anahtar rol oynar. Bunun sonucu olarak PKOS'lu kadınlar ileri yaşlarında hipertansiyon ve artmış kardiyovasküler risklerle PKOS'lu olmayan kadınlara göre daha sık karşı karşıyadırlar (Legro RS vd 2003).

PKOS'da kardiyovasküler risk ve hiperinsülinemi için kullanılmakta olan belirteçler; OGTT (oral glukoz tolerans testi) esnasında artmış insülinemi, düşük glukoz/insülin oranı, azalmış serum HDL–kolesterol seviyesi ve lipid profili, artmış TG, serum SHBG seviyesinde azalmadır.

Artmış oksidatif stresin, lipid peroksidasyonu ile doku hasarına yol açtığı ve bu mekanizmanın PKOS hastalarında kardiyovasküler hastalık riskini artırabileceği bildirilmiştir. “Lipid peroksidasyonunu yansıtan malondialdehid (MDA), hücrenin yapı ve fonksiyonunu bozabilir. PON1 (Paraoksinaz 1), okside lipoproteinler üzerindeki lipid peroksidleri hidrolize edip HDL ve LDL'yi oksidatif stresin etkilerinden koruyan ve HDL'nin antioksidan etkilerinden kısmen sorumlu bir enzimdir” (Koçer D vd 2009). Yapılan bir çalışmada PKOS'lu hastalarda metformin tedavisinin, PON1 aktivitesini artırıp, MDA düzeyini düşürerek kardiyovasküler hastalık gelişimine neden olan oksidatif stresi azalttığı görülmüştür (Koçer D vd 2014). Ancak PKOS doğurganlık çağındaki genç kadınlarda görüldüğü için bu dönemdeki hastalar kardiyovasküler riske sahip olsalar da, kısa dönemde major kardiyak olay beklenmemektedir.

#### **2.4. Vitamin D ve Polikistik Over Sendromu**

D vitamini düzeyleri ile İD, infertilite ve hirsutizm gibi çeşitli PKOS semptomları arasında bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Panidis D vd 2005, Pal L vd 2008). D vitamininin, çeşitli gen transkripsiyonları aracılığıyla PKOS patogenezini etkilediği ve böylece insülin metabolizmasında ve fertilitenin düzenlenmesinde de etkisi olduğu düşünülmektedir (Mahmoudi T vd 2009). Elde edilen verilere göre, VKİ'leri göz önünde bulundurularak yapılan çalışmalarda D vitamini düzeylerinin PKOS'lu ve PKOS'suz kadınlarda benzer düzeyde olduğu görülmüştür (Li H.W.R vd 2011) fakat

PKOS'lu kadınlarda D vitamininin daha düşük (Wehr E vd 2011, Mazloomi S vd 2012) ve daha yüksek (Mahmoudi T vd 2012) düzeylerde olduğunu gösteren sonuçlar da bulunmaktadır. PKOS'lu kadınlarda D vitamini seviyelerinin düşük olduğunu bildiren vaka çalışmaları vardır. Bu hastalarda ortalama serum 25(OH)D seviyesi, 11 ile 31 ng/ml arasındadır (Panidis D vd 2005, Yıldızhan R vd 2009, Li H.W.R vd 2011, Wehr E vd 2011), çoğunluğunda ise bu değerler 20 ng/ml'nin altında olup D vitamini eksikliği olarak adlandırılmaktadır (Hahn, S vd 2006, Wehr E vd 2009, Li H.W.R vd 2011, Selimoğlu H vd 2010). Ancak D vitamini eksikliği, genel popülasyonda yaygın bir durumdur ve yetişkinlerin %10-60 arası bir bölümünün değerleri 20 ng/ml'den düşüktür (Krul-Poel YHM vd 2015). D vitamini eksikliği ciddi bir problemdir ve birçok metabolik rahatsızlıkla ilişkilidir.

Mahmoudi vd (2010) yaptıkları çalışmada PKOS'lu 85 hasta ile kontrol grubunda (n=115) aynı yaşta (30 yaş) ve VKİ'ye (27kg/m<sup>2</sup>) sahip kadınları karşılaştırmış ve PKOS'lu kadınlarda D vitamininin oldukça yüksek seviyede (PKOS'lu kadınlarda 29.3 ng/ml iken kontrol grubundaki kadınlarda 19.4 ng/ml) olduğunu göstermiştir. Wehr vd (2011) de kontrol grubundaki kadınlara (n=145) bakıldığında PKOS'lu kadınlarda (n=545) (sırasıyla 25.7 veya 32.0 ng/ml) D vitamini düzeylerinin düşük olduğunu ve PKOS'lu kadınların kontrol grubundan daha genç olduklarını (sırasıyla 27 ve 29 yaş) rapor etmiştir.

. PKOS ile yapılan bir çok çalışma, PKOS'lu kadınlarda VKİ, WHR ve vücutta yağ birikimi ile serum 25(OH)D seviyeleri arasında zıt bir ilişki olduğunu bildirmektedir (Li HWR vd 2011, Muscogiuri G vd 2012). PKOS'lu obez olmayan kadınlarla kıyaslandığında, PKOS'lu obez kadınlarda D vitamini seviyesinin %27-56 oranında daha düşük olduğu gösterilmiştir (Panidis D vd 2005, Yıldızhan R vd 2009). PKOS'lu kadınlarda yapılan bir diğer çalışma, serum 25(OH)D seviyesinin, VKİ ve total yağ kitlesine göre belirlendiğini ve İD oluşumundan doğrudan etkilenmediğini ortaya koymuştur (Muscogiuri G vd 2012). D vitamini eksikliğinin obezite durumunda daha yaygın olması adipoz doku birikiminin bir sonucu olarak D vitamini sentezinin ve güneş görme miktarının azalmasıyla ilişkili olabilir (Li HWR 2011).

D vitamini eksikliğinin, PKOS'la birlikte görülen İD ve metabolik sendrom patogenezinde etkili olduğunu gösteren veriler mevcuttur (Wehr E vd 2009, Ngo DTM vd 2011). D vitamini, paratiroid bezler, overler, iskelet sistemi gibi çeşitli dokulara dağıtılan nükleer vitamin D reseptörleri (VDR) aracılığıyla gen transkripsiyonunu düzenler (Mahmoudi T, 2009) PKOS oluşumun nedenleri, VDR'nin (TaqI, BsmI, FokI, ApaI ve Cdx2) polimorfizmleri, LH ve SHBG düzeyleri, testosteron düzeyleri, İD ve serum insülin düzeyleri (Hahn S vd 2006, Mahmoudi T vd 2009, Wehr E vd 2011) üzerindeki etkileri ile

bağlantılıdır. VDR'ler, overdeki östrojen üretiminde önemli bir role sahiptir. D vitamini, aromataz gen ifadesini doğrudan regüle ederek hücre dışı kalsiyum homeostazını korur ve böylece östrojen biyosentezini düzenler (Kinuta K vd 2000). VDR'li olmayan farelerde, overde aromataz faaliyetinin azaldığı ve follikülogenezin bozulduğu görülürken (Yoshizawa T vd 1997, Kinuta K vd 2000) D vitamini eksikliği olan farelerde de fertilité oranları düşmüştür (Halloran BP ve Deluca HF 1980). İnsan ovaryum dokusunda, 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>'ün östrojen ve progesteron üretimini uyarırken, testosteron üretimi üzerinde etkili olmaması, D vitamininin aromataz aktivitesini artırması ile açıklanmaktadır (Parikh G vd 2010). Aromataz gen ekspresyonu, kontrol grubuna göre bakıldığında, PKOS folliküllerinde azalırken, LH seviyeleri artmış ancak preovulatuvar folliküllerin folliküler progesteron ve östradiol üretimi azalmıştır (Sander VA vd 2011).

D vitamini ve İD'nin ilişkisi birçok hücresel ve moleküler mekanizma ile açıklanabilir. 1,25-dihidroksivitamin D insülin sentezi ve salınımını artırarak insülin aktivitesini artırabilir. Böylece insülin reseptör sayısında artışa neden olabilir ve İD meydana getirdiği düşünülen artan reseptörlerin ekspresyonunu veya proinflamatuvar sitokinlerin baskılanmasını artırır (Teegarden D ve Donkin SS 2009). Bunun yanında periferik dokularda insülin hassasiyetini değerlendiren bir çalışma, D vitamini eksikliğinin İD ile ilgili değil, obeziteyle ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Muscogiuri G vd 2012). D vitamini seviyesi ile insülin hassasiyeti arasındaki ilişkiyi destekleyen veriler olmasına rağmen tam olarak mekanizması açıklanamamıştır ve D vitamini seviyesinin, HOMA-IR (homeostatik model ile İD değerlendirmesi) ile negatif korelasyon gösterdiği çalışmaların yanısıra bu çalışmalardan bazılarında VKİ kontrol edildiği zaman bu ilişkinin kaybolduğu görülmüştür.

Obezite ve İD arasındaki ilişki, PKOS'lu kadınlarda düşük D vitamini seviyesinin hem obeziteyle hem de İD ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür. Obez PKOS hastalarında D vitamini takviyesinin üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Kotsa K vd (2009) kontrolsüz bir çalışmayla 3 ay boyunca verilen D vitamini takviyesinin, D vitamini seviyesini ve insülin salınımını arttırdığını göstermiştir. PKOS'lu 46 hastada 24 hafta süresince haftalık 20.000 IU kolekalsiferol verilerek yapılan bir pilot çalışma, serum 25(OH)D seviyelerinde artış olduğunu göstermiştir (Wehr E vd 2011). Açlık ve uyarılmış glukozda belirgin düşüşler olmasına rağmen açlık ve uyarılmış insülin ile HOMA seviyeleri değişmemiştir. Ancak bu çalışmada yer alan VKİ'leri düşük ve ciddi anlamda İD olmayan hastalar olduğu için anlamlı bir etki görülmemiş olabilir. D vitamini takviyesinin PKOS'lu obez kadınlarda insülin direnci ve insülin salınımı üzerinde olumlu bir etkisi olabileceği düşünülmektedir.



## 2.5. İnflamasyon ve Polikistik Over Sendromu

Son yıllarda PKOS gelişmesinde anormal sitokin üretimi ve TNF-a, IL-6 gibi pro-inflamatuar ve IL-10, IL-18 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin arasındaki dengenin de bozulmuş olabileceği öne sürülmektedir (Amato G vd 2003, Mohling M vd 2004). Sitokinler normal gebeliğin sürdürülmesi, normal over fonksiyonlarının düzenlenmesi, hücre büyümesi, immünolojik ve inflamatuar reaksiyonların regülasyonu gibi olaylarda önemli rolü olan güçlü mediatörlerdir. Plasenta, amnion, desidua gibi gestasyonel dokularda, korpus luteum ve granuloza hücrelerinde birçok farklı sitokin üretilmektedir (Krystle Ebejer and Jean Calleja-Agius 2013). Ayrıca sitokinler, endotel bütünlüğü ve normal endotel fonksiyonlarının kontrolünde ana role sahiptirler. Sitokinlerin plazma düzeyleri, üretimlerinden sorumlu olan genlerin promotör bölgelerindeki genetik polimorfizm ile yakından ilgilidir.

PKOS patogeneğinde androjen artışının inflamasyona neden olduğu belirtilse de yapılan diğer çalışmalarda inflamatuvar moleküllerin androjen sentezini artırdığına dair bulgular yer almaktadır (Arosio B vd 2004). Yapılan araştırmalarda androjenin, insulin sinyal iletiminde değişikliklere yol açarak adipozitlerde karbohidrat ve lipit metabolizmasında etkin enzimlerin sentezinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca androjenlerin adipoz dokunun immün fonksiyonlarında değişikliklere ve preadipozitlerin adipozitlere dönüşümünde rol oynadıkları bildirilmiştir (Corto'n M 2007). PKOS'ta meydana gelen androjen artışının adipoz doku mononükleer hücrelerinde glukozu duyarlılığı artırdığı ayrıca glukozun da adipoz dokuda mononükleer hücrelerin aktive olmalarına neden olduğu gösterilmiştir (Corto'n M vd 2007, Gonza'lez F 2012). Mononükleer hücrelerin dönüşümü ile oluşan makrofajlardan TNF-a gibi inflamatuvar sitokinlerin salgılandığı gözlenmiştir (Gonza'lez F vd 2005, 2006). Makrofajlar dışında adipoz dokudan da salgılanan TNF-a'nın, teka hücrelerinde proliferasyon meydana getirdiği ve steroid sentezini de artırdığı bildirilmiştir (Spaczynski RZ vd 1999).

TNF-a dışında adipoz dokudan salgılanan birçok molekül inflamasyon ve insulin direnci gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bu hastalarda adipositokinlerden visfatin mRNA düzeyinin artmış, serum adiponektin düzeyinin azalmış, leptin düzeyinin ise artmış olduğu gösterilmiştir (Cekmez F vd 2011, Plati E vd 2010). PKOS'lu hastalarda adipositokinlerin insulin direnci, T2DM, obezite, ateroskleroz gibi metabolik sendrom komponentlerinin oluşumunda rol oynadıkları bilinmektedir (Carmina E vd 2006). Başka bir çalışmada (Xiong YL vd 2011) PKOS'lu hastalarda adipositokin ve inflamatuvar

belirteçlerin değişimine ek olarak over dokusunda inflamasyon oluştuğunu immunohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Bu çalışmada, normal VKİ'ye sahip PKOS'lu hastaların over dokularında çok sayıda inflamatuvar hücre bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca hastaların serum örneklerinde TNF-a ve IL-6 gibi inflamasyon belirteçlerinin, VKİ'si normal olan kontrol grubuna göre çok yüksek olduğu belirtilmiştir.

## 2.6. Tümör Nekrosis Faktör-Alfa

İlk olarak 1984 yılında aktif makrofajlardan izole edilmiş bir sitokindir. TNF-a, 6p21.3 kromozomu üzerinde bulunan gen tarafından üretilen, ileri derecede pleiotropik (tek bir sitokin birden çok hücre tipi üzerine etkili olabilir), 17-70 kDa ağırlığında bir sitokindir (Male D vd 1996). Homotrimer bir yapıya sahip olan TNF-a, özellikle makrofajlar ve monositler olmak üzere fibroblast, endotel hücreler, adipositler, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilmektedir (MacEwan DJ 2002). TNF-a biyolojik aktivitesini, transmembran monomer tümör nekrosis alfa (mTNF-a) (26 kDa) ve soluble tümör nekrosis alfa (sTNF-a) (17kDa) formlarında göstermektedir. mTNF-a, hücre yüzeyindeki tümör nekrosis alfa dönüştürücü enzim (TACE) ile proteolitik olarak sTNF-a molekülüne dönüştürülmektedir (Kriegler M vd 1998, Black RA vd 1997). Hem mTNF-a hem de sTNF-a septik şok, romatoid artrit, otoimmün hastalıklar ve insülin direnci gibi inflamatuvar bozuklukların patogeneğinde, IL-1 ve IL-6 ile birlikte sitokin kaskadını harekete geçirmede rol oynamaktadır. Damar endotel hücrelerinde vasküler hücre adhezyon molekül 1 (VCAM1), intersellüler adhezyon molekül 1 (ICAM1) ve E-selektin gibi adhezyon moleküllerinin sentezini arttırmaktadır (Youn BS vd 2009). Ayrıca hücre farklılaşması ve proliferasyonu, apoptozis, nekrotik hücre ölümü, tümör oluşumu, viral replikasyon, enerji metabolizması ve immün sistem fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi çok farklı süreçlerde görev almaktadır (Guo R vd 2015).

TNF-a etkisini, TNFR1 ve TNFR2 (tümör nekrosis faktör alfa reseptörleri 1 ve 2) aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bu reseptörler glikoprotein yapıdadır ve transmembran olarak yerleşim göstermektedirler. TNFR'lerin bulunduğu reseptör ailesinde hücre dışı bölümleri homoloji gösterirken hücre içi kısımlarda farklı yapılar bulunmaktadır. (Barrett KE 1996). TNFR'lerin hücre dışındaki bölümleri sistein aminoasidinden zengin tekrarlayan alt birimlerden (CRDs) oluşmaktadır. Bu alt birimler CRD1, 2, 3 ve 4 olarak isimlendirilmektedir. CRD1, TNFR'nin birbirine bağlanmasını sağlayan, 'preligand association domain' (PLAD) adı verilen ve ligand-reseptör ilişkisini güçlendiren yapısını oluşturmaktadır. TNF-a, TNFR'nin ligand bağlayan CRD2 ve CRD3 alt birimine

bağlanmaktadır. Daha sonra oluşan PLAD'lar birbirlerine bağlanarak reseptör zincirleri arasında etkileşime neden olmakta böylece ligand reseptör ilişkisi kuvvetlenmektedir (Chan FK vd 2000, Wu H, Siegel RM 2011). TNFR1'in tüm hücre tiplerinde TNFR2'nin ise oligodendrosit, astrosit, T hücreleri, miyosit, timus hücreleri, endotelial hücreler ve insan mezenkimal kök hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir (Speeckaert MM 2012).

TNF-a'nın adipoz doku farklılaşması ve insulin direnci ile ilişkili bir adipositokin olduğu bilinmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda TNF-a'nın adipoz dokuya yağ asitlerinin alınmasını sağladığı ve lipogenez ile ilgili enzim genlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Adipositlerin olgun adipositlere dönüşümünü sağlayan aP2, adipisin gibi genleri de inhibe ettiği gösterilmiştir (Moller DE 2000). İnsülin, etkilerini intrinsek tirozin-kinaz aktivitesi bulunan insülin reseptörüne (IR) bağlanarak göstermektedir. İnsülin, reseptörüne bağlandığı zaman tirozin-kinaz aktivitesi ile reseptör otofosforile olmakta ve hücre içerisinde insülinin metabolik etkilerini göstermesini sağlayan insülin reseptör substratı-1/2 (IRS-1/2)'in fosforilasyonuna neden olmaktadır. Böylece insülinin protein, lipid ve glikojen sentezi, glukozun dokulara alınımı gibi tüm metabolik etkileri ortaya çıkmaktadır. TNF-a ise insulin sinyal iletiminde postreseptör düzeyde IRS-1/2'nin fosforilasyonunu değiştirmektedir. İnsulin sinyal iletimi, tirozin-kinazın IRS1/2'yi tirozin aminoasidi üzerinden fosforile etmesiyle devam etmektedir (Corbould A 2002). TNF-a, IRS1/2'nin tirozin aminoasidi üzerinden değil serin aminoasidi üzerinden fosforilleyerek insulin sinyal iletim bozukluğuna ve insulin direncine neden olmaktadır. TNF-a etkisiyle özellikle GLUT-4 (glukoz taşıyıcı tip-4) ekspresyonunun azaldığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Moller DE 2000, Corbould A vd 2005). TNF-a, aynı zamanda PPAR-  $\gamma$  (peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör gama) aracılığıyla adipositler üzerinde etkilerini göstermektedir. PPAR- $\gamma$ , adipozitlerde insülin ve glukoz metabolizması açısından kilit rolü bulunan bir moleküldür. Adipoz dokudan salınan TNF-a transkripsiyonel olarak PPAR-  $\gamma$  mRNA ekspresyonunu inhibe etmektedir. TNF-a'nın biyolojik etkisi konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda (~10<sup>-9</sup>M) TNF-a, lokal olarak immüno-inflamasyonun otokrin ve parakrin düzenleyicisidir (Xiong Y vd 2011). Yüksek konsantrasyonlarda TNF-a, endokrin hormon gibi etki etmektedir. TNF-a; IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10'nun sentezini artırır. Ayrıca endotoksin, IL-1, TNF-a ve IL-6 da TNF-a sekresyonunu arttırmaktadır. Aynı zamanda TNF-a üretimi IL-10 tarafından inhibe edilmektedir (Xiong Y vd 2011). TNF-a'nın PKOS'ta meydana gelen inflamasyon ve insulin direnci ile ilişkili olabileceği anlaşılmaktadır.

## 2.7. İnterlökin 6

7p21-14 kromozomu üzerinde bulunan IL-6 genin ürünü olan IL-6 homodimer bir yapıya sahiptir. Moleküler konfigürasyonu tamamen bilinmeyen IL-6, 4 alfa heliks uzun zincir ailesine ait olan multifonksiyonel ve pleiotropik etkili bir sitokindir (Guo R vd 2015). Moleküler ağırlığı 20-29kDa arasında değişmektedir. IL-6 molekülü, reseptörü olan gp130 reseptörüne bağlandıktan sonra JAK/STAT yolu aktiflenir. Daha sonra JAK ligandı üzerinde bulunan fosfor atomu SHP2 domainine aktarılarak SHP2' nin aktiflenmesi sağlanır. Bundan sonra sırasıyla SOS, Ras, Raf, MEK ve MAPK yoluyla ilgili genin transkripsiyonu yapılır. Bu birinci yoldur. Diğer bir yolda ise JAK molekülü yine fosfat grubunu STAT ligandına verir ve iki STAT molekülü birbirine bağlanarak ilgili genin transkripsiyonunu başlatır (Barrett KE 1996).

IL-6, T ve B lenfositler, monositler, makrofajlar, endotel hücreler, epitel hücreler, fibroblastlar ve birçok başka hücre tarafından salgılanmaktadır (Lin Y S 2011). IL-1b ve TNF-a gibi IL-6 da immünoinflamatuvar cevabın düzenlenmesinde ve savunmada önemlidir.

Hepatositlerde akut faz cevabın artmasında rol oynamaktadır. Bu etkisini CRP, haptoglobin, fibrinojen ve proteaz inhibitörleri gibi akut faz proteinlerinin üretimini arttırarak gerçekleştirir. IL- 6 endotel hücrelerde intersellüler adhesyon molekülü 1 (ICAM-1) ve VCAM-1 ile E-selektin moleküllerinin ekspresyonunu arttırarak endotel hücrelerinin lenfositlere yapışmasını arttırır. IL-6 hipofize etki ederek ACTH salınımını indükler ve ayrıca direkt olarak adrenal bezlere etki ederek glikokortikoid üretimine neden olur (Barrett KE 1996). Bu etkilere ilaveten, IL-6 hematopoiezi arttırır, ateşin yükselmesine neden olur, böbrek mesengial hücre proliferasyonunu arttırır, doğal ve kazanılmış immünitede rol alır, kazanılmış immünitede B hücrelerinden antikor üretimini indükler, hepatosit ve sinir hücrelerinin rejenerasyonunda etkilidir, embriyonel gelişim ve fertilitede önemlidir (Heinrich PC 1998, Eser B 2017).

IL-6 endometriumun proliferasyon fazında zayıf bir şekilde salgılanırken sekresyon fazının ortasında özellikle endometrium bez ve lümen epitelinde kuvvetli bir şekilde salgılanmaktadır (Jasper MJ 2007). IL-6 reseptörlerinin varlığı menstrual döngü boyunca ağırlıklı olarak bez epitelinde olmak üzere stromada da gösterilmektedir (Tabibzadeh S 1995, Eser B 2017).

## 2.8. İnterlökin-1 Beta

İnterlökinler lökositler arasındaki hücrel iletişimde oynadıkları rol ile immün sistemin polipeptit sitokin komponentleridir. IL-1 sistemi temelde 2 biyoaktif ligant; IL-1a, IL-1b ve 2 reseptör IL-1R1, IL-1R2 ile IL-1'in biyolojik aktivitesini düzenleyen doğal bir reseptör antagonisti IL-1RA'dan oluşmaktadır.

Siklik ovulasyon sürecinin geniş çaplı bir inflamasyon reaksiyonu olduğu varsayılmaktadır. IL-1 ailesinin bu süreçte anahtar mediatör rolde olabileceği düşünülmektedir. IL-1b'nin granuloza ve teka hücrelerinin proteaz sentezi gibi hücrel aktivitelerinin plazminojen aktivatörü, prostaglandinlerin regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Hurwitz A vd 1993, Bonello NP 1995, Karakji EG ve Tsang BK 1995). Ayrıca IL-1b steroidogenezi de regüle ettiği gösterilmiştir (Brännström M 1993). Diğer taraftan, IL-1b'nin sıçanlarda ovulasyon sürecinin destekleyicisi olduğu gösterilmiştir. IL-1b'nin tek bir oositte LH ile indüklenmiş in vitro mayoz tetiklenmesini inhibe ettiği görülmüştür (Martoriati A vd 2002). Tüm bunlar dikkate alındığında memeli türlerinde de IL-1'in ovulasyon ve oosit maturasyonuna öncülük eden kaskada dahil bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

Martoriati A vd (2003) yapmış oldukları araştırma ile granuloza hücrelerinde IL-1b sistemine ait gen ifadelerini ve folliküler sıvıdaki IL-1b içeriğini follikül olgunlaşması sırasında incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları IL-1b, IL-1R2 ve IL-1RA genlerinin granuloza hücrelerinde ifade edildiğini ve IL-1b ve IL-1RA mRNA içeriğinin terminal folliküler olgunlaşma sırasında değiştiğini fakat IL-1R2 mRNA düzeyinin aynı kaldığını göstermektedir. IL-1b'nin folliküler sıvıdaki içeriğinin ovulasyonun indüksiyonunu takiben birkaç saat içinde dalgalandığını görmüşlerdir. Buradan yola çıkarak granuloza hücrelerindeki IL-1b gen ifadesi ve folliküler sıvıdaki IL-1b içeriğinin gonadotropinlerce regüle edildiğini ve IL-1b'nin ovulasyona dahil olan "intermediate paracrin factor" olduğu söylenebilir (Martoriati A 2003).

## 2.9. Hipotez

H1: D vitamini, PKOS oluşum mekanizmasında rol oynayan IL-1, IL-6 ve TNF-a sitokinlerinin artan ekspresyonlarını düşürür.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Hayvanlarının Bakımı

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından PAUHDEK-2015/03 numarasıyla onaylanmıştır. Çalışmamızda, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi'nden temin edilen 34 adet 21 günlük prepubertal Wistar tipi albino dişi sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler için önerilen optimum çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlanmış ve sıçanlar, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü ile, %60-70 nem ve 20-24°C oda ısısı koşullarını sağlayan bir odada kafeslere yerleştirilmiştir. Denekler, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemler (purina) verilerek *ad libitum* beslenmiştir.

#### 3.2. Deney Gruplarının Ayrılması ve Deneysel PKOS Oluşturma İşlemi

Sıçanlar ağırlıkları (~45-50 g) ölçüldükten sonra rastgele olarak 5 gruba ayrılarak işaretlenmiştir.

Deneysel PKOS oluşturma işleminde trans-dehydroandrosterone(Sigma, St. Louis, MO, USA) kullanılmıştır. Yaklaşık 50 g'lık sıçanlarda 3 mg miktarında DHEA %95'lik 0,01 ml ethanolde çözünmesi sağladıktan sonra 0,09 ml susam yağı ile karıştırılarak 20 gün boyunca her gün subkutan enjeksiyonla verilmiştir. 3 gün aralıkla sıçanların ağırlıkları ölçülmüştür ve varsa, değişime göre doz ayarlaması yapılmıştır.

I.grup(N=6): Kontrol grubu olarak belirlenmiştir ve sadece susam yağı (0.2 ml/100 g), subkutan enjeksiyon ile 20 gün boyunca her gün sabah verilmiştir. Enjeksiyonun 10. gününden itibaren kalan 10 gün boyunca her gün sabah vajinal smear örneği alınarak sıçanların siklusları tespit edilmiştir. 21. günde enjeksiyon sonlandırılarak overler alınmış ve hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

II. grup (N=6): PKOS oluşturma amacıyla 20 gün DHEA (6 mg/100g/0,2ml susam yağı içinde) subkutan enjeksiyon ile verilmiştir. Enjeksiyonun 10. gününden itibaren kalan 10 gün boyunca her gün sabah vajinal smear örneği alınarak sıçanların siklusları tespit edilmiştir ve östrus siklusu görülmeyen sıçanlarda PKOS oluşturulduğu kabul edilmiştir. 21. günde enjeksiyon sonlandırılarak overler alınmış ve hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

III. grup (N=6): 20 gün boyunca, vitamin D (120 ng/100 gr) ve vitamin D enjeksiyonundan 2 saat sonra DHEA (6 mg/100 g /0,2 ml susam yağı içinde) subkutan enjeksiyonla verilmiştir. Enjeksiyonun 10. gününden itibaren kalan 10 gün boyunca her gün sabah vajinal smear örneği alınarak sıçanların siklusları tespit edilmiştir. 21. günde enjeksiyon sonlandırılarak overler alınmış ve hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

IV. grup (N=6): 20 gün boyunca DHEA (6 mg/100 g /0,2 ml susam yağı içinde) subkutan olarak enjekte edilmiştir. 20. günden sonra DHEA (6 mg/100 g /0,2 ml susam yağı içinde) uygulamasına ilaveten DHEA enjeksiyonundan 2 saat önce vitamin D (120ng/100 gr) 20 gün süresince subkutan olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun 10. gününden itibaren 20. güne kadar ve enjeksiyonun 30. gününden itibaren 40. güne kadar her gün sabah vajinal smear örneği alınarak sıçanların siklusları tespit edilmiştir. 41. günde enjeksiyon sonlandırılarak overler alınmış ve hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

V. grup (N=10): 20 gün boyunca vitamin D (120 ng/100 gr) subkutan enjeksiyonla verilmiştir. Enjeksiyonun 10. gününden itibaren kalan 10 gün boyunca her gün sabah vajinal smear örneği alınarak sıçanların siklusları tespit edilmiştir. 21. günde enjeksiyon sonlandırılarak overler alınmış ve hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

### **3.3. Vajinal Smear Örneklerinin Alınması ve Menstrual Siklus Evrelerinin Belirlenmesi**

I.,II.,III.,IV.,V.' gruplardan deneyin 10. gününden itibaren 21. gününe kadar, ayrıca IV. gruptan 30. günden 40. güne kadar smear örnekleri alınarak menstrual siklus evreleri belirlenmiştir.

Smear örnekleri her bir sıçandan sabah saatlerinde günlük olarak alınmıştır. 1ml steril pastör pipeti içerisine ~0,3 ml SF çekilmiş ve sıçan dorsalinden, avuç içinde tutularak pipetle vajinadan giriş yapılmış çok ilerlemeden SF sıvısı verilmiş ve pipete tekrar geri çekilmiştir. Pipetin içine alınmış olan salgı örneği bir lam üzerine damlatılıp yayma yapılarak bir tabla üzerinde oda sıcaklığında kurutulmuştur. Deney gruplarından

alınır kurutulmuş örnekler aynı gün içerisinde Diff-Quick boyama kiti (REASTAIN® Quick-Diff Kit, Lot: 102164) ile şu protokole uyarak boyanmıştır:

- a.) Kuruyan lamlar fiksatif (metanol) ile dolu cam şale içerisine dizildi.
- b.) Lamlar 10 dakika fiksatifte bekletildi.
- c.) Lamlar fiksatiften alınarak boyama kitinden çıkan kırmızı çözeltide (Quick-Diff-red) 5 dakika bekletildi.
- d.) Kırmızı çözeltiden alınan lamlar hızlı bir şekilde süzdürüldü.
- e.) Lamlar mavi çözeltime koyularak 15 saniye bekletildi.
- f.) Hızlı bir şekilde 2 kere sudan geçirildi ve fazla boyası alındı.
- g.) Lamlar altları silinerek 37°C'de tablaya koyuldu ve kurutuldu.
- h.) Kuruyan yayma preparatları ışık mikroskopunda görüntülenerek fotoğraflandı ve siklusları belirlendi.

#### **3.4. Dokuların Hazırlanması ve Kesitlerin Alınması**

Sıçanlar, ağırlıkları tekrar ölçülerek, 30 mg/kg ketamine hydrochloride ve 6 mg/kg %2'lik xylazine hydrochloride kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmasıyla sağlanan genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edilmiştir. Sol ovaryumlar 500 µl trizol eklenen eppendorf tüplerine koyulup PZR çalışmasında kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Sağ ovaryumlar doku sağlama kasetlerine alınarak %10'luk formaldehitte (Tekkim Formaldehit, Lot: 070312510) tespit edilmiştir. Işık mikroskobu takip yöntemi uygulanarak parafine gömülen bloklardan, Leica RM-2125 Rotary Microtom cihazı ile 3 mikrometre kalınlığında kesitler lizinli lamlara (Marienfeld Laboratory Glassware Histobond (+), Lot: 23573 ) alınmıştır. Daha sonra kesitlere, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1b aktivasyonlarını belirlemek için immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulanmıştır. Kesitler daha sonra Olympus BX-51 ışık mikroskobu ve Olympus PP72 Digital Kamera ataçmanı ile incelenerek şekillenmiştir.

#### **3.5. Fiksatif Çözelti Hazırlanması**

%37-%40'lık formaldehit çözeltisinden % 10'luk fiksatif çözeltiyi hazırlamak için kullanılan formül



$$= \frac{\text{istenilen konsantrasyon}}{\text{bilinen konsantrasyon}} \cdot \text{Elde edilmek istenen miktar}$$

%40'lık formaldehit çözeltisinden %10'luk fiksatif çözeltisi hazırlamak için,

$$\frac{10/100}{40/100} \cdot 1000 \text{ ml} = 250 \text{ ml}$$

Formülden bulunan değer (250 ml) miktarında %40'lık formaldehit çözeltisinden koyularak üzeri 750 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Doku takibinde kullanılan ksilen ve etil alkol Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır.

- a) Alınan dokular formaldehitde 1 gece bekletildi.
- b) Akarsuda 30 dakika yıkandı.
- c) %70'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- d) %80'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- e) %90'lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- f) %100'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- g) Ksilende 1 saat bekletildi.
- h) Ksilende 1 saat bekletildi.
- i) Parafinde 1 saat bekletildi.
- j) Parafinde 1 saat bekletildi.
- k) Dokulara parafinle gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

Doku takip yöntemi tamamlanan ovaryum bloklarından, immunohistokimyasal boyama için mikrotom cihazıyla 4 µm'lik kesitler alınmıştır.

### 3.6. İmmunohistokimyasal boyama

Reaktifler için Histostain-Plus kit (Lot: 1018708A, Invitrogen) kullanılmıştır.

- a) Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
- b) Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 saat bekletildi.
- c) Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
- d) Kesitler sırasıyla %100, %96, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
- e) Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- f) Antijen retrieval işlemi için sitrat tamponu kullanıldı. Kesitler 3\*7 dakika 700w mikrodalgada kaynatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
- g) 10 dakika PBS'de bırakıldı.
- h) Bu sırada PAP pen ile dokular işaretlendi.

- i) Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
- j) Lamlar 3 defa 2 dakika PBS ile yıkandı. Üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu (reagent A) ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- k) Kesitler üzerine uygun primer antikörler ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikörler şu şekildedir: IL-1b (1:100, Lot: F2212, Santa Cruz Biotechnology) ,TNF-a (1:100, Lot:NB600-587, Novus Biotechnology) ve IL-6 (1:100, Lot: NB600-1131). Bütün primer antikörler PBS ile dilüe edilmiştir.
- l) Kesitler, PBS ile yıkandıktan (2 dkX3) sonra primer antikörlerle reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikörlerle (Reagent B) 20 dakika muamele edilmiştir.
- m) Tekrar PBS ile yıkaması (2 dkX3) yapılan kesitlere, biotinlenmiş-sekonder antikörlere kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) (Reagent C) 10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- n) Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan (2 dkX3) sonra kromojen boyası DAB-Plus Substrate Kit (Lot: 1018723A, İnvitrogen) ile 3-10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- o) Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merks Harris) ile zıt boyama yapılmıştır.
- p) Kesitler akarsuda yıkanmış ve sırasıyla %70, %80, %90, %100'lük etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilmiştir.

Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilen II'de 2 şer dakika bekletilmiştir.

- q) Ksilenden alınan dokuların üzeri kuruması beklenilmeden entellan ile kapatılmıştır.

Boyanmanın değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanılmıştır.

(+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (/+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok, (/): o yapıya rastlanmamıştır.

### 3.7. Hematoksilin Eozin Boyama

- a) Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
- b) Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 saat bekletildi.
- c) Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.

- d) Kesitler sırasıyla %100, %96, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
- e) Alkolden çıkan preparatlar distile suda 10 dakika bekletildi.
- f) Hematoksilende 4 dakika bekletildi ve ardından akan suda yıkandı.
- g) Asit-alkol çözeltisinden 10 saniye geçirildi ve ardından akan suda yıkandı.
- h) Amonyaklı suda 10 saniye bekletildi ve ardından akan suda yıkandı.
- i) Eozinde 1 dakika bekletildi ve akan suda yıkandı.
- j) %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
- k) Kurutulduktan sonra ksilolde 10 dakika bekletildi ve entellan ile kapatıldı.

Folikül sayımı için ovaryum uzun kesilerek %10luk formalde tesbit edilmiştir ve 5 µm'lik kesitler alınarak HE boyanmıştır. Her gruptan 3 kesit sayım için değerlendirilmiştir.

### 3.8. Trizol ile RNA İzolasyonu

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve uygulama gruplarında RNA izolasyonu Trizol ile gerçekleştirilmiştir.

- a) Doku örnekleri küçük parçalara ayrılarak homojenize edilmiş ve 1,5 ml Eppendorf tüplerine alınıp üzerine 500 µl olacak şekilde Trizol uygulanmıştır.
- b) Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve pipetle iyice karıştırıldıktan sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir.
- c) Soğutmalı santrifüj ile +4°C' de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası RNA bulunduğu renksiz olan üst faz ayrı ependorf tüplere aktarılmıştır.
- d) Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenerek pipetleme işlemi yapılmış ve 10dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- e) İnkübasyon sonrası tüpler +4°C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- f) Santrifüj sonrası supernatan kısım uzaklaştırılmıştır. Peletin üzerine %70'lik etanol eklenerek ve +4°C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılmıştır.
- g) Santrifüj sonrası supernatant atılmış ve kalan etanolün uzaklaştırılmıştır.
- h) Kalan pelet üzerine 40 µl RNaz-DNaz içermeyen su eklenerek, RNA elde edilmiştir.
- i) RNA çalışmaları gerçekleştirilene dek -20°C'de saklanmıştır.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo, USA) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işlemi; 1µl nükleazdan arındırılmış distile su Nanodrop cihaz kadesi üzerine bir damla halinde

pipetlenmiş ve bilgisayardaki program analizi ile körleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra ilgili RNA örneklerinden 1µl alınarak, cihazın RNA ölçüm programı seçilmiş ve konsantrasyonları ölçülmüştür.

### 3.9. c-DNA sentezi

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi 'High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits' (Lot No: 00325690 AB Applied Biosystems Lithuania) ile oligo d (T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım prosedürü Tablo 3.1'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 50°C' de 1 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmesi için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) işlemine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

**Tablo 3.1** cDNA Sentez Karışımı

Bileşen	Hacim
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3,2 µl
Son hacim	10 µl

### 3.10. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR)

Bu çalışmada 96 kuyucuklu mikroplaka okuyabilen Gerçek Zamanlı PZR sistemi kullanılmıştır. Sistemde, SYBR Green metodu kullanılmıştır.

Gerçek-zamanlı PZR işleminde, "*TNF-Alpha*, *IL 1-beta*, *IL-6*" genlerinin mRNA düzeyindeki gen ekspresyonu değişimi araştırılmıştır. Bu genlere ait forward ve reverse dizileri tablo 3.2'de özetlenmiştir. Bunun için housekeeping gen olan *GAPDH* geni çalışmamızda kullanılmıştır. Reaksiyon aşamasında, her bir kuyucuk başına "5 µl SYBR

Green” (Applied Biosystem, USA), “6.5 µl moleküler biyolojik saflıkta su”, “1.5 µl cDNA”, “1 µl Forward Primer” ve “1 µl Reverse Primer” kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımları 96-kuyucuklu plakaya aktarılmış ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle kapatılmıştır. StepOne Plus gerçek-zamanlı PCR cihazına yüklenen plaka, 95°C’de 10 dk, 40 döngü olacak şekilde 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 10 dk olacak şekilde amplifiye edilmiştir.

**Tablo 3.2** Çalışmada kullanılan 4 adet genin forward ve reverse primer dizileri

	<b>GEN İSMİ</b>	<b>PRİMER DİZİ</b>
<b>1</b>	<i>GAPDH</i>	Fw: TCATCTCCGCCCTTCCGCT Rw: GAGCAATGCCAGCCCCAGCA
<b>2</b>	<i>IL-6</i>	Fw: TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC Rw: TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
<b>3</b>	<i>IL-1 beta</i>	Fw: CACCTCTCAAGCAGAGCACAG Rw: GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
<b>4</b>	<i>TNF-alfa</i>	Fw: AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC Rw: TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC

### 3.11. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tüm deneklerin ovaryum kesitlerinde korpus luteum primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve kistik follikül sayımı yapıldı. Tüm değerler tablo, mean±standart error olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kruskal Wallis, iki grup arasındaki farklılık Mann-Whitney U ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 21 paket programı kullanılmıştır. P<0,05 kabul edilmiştir.

MA Web tabanlı “RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanılmıştır. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun ±3SD karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Bu sayede, gen ekspresyonu karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ile ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlenmiştir. Grupların karşılaştırılması “RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan “Student t-testi” analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hematoksilen Eozin Boyama

Grup 1'de ovaryum dokusunda gelişimin her aşamasında folliküllere rastlanmıştır. Sekonder ve tersiyer folliküllerde granuloza tabakasının kalın ve normal görünümde olduğu izlenmiştir. Ovaryum stromasındaki hücreler ve lifler normal görünümde izlenmiştir (Şekil 4.1).

Deneysel olarak Polikistik over oluşturulan grupta (grup 2) kistik folliküllerin varlığı belirlenmiştir. Bu folliküllerde granuloza hücre katmanlarında incelleme, hücrelerde dejenerasyon ve hücreler arasında ayrılmaların olduğu dikkati çekmiştir. Bazı kistik folliküllerde granuloza hücrelerinin çevrelediği antrumlarının genişlediği dalgalı bir görünüm oluşturduğu belirlenmiştir. Bu grupta ovaryum stromasında yer yer hücre azalmaları olduğu ve bunların bazı alanlarda boşluklar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2, 4.3).

Polikistik over oluşturmak için DHEA ile birlikte koruyuculuğunu test ettiğimiz vitamin D'nin aynı anda verilmeye başladığı grup 3'te (kısa süreli grup) kistik görümlü folliküllerin halen devam ettiği ancak bunların sayısının grup 2'ye karşı daha az olduğu belirlenmiştir ( $p=0,009$ ). Bu grupta da ovaryum stromasında hücresel azalmanın devam ettiği ancak grup 2 ile karşılaştırıldığında daha az olduğu belirlendi (Şekil 4.4).

DHEA ile deneysel polikistik over uygulamasından 20 gün sonra D vitamini verilmeye başlanan grup 4'te (orta dönem) kistik folliküllerin olduğu ve bunların sayısının tedavi edilmeyen polikistik overli grupta (grup 2) hemen hemen aynı olduğu bulundu ( $p=0,747$ ). Bu grupta ovaryum stromasında hücresel kayıpların çok olduğu ve grup 2'deki gibi boşluklar oluştuğu belirlenmiştir.

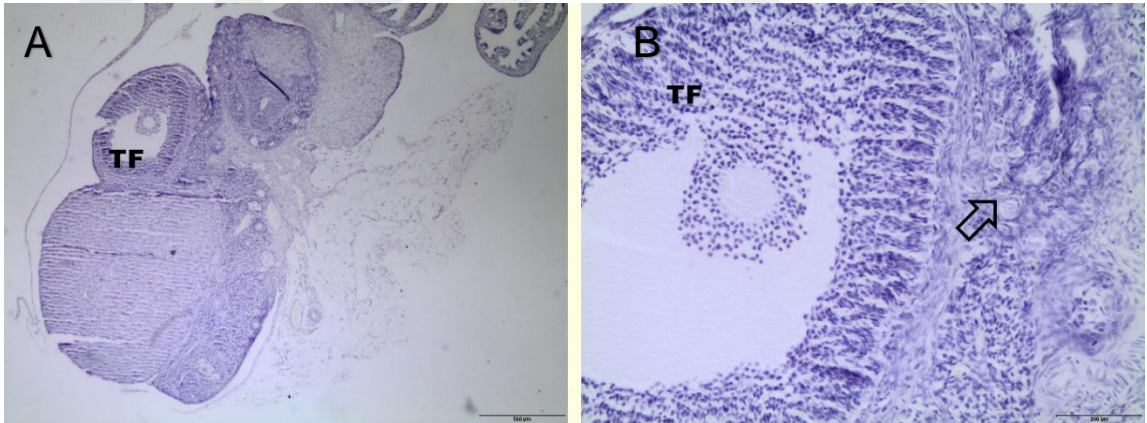
Yalnızca vitamin D verilen grupta kistik folliküllere rastlanmamıştır. Ovaryum stromasında bazı alanlarda hücresel kayıplar izlenmesine karşı bunların çok az olduğu dikkati çekmiştir. Gelişimin her aşamasındaki folliküllerin normal görünümünde olduğu granuloza hücrelerinde dejenerasyonun olmadığı belirlenmiştir.

Follikül sayımı 6 denek içeren her gruptan alınan kesitlerde yapılmıştır. Folliküller aşağıdaki verilen kriterlere uygun olarak belirlenmiştir.

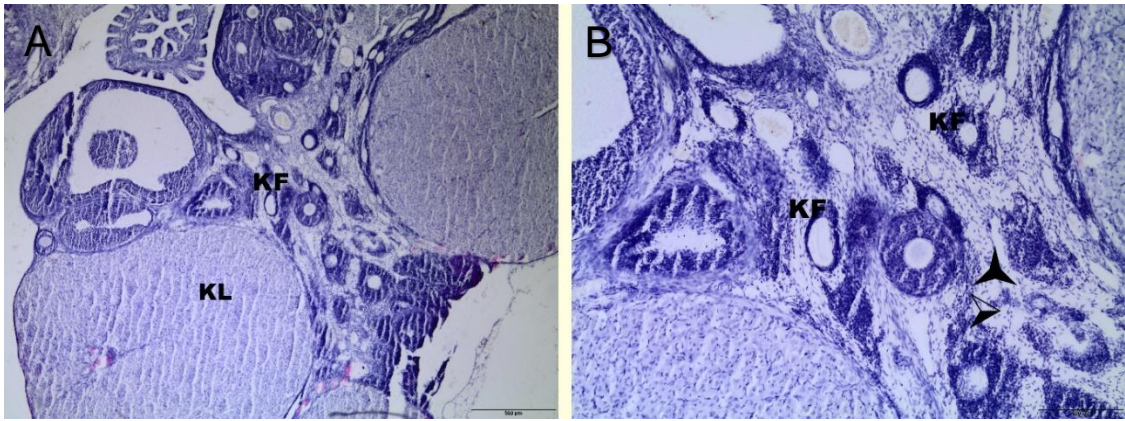
- 1) Primordial follikül: Tek katlı yassı epitelle çevrili folliküller
- 2) Primer follikül: Tek katlı kübik ya da daha fazla granuloza hücre tabakası içeren folliküller
- 3) Sekonder follikül: Granuloza hücre tabakasında boşluklar oluşan folliküller

- 4) Tersiyer follükül: Geniş antrumu olan ve kumulus ooforusu oluşan follükül  
 5) Kistik follükül: Granulosa hücre tabakası incelmış ve antrumu düzensizleşmiş follükül

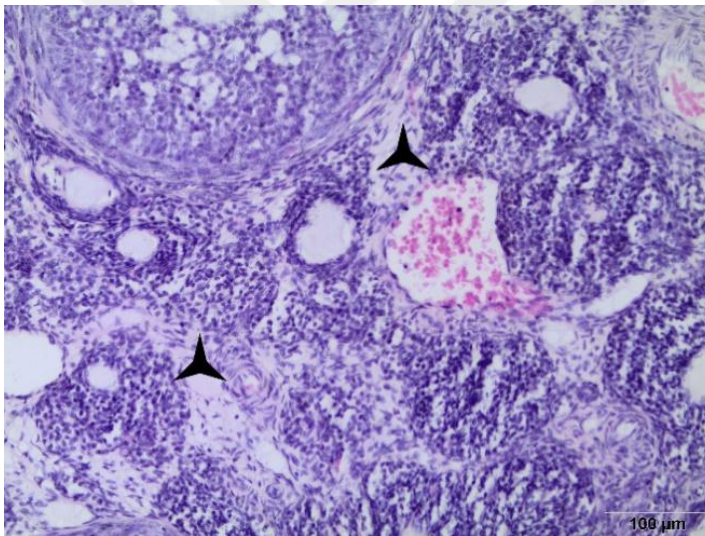
Buna göre primordiyal follükül en fazla grup 1 ve grup 5'te en az ise grup 2 ve grup 4'te izlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık ise grup 1 ile grup 2 ( $p=0,034$ ) ve grup 1 ile grup 4 arasında ( $p=0,014$ ) bulunmuştur (Şekil 4.7). Primer follüküller ise en fazla grup 1 de bulunurken istatistiksel anlamlılık grup 1 ile grup 4 arasında ( $p=0,005$ ) bulunmuştur (Şekil 4.8). Sekonder follüküller en fazla grup 3 ve grup 5'te bulunurken istatistiksel olarak anlamlılık grup 2 ile 3 ( $p=0,002$ ), grup 2 ile 5 ( $p=0,001$ ), grup 3 ile 4 ( $p=0,034$ ) ve grup 4 ile 5 ( $p=0,016$ ) arasında bulunmuştur (Şekil 4.9). Tersiyer follükülün ise en fazla grup 5'te 2. olarak da grup 3'te olduğu belirlenmiştir. En az tersiyer follükül ise grup 2'de bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan gruplar grup 2 ile 3 ( $p=0,031$ ) ve grup 2 ile 5 ( $p=0,01$ )tir. Grup 5'teki ve grup 3'teki tersiyer follükül sayısı grup 1'e karşın daha fazla olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.10). Kistik follüküller grup 2'de, grup 3'te ve grup 4'te sayıldı. Diğer gruplarda kistik follüküllere rastlanmadı. Bu üç gruptan en az kistik follükül grup 3'te olmasına karşın istatistiksel olarak bu azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.11).



**Şekil 4.1 A,B:** Grup 1 (kontrol) ovaryum dokusundan alınan kesitler (A,B). Tersiyer follükül;(TF), primordiyal follükül;(kalın ok). Hematoksilen –eosin. Bar=50  $\mu$ m

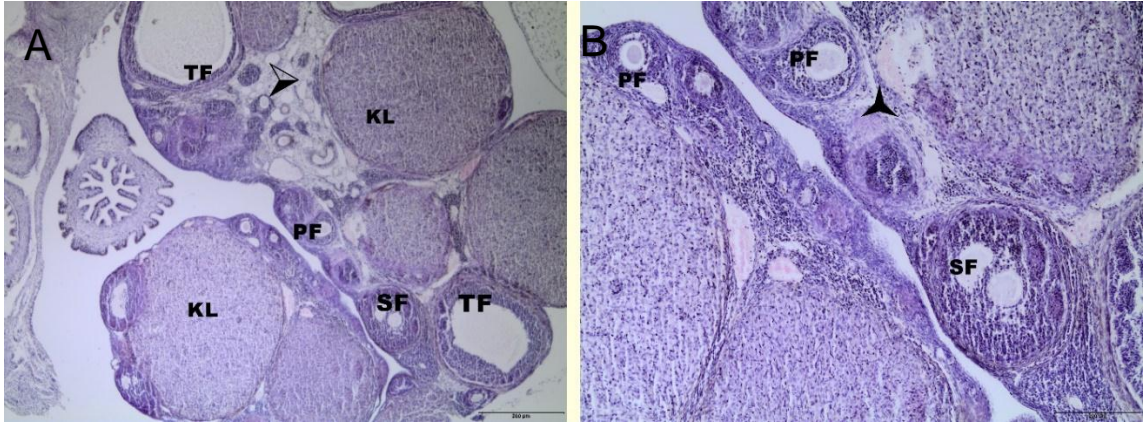


**Şekil 4.2** A ve B, deneysel olarak polikistik over oluşturulan Grup 2 ovaryum dokusundan alınmış kesitleri göstermektedir. Korpus luteum; (KL), Kistik follikül;(KF) ve stromada hücresel kayıplar ve açılmalar belirgin (ok başı). Hematoksilen-eosin. Bar=50µm

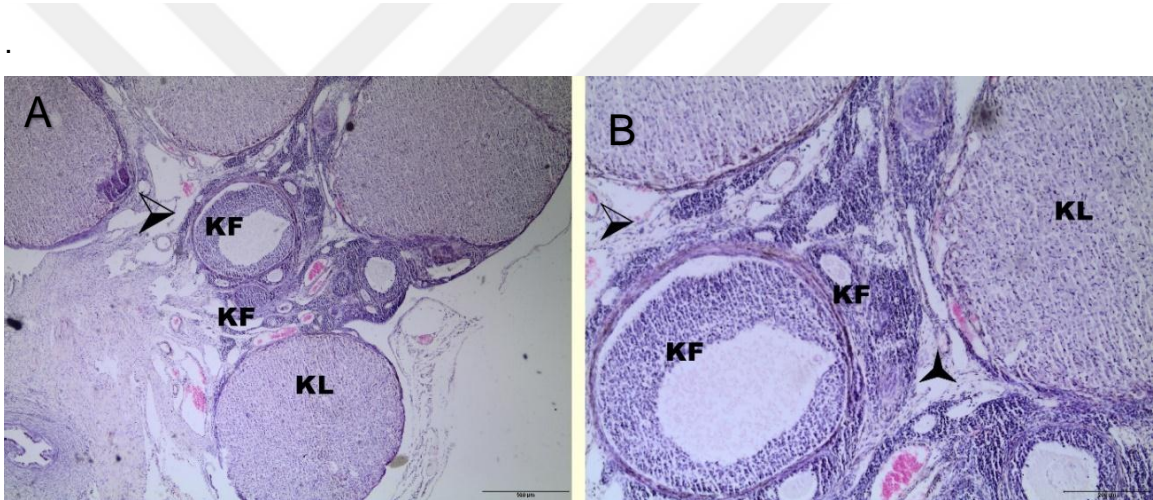


**Şekil 4.3** Deneysel olarak polikistik over oluşturulan Grup 2 ovaryum stroma dokusunda hücresel kayıplar (Üçgen) . Hematoksilen-eosin. Bar=100µm

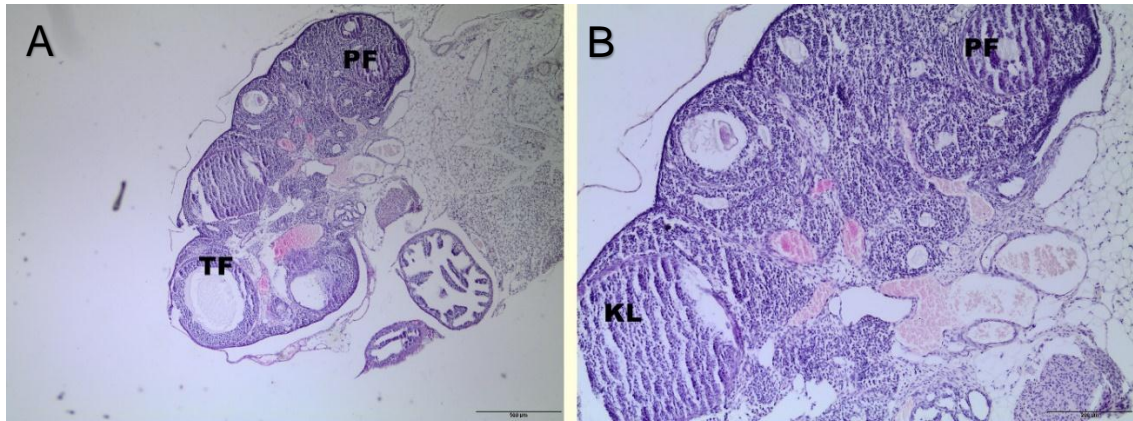




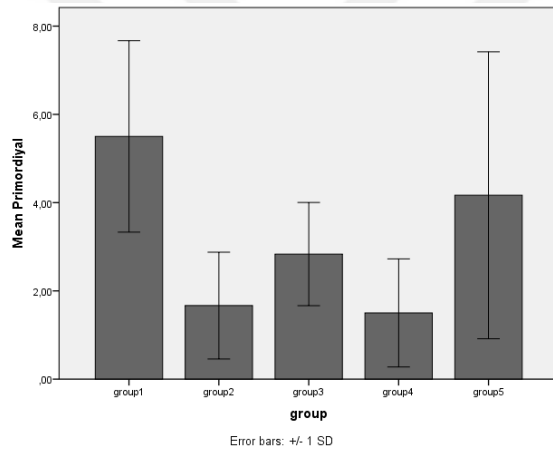
**Şekil 4.4** Polikistik over oluşturmak için DHEA ile birlikte D vitaminin aynı anda verilmeye başlandığı (kısa süreli grup) Grup 3 ovaryum dokusundan alınan ovaryum kesitleri (A,B). Primer follükül;(PF), sekonder follükül;(SF), tersiyer follükül;(TF), korpus luteum;(KL), hücresel kayıplar;(üçgen), dokudaki açıklıklar;(ok başı). Hematoksilen-eosin. Bar=50µm



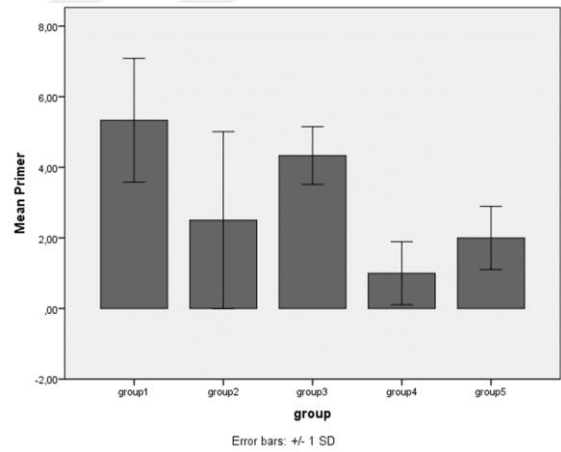
**Şekil 4.5** DHEA ile deneysel polikistik over uygulamasından 20 gün sonra D vitamini verilmeye başlanan (orta dönem) grup 4 ovaryum görüntüleri (A,B). Korpus luteum; (KL), Kistik follükül; (KF), hücresel kayıplar; (üçgen), dokudaki açıklıklar;(ok başı). Hematoksilen-eosin. Bar=50µm



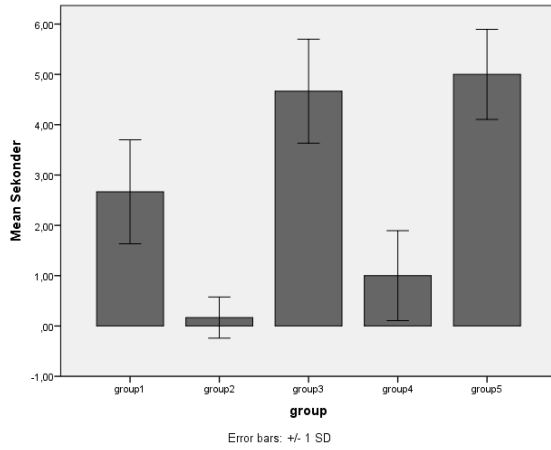
**Şekil 4.6** Yalnızca D vitamini verilen grup 5 ovaryumdan görüntü (A,B). Primer follikül;(PF), korpus luteum;(KL). Hematoksilen-eosin. Bar=50µm



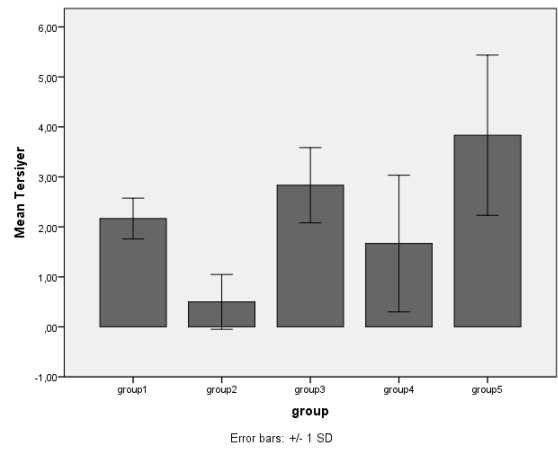
**Şekil 4.7** Grupların primordiyal follikül sayılarına göre karşılaştırılması:



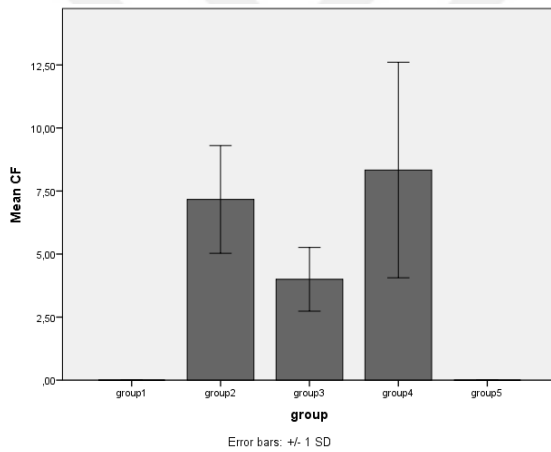
**Şekil 4.8** Grupların primer follikül sayılarına göre karşılaştırılması:



**Şekil 4.9** Grupların sekonder folikül sayılarına göre karşılaştırılması:



**Şekil 4.10** Grupların tersiyer folikül sayılarına göre karşılaştırılması:



**Şekil 4.11** Grupların kistik folikül sayılarına göre karşılaştırılması:

## 4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Sonuçlar tablo 4.1,4.2 ve 4.3'te özetlenmiştir.

### **Grup 1 (kontrol grubu)**

Bu grupta IL-1b, IL-6 ve TNF-a korusu luteumda, granuloza hücrelerinde, teka tabakasında ve ovaryum stromasında ve liflerinde negatif idi. Oositler IL-1b ve TNF alfa için negatif reaksiyon gösterirken IL-6 için kuvvetli reaksiyon gösterdi. Kan hücreleri tüm antikorlar için kuvvetli pozitif boyandı (Şekil 4.12, 13, 14).

**Grup 2**

Bu grupta da IL-1b, IL-6 ve TNF-a granuloza hücrelerinde, teka hücrelerinde, korpus luteumda, ovaryum stromasında ve liflerinde negatifti. Oositler IL-1b ve IL-6 için negatif reaksiyon gösterirken TNF-a için orta derecede pozitif reaksiyon gösterdi (Şekil 4.15, 16, 17).

**Grup 3**

Bu grupta IL-1b kan hücreleri dışında tüm yapılarda negatifti. IL-6 ve TNF-a granuloza hücrelerinde, teka tabakasında ve ovaryum stromal liflerinde negatif reaksiyon gösterirken oositlerde, korpus luteumda ve stromal hücrelerde orta derecede boyanma gösterdi (Şekil 4.18, 19, 20, 21, 22, 23).

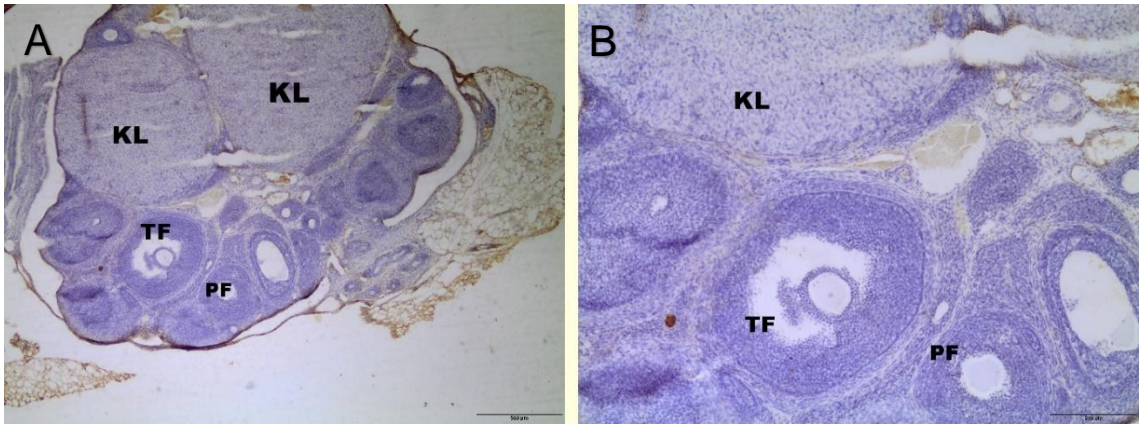
**Grup 4**

Bu grup diğer gruplarla karşılaştırıldığında boyanmanın her üç antikor içinde daha kuvvetli olduğu gözlemlendi. IL-1b oositlerde, teka tabakasında ve ovaryum stromal hücrelerinde negatif reaksiyon gösterirken ovaryum stromal liflerde de kuvvetli boyanmıştı. Korpus luteum hücrelerinin ise IL-1b için zayıf pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi.

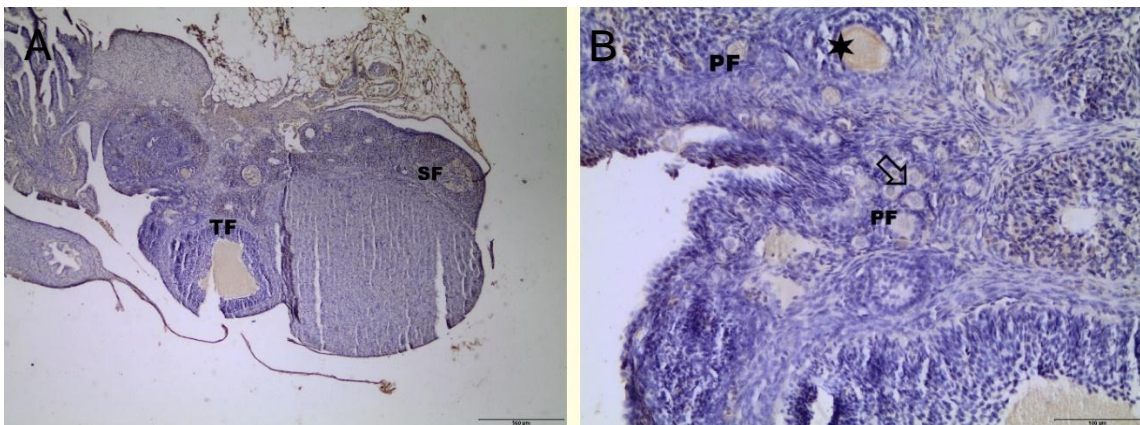
Bu grupta oositler, korpus luteum hücreleri ve ovaryum stromal lifler IL-6 ve TNF-a için kuvvetli reaksiyon gösterirken granuloza hücrelerinin ve teka tabakasının negatif ekspresyonunun devam ettiği izlendi. Kan hücreleri bu grupta da kuvvetli pozitif. (Şekil 4.24, 25, 26, 27, 28).

**Grup 5**

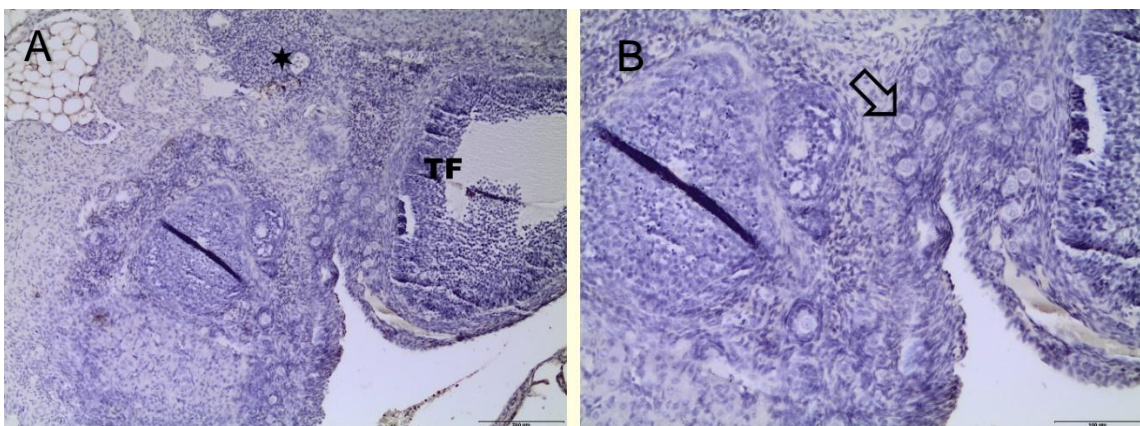
Bu grupta oositler IL-1b antikoruna için negatif reaksiyon gösterirken IL-6 ve TNF-a için kuvvetli boyanma göstermişti. Bu grupta da IL-1b, 6 ve TNF-a granuloza ve korpus luteum hücrelerinde, teka tabakasında, negatifti. Ovaryum stromal hücreleri ise orta derecede reaksiyon gösterdi. Ovaryum stromal lifler IL-6 için orta TNF-a için ise kuvvetli idi. (Şekil 4.29, 30, 31, 32, 33).



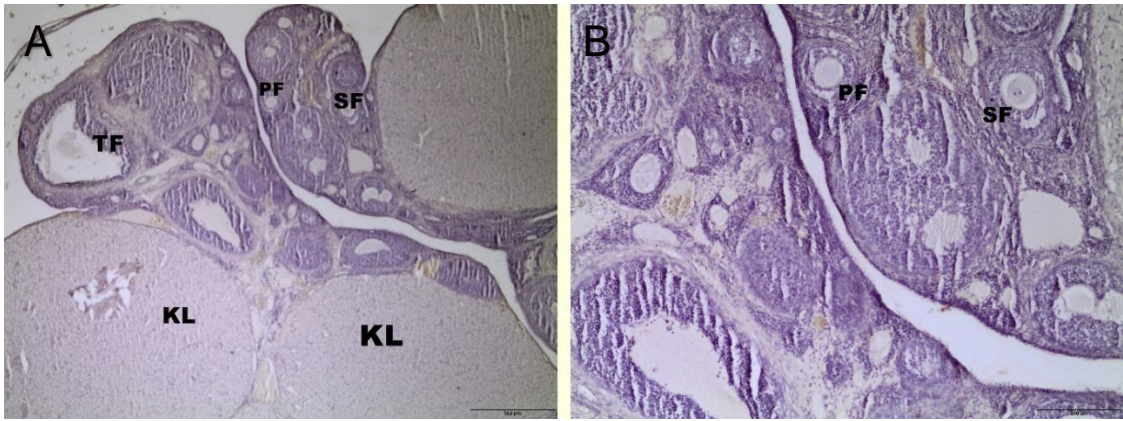
**Şekil 4.12** Kontrol (grup 1) ovaryum dokusunda tüm follküllerde ve korpus luteumda negatif olan IL-1b ekspresyonu(A,B). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500µ ,200 µm



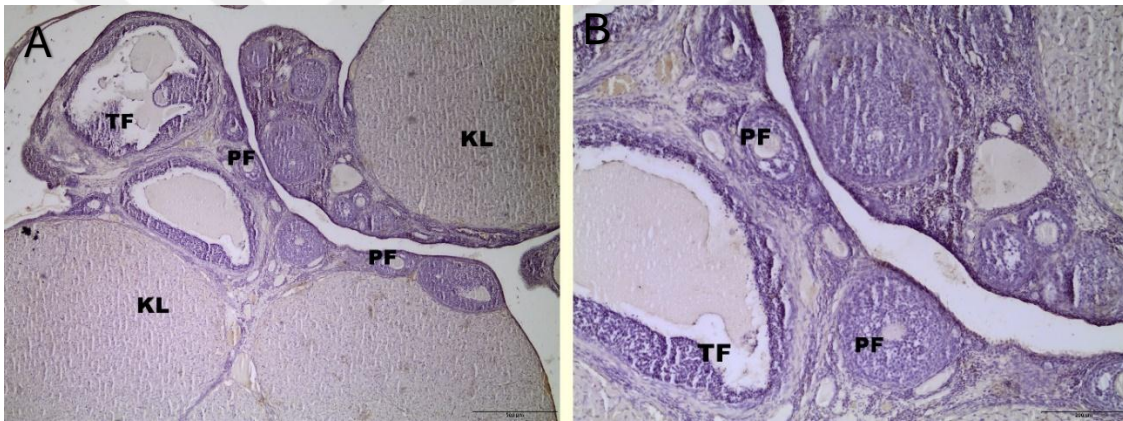
**Şekil 4.13** Kontrol (grup 1) ovaryum dokusunda IL-6 ekspresyonu (A). Daha büyük büyütmede ovaryum dokusu(B). Pozitif boyanan oosit;(asteriks), primordial follikül;(kalın ok), primer follikül;(PF), sekonder follikül;(SF), tersiyer follikül;(TF). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500µ ,200 µm



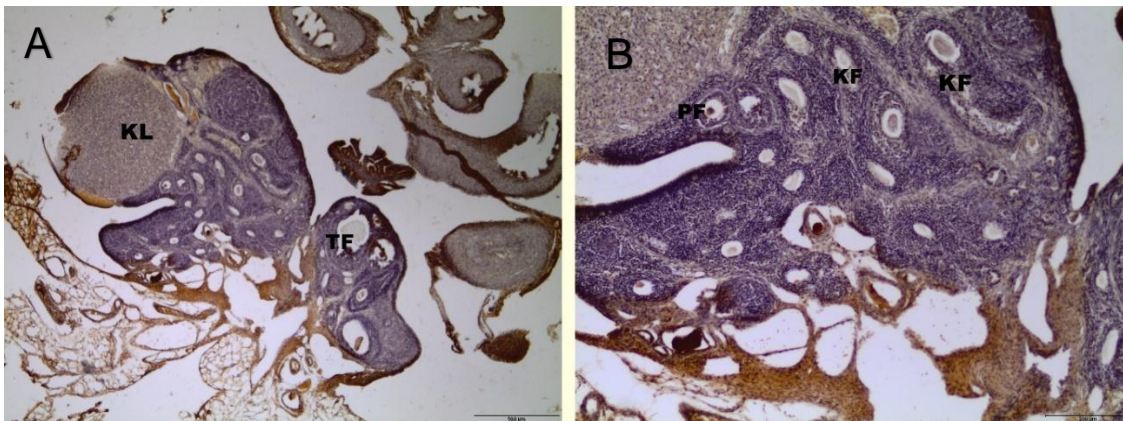
**Şekil 4.14** Kontrol (grup 1) ovaryum dokusunda TNF-a ekspresyonu (A,B). Primordial follikül;(kalın ok), tersiyer follikül;(TF), pozitif boyanan oosit; (asteriks). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500µ ,200 µm



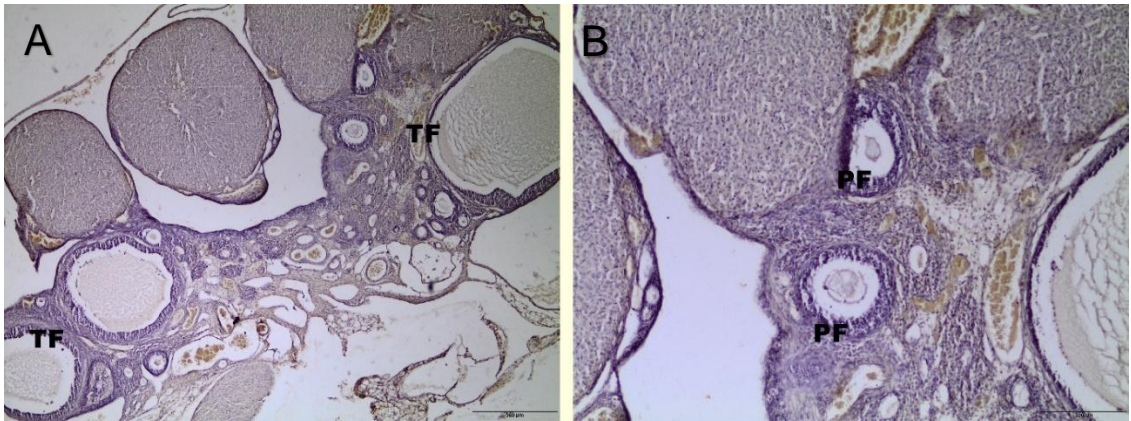
**Şekil 4.15** Grup 2 ovaryum dokusunda IL-1b ekspresyonu. Folliküller ve korpus luteumda negatif boyanma izlenmekte. Primer follikül;(PF), sekonder follikül;(SF), tersiyer follikül;(TF), korpus luteum;(KL). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500  $\mu$  ,200  $\mu$



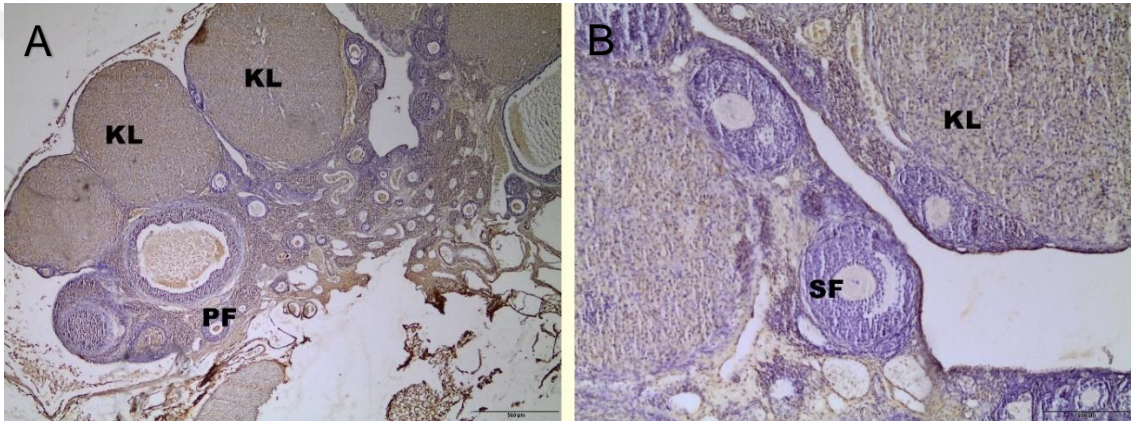
**Şekil 4.16** Grup 2 ovaryum dokusunda IL-6 ekspresyonu. Primer follikül;(PF), tersiyer follikül;(TF), korpus luteum;(KL). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500  $\mu$  ,200  $\mu$



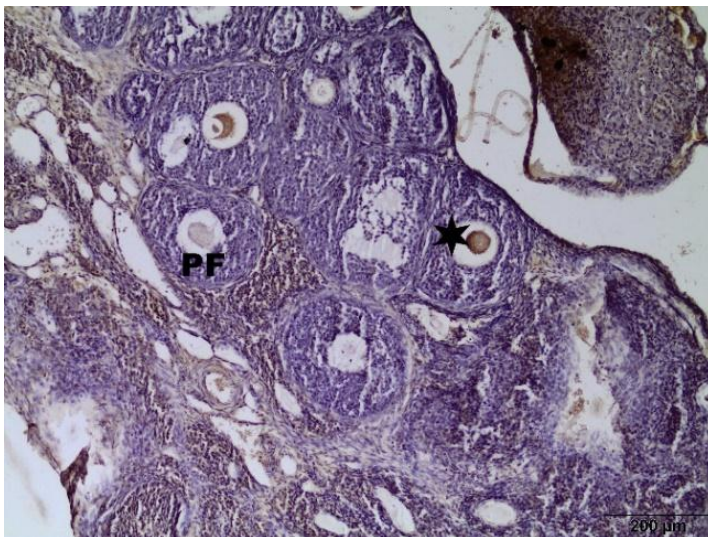
**Şekil 4.17** Grup 2 ovaryum dokusunda TNF-a ekspresyonu. Primer follikül;(PF), tersiyer follikül;(TF), korpus luteum;(KL). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500  $\mu$  ,200  $\mu$



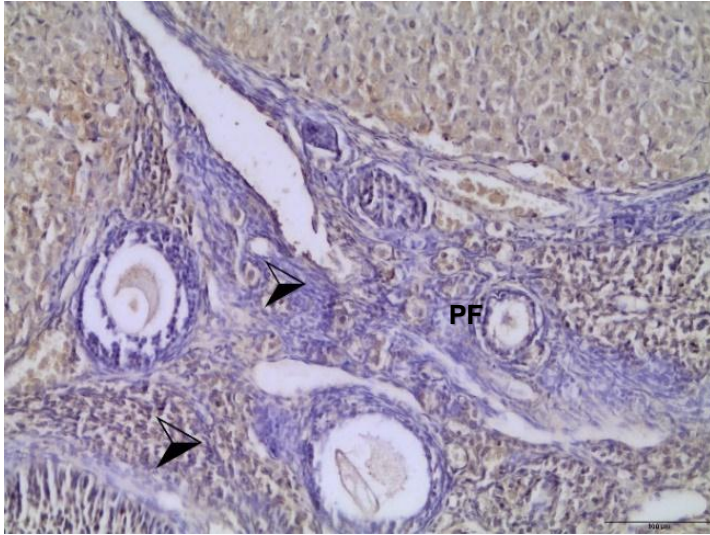
**Şekil 4.18** Grup 3 ovaryum dokusunda IL-1b ekspresyonu. Primer follikül;(PF), tersiyer follikül;(TF), korpus luteum;(KL). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500  $\mu$ ,200  $\mu$



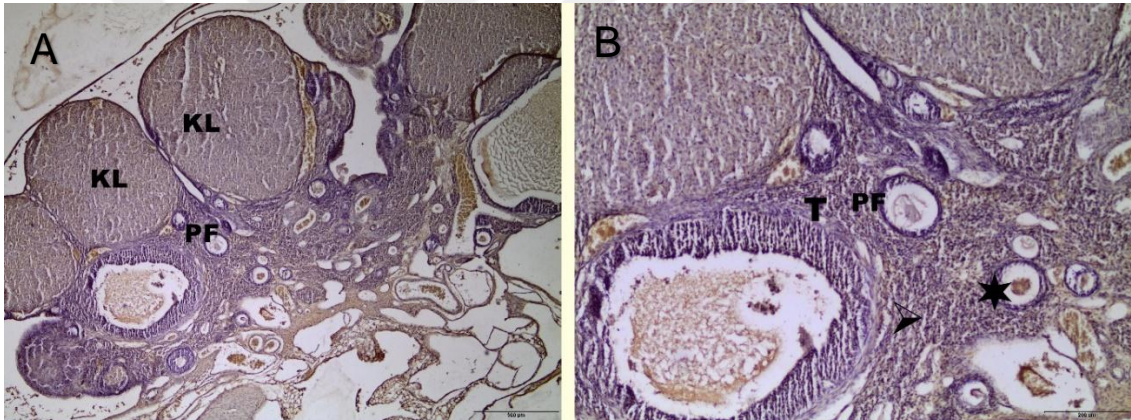
**Şekil 4.19** Grup 3 ovaryum dokusunda IL-1b ekspresyonu (A,B). Primer follikül;(PF), tersiyer follikül;(TF), korpus luteum;(KL). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500  $\mu$ ,200  $\mu$



**Şekil 4.20** Grup 3 ovaryum dokusunda IL-6 ekspresyonu. Negatif eksprese olan ovaryan lifler İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=200 $\mu$

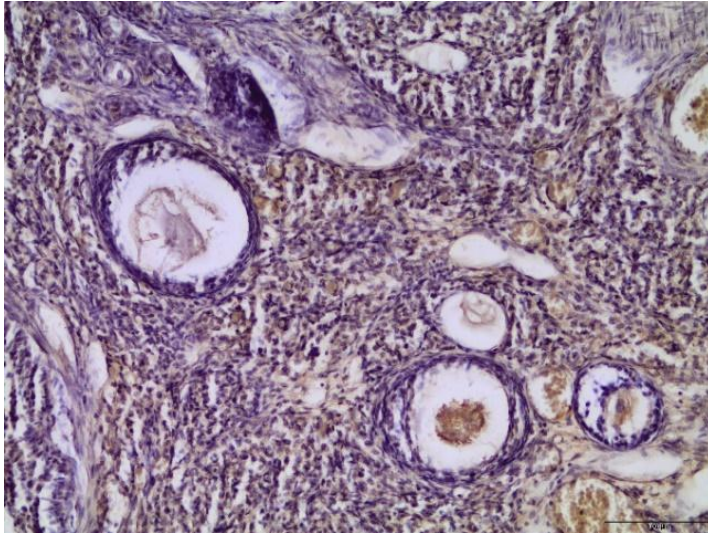


**Şekil 4.21** Grup 3 ovaryum dokusunda IL-6 ekspresyonu. Primer follükül;(PF), pozitif boyanan oosit, zayıf boyanan ovaryum stromal hücreler (ok başı). İmmunperoksidaz, Hematoksilen.

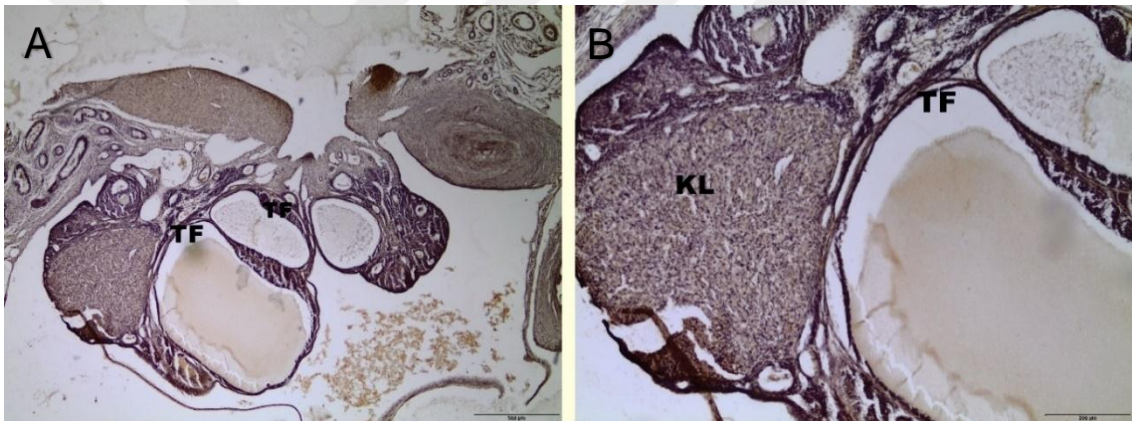


**Şekil 4.22** Grup 3 ovaryum dokusunda TNF-a ekspresyonu. Primer follükül;(PF), teka tabakası;(T), korpus luteum;(KL), pozitif boyanan oosit;(asteriks), stromal hücrelerde orta dereceli boyanma;(ok başı). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500 µm,200 µm

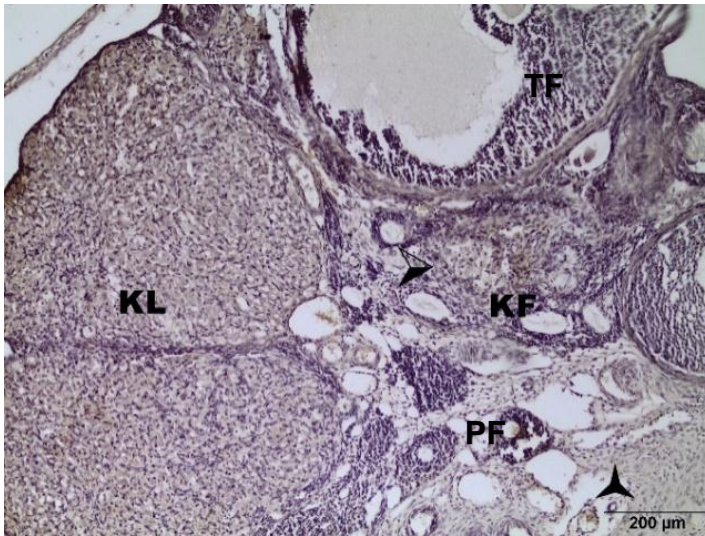




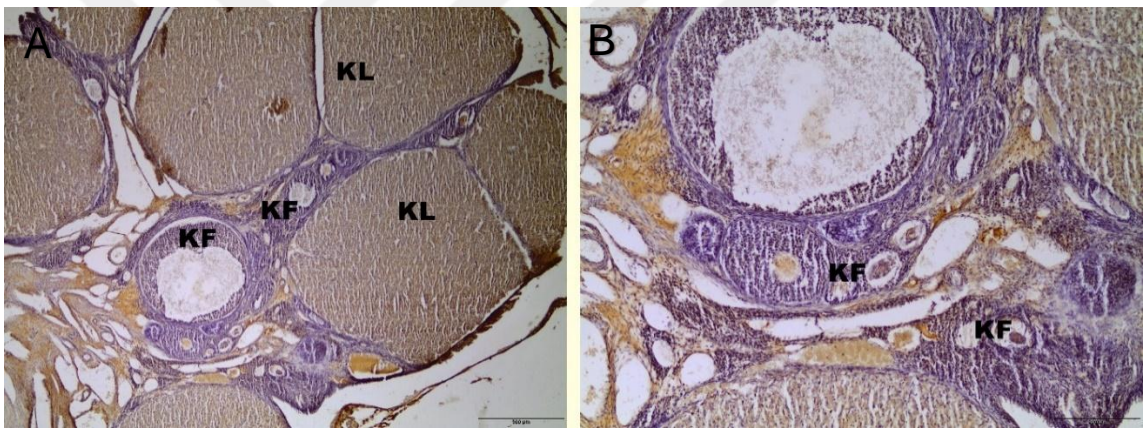
**Şekil 4.23** Grup 3 ovaryum dokusunda TNF-a ekspresyonu. İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=200µm



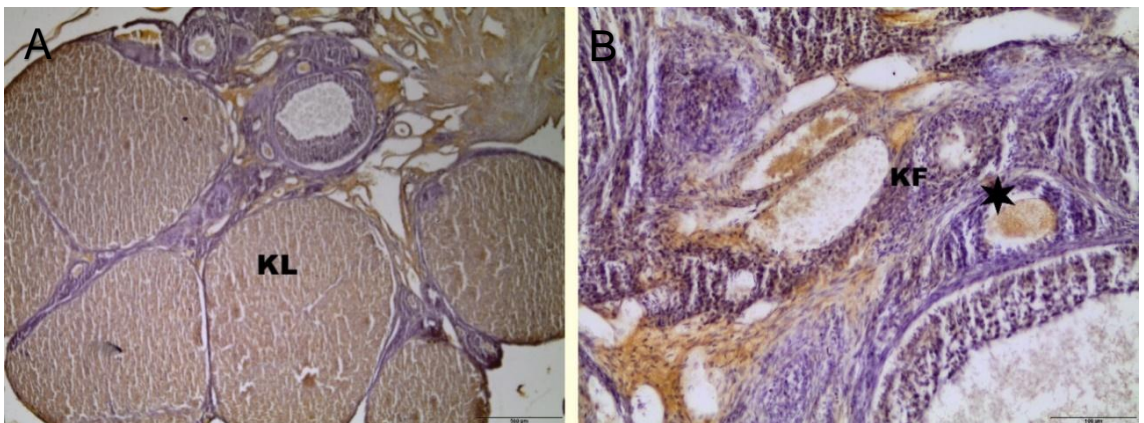
**Şekil 4.24** Grup 4 ovaryum dokusunda alınan kesitlerde IL-1b ekspresyonu. Tersiyer follikül;(TF), korpus luteum;(KL). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500µm, 200µm



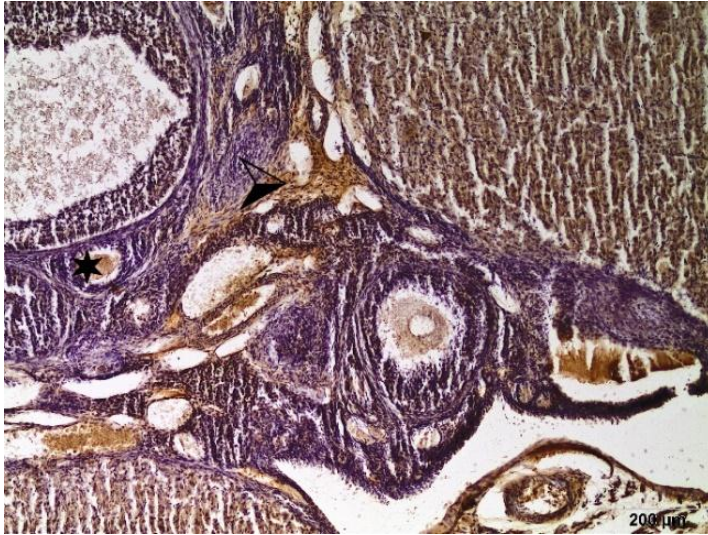
**Şekil 4.25** Grup 4 ovaryum dokusunda IL-1b ekspresyonu. Primer follükül;(PF), tersiyer follükül;(TF), korpus luteum;(KL), dokuda oluşan açılmalar;(üçgen) İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=200 µ



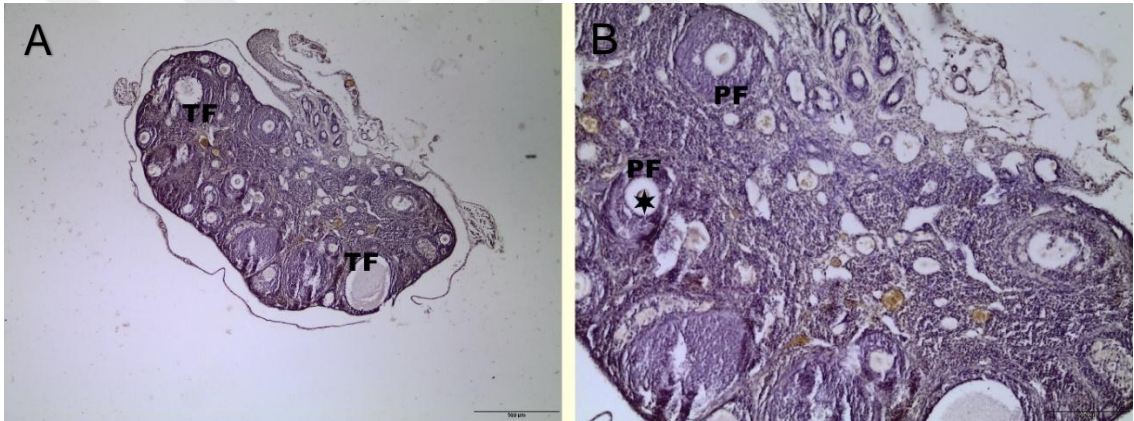
**Şekil 4.26** Grup 4 ovaryum dokusunda alınan kesitlerde IL-6 ekspresyonu (A,B). Kistik follükül;(KF), korpus luteum;(KL). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500µm,200 µm



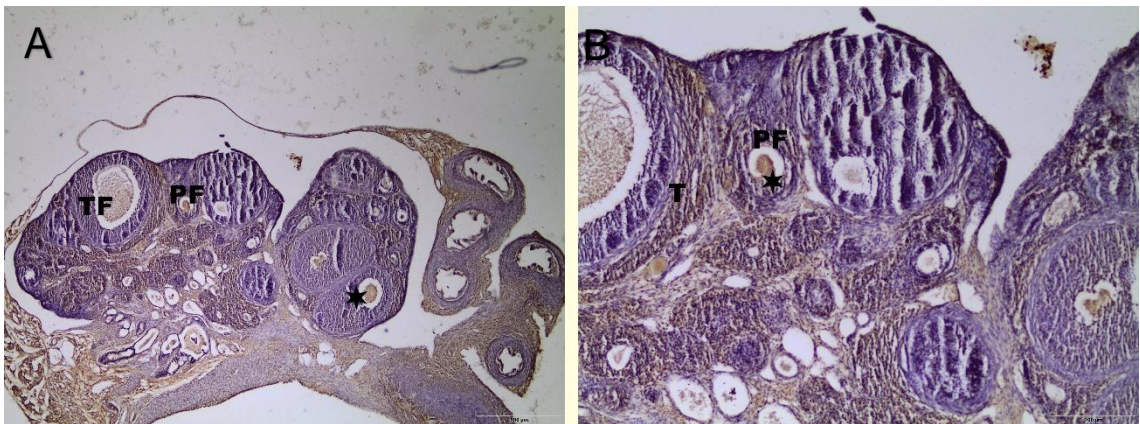
**Şekil 4.27** Grup 4 ovaryum dokusunda TNF-a ekspresyonu. Kistik follükül;(TF), korpus luteum;(KL), oosit;(asteriks). İmmunproksidaz, Hematoksilen. Bar=500µm, 100µm



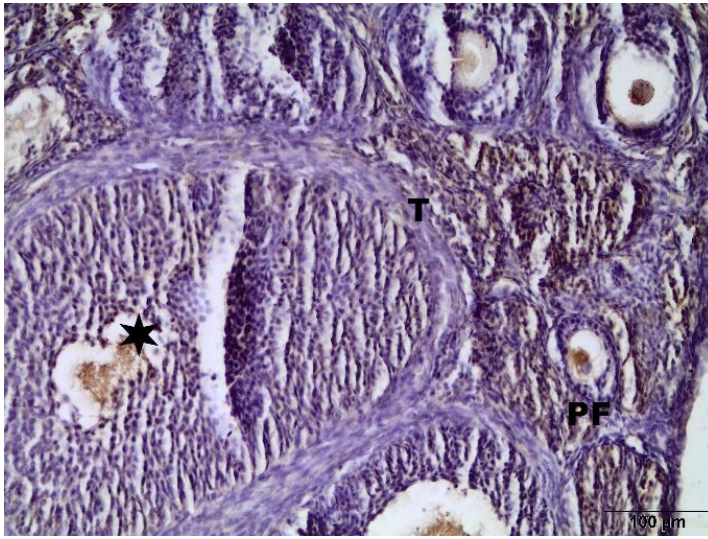
**Şekil 4.28** Grup 4 ovaryum dokusunda TNF-a ekspresyonu. Pozitif ekspresyon gösteren ovaryan lifler;(okbaşı), oosit;(asteriks). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=200 µm



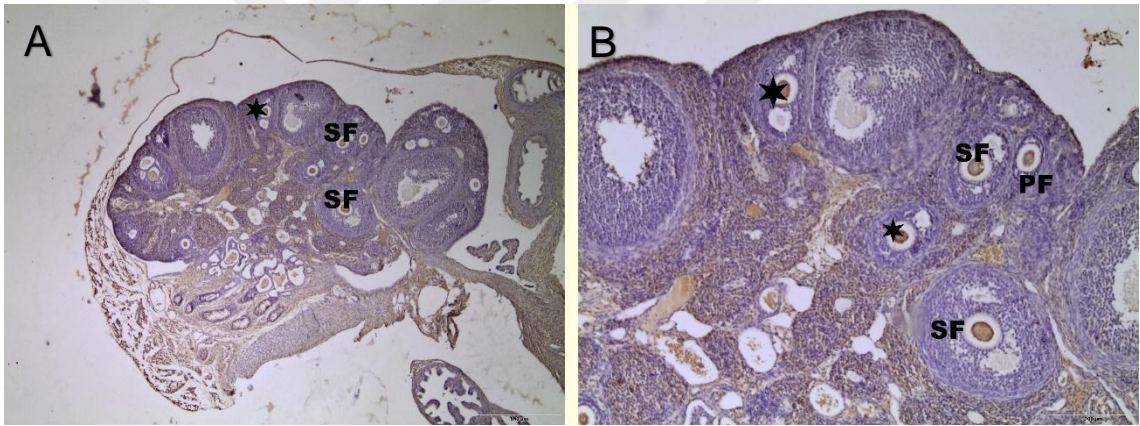
**Şekil 4.29** Sadece vitamin D uygulanan grup 5 ovaryum dokusundan alınan kesitler de IL-1b ekspresyonu (A,B). Primer follikül;(PF), tersiyer follikül;(TF), oosit;(asteriks). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar= 500 µm, 200 µm



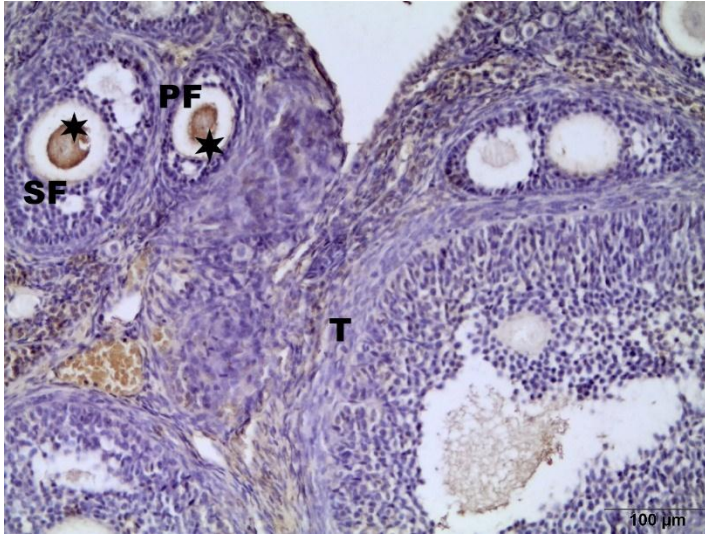
**Şekil 4.30** Sadece vitamin D uygulanan grup 5 ovaryum dokusundan alınan kesitler de IL-6 ekspresyonu (A,B). Primer follikül;(PF), tersiyer follikül;(TF), oosit; (asteriks). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=500 µm, 200 µm



**Şekil 4.31** Sadece vitamin D uygulanan grup 5 ovaryum dokusundan IL-6 ekspresyonu. Teka tabakası;(T), oosit;(asteriks). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=100μm



**Şekil 4.32** Sadece vitamin D uygulanan grup 5 ovaryum dokusundan alınan kesitler de TNF-α ekspresyonu (A,B). Primer follikül; (PF), sekonder follikül; (SF), oosit; (asteriks). İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=50μ



**Şekil 4.33** Daha büyük büyütmede sadece D vitamini uygulanmış ovaryum dokusunda TNF-a ekspresyonu. İmmunperoksidaz, Hematoksilen. Bar=100μm

**Tablo 4.1** IL-1b ekspresyonu ve dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Oosit	-	-	-	-	-
Granulosa hücreleri	-	-	-	-	-
Teka tabakası	-	-	-	-	-
Korpus luteum	-	-	-	++	-
Kan hücreleri	+++	+++	+++	+++	+++
Ovaryum Stromal hücreleri	-	-	-	-	-
Ovaryum lifleri	-	-	-	-	-

**Tablo 4.2** IL-6 ekspresyonu ve dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Oosit	++	-	++	+++	+++
Granulosa hücreleri	-	-	-	-	-
Teka tabakası	-	-	-	-	-
Korpus luteum	-	-	++	+++	-
Kan hücreleri	+++	+++	+++	+++	+++
Ovaryum Stroması	-	-	+	+	++
Ovaryum stromal lifleri	-	-	+++	+++	++

**Tablo 4.3** TNF-a ekspresyonu ve dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Oosit	-	++	++	+++	+++
Granulosa hücreleri	-	-	-	-	-
Teka tabakası	-	-	-	-	-
Korpus luteum	-	-	++	++	-
Kan hücreleri	+++	+++	+++	+++	+++
Ovaryum Stroması	-	-	+	+	++
Ovaryum stromal lifleri	-	-	-	+++	+++

### 4.3. Real Time PCR Bulguları

Gruplar arasında farklılıklar olmasına karşın bunlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kontrol grubu ile diğer gruplara bakıldığında yalnızca grup 4'te IL-6 ve IL-1b ekspresyonlarında anlamlı fark bulundu ( $P < 0,05$ ) (Tablo 4.4, 4.5).

**Tablo 4.4.** Kontrol grubu ile diğer grupların PCR verilerinin karşılaştırması

Up-Down Regulation (comparing to control group)				
	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
	Fold Regulation	Fold Regulation	Fold Regulation	Fold Regulation
IL-6	2,1739	6,5692	6,6092	9,49
IL-1 Beta	3,7144	10,842	14,5905	5,9412
TNF Alfa	2,4923	4,7161	3,4501	4,8885

**Tablo 4.5** Kontrol grubu ile diğer grupların PCR verilerinin karşılaştırması

p-value (comparing to control group)				
	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
IL-6	0,772495	0,336695	<u>0,0157209</u>	0,210306
IL-1 Beta	0,286801	0,271928	<u>0,036026</u>	0,153218
TNF Alfa	0,136468	0,392904	0,076446	0,307121

## 5. TARTIŞMA

PKOS, üreme çağındaki kadınların %5-10'unda görülen, kronik anovulasyon, biyokimyasal ve/veya klinik hiperandrogenizm ve polikistik overlerle karakterize yaygın bir endokrin bozukluktur (The Rotterdam ESHRE/ASRM, 2004). PKOS'ta ovaryum dokusunda gelişmekte olan antral ve preantral follikül sayısında artışla birlikte kistik follikül olarak tanımlanan antrumu genişlemiş, granuloza hücre katmanlarında azalma ve hücrelerde dejenerasyon izlenen ince teka tabakalı folliküller gözlenmektedir (Franks S 2008). Biz bu çalışmada sıçanlarda PKOS modeli oluşturmayı, PKOS'ta inflamasyon oluşumunu ve D vitaminin PKOS'un tedavisindeki ve aynı zamanda inflamasyondaki rolünü araştırmayı amaçladık.

Hayvan modelleri, insanlarda görülen sendromların, kısa sürede taklit edilerek çalışılması ve hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılması için kullanışlı araçlardır. PKOS'ta hayvan modelleri sıkça kullanılmakta ve çoğunlukla sendromun reproduktif etkilerini gözlemek için yardımcı olmaktadır. Sıçan modelleriyle çalışmak kısa östrus döngüsü ve bilinebilir genetik geçmiş bakımından oldukça kullanışlı olmasına rağmen insanlarla kemirgenler arasındaki bazı farklılıklar dikkate alınmalıdır. Kadınlar monoovulatuarken kemirgenler poliovulatuardır, hipotalamus-hipofiz-over aksı benzer olmasına karşın FSH bağımlı follikül seçim süreci kadınlardan farklıdır (Franks S 2015, Maliqueo M vd 2014). Primordiyal ve preantral follikül fazları kıyaslanabilir ancak intra ovaryan gelişimin düzenlenmesindeki farklılıklar gözardı edilemez. Primordiyal follikül havuzu ve folliküler gelişimin başlangıcı insanlarda fetal gelişimin geç evrelerinde olaylanırken, bu süreç kemirgenlerde postnatal periyodun başlarında olaylanmaktadır (Skinner MK vd 2005). Bu nedenle bu çalışma 20 günlük prepubertal sıçanlar ile yapılmıştır.

Caldwell vd (2014) farelerde yaptıkları çalışmada gestasyon sırasında dihidrotestosteron ve postnatal DHEA uygulamış ve 30-90 gün sonrasında kistik ve atretik folliküller gözlemlemiştir (Caldwell AS 2014). Yine prenatal ve postnatal yapılan 25-90 günlük testosteron propionate modelinde yalnızca kistik follikül oluşumu gözlenmiştir (Tyndall V 2012).

Prepubertal sıçanlarda yapılan çalışmalarda kontrol grubuna kıyasla yüksek testosteron seviyeleri, çok sayıda büyük primer ve sekonder follikül gelişimi gözlemlenmiştir (Misugi T vd 2006, Paixao L vd 2016). 90 günün üzerinde testosteron ve yüksek yağ içeren diyet ile yapılan uzun süreli çalışmalarda ise antral folliküllere ek olarak yüksek testosteron seviyesi görülmüştür.

Park ve Choi (2012) D-galaktoz-indüklenmiş yaşlanma modelli farelerde PKOS benzeri fenotip gözlemlemiştir (Park JH 2012). Bununla birlikte, New Zeland Obese (NZO) olarak bilinen obezite, İD ve diyabeti doğal olarak gösteren farelerde hiçbir uyarıcı kullanmadan yapılan çalışmada metabolik anormalliklerle ilişkili olarak PKOS'ta görülen çok sayıda kistik ve atretik follikül ve yüksek testosteron seviyeleri bulunmuştur (Park JH 2012, Radavelli-Bagatini S 2011).

Bizim çalışmamızda da bütün PKOS'lu gruplarda DHEA uygulanmıştır. DHEA verilen gruplarda uygulama süresi ile korelasyon göstererek artan kistik follikül oluşumu, granuloza hücre tabakasında incelleme gözlemlenmiştir.

Lingjun Sun vd (2016) sıçanlarda DHEA ile oluşturulmuş PKOS modelinde PKOS'lu grupta normal gruba göre daha fazla ağırlık artışı, testosteron ve LH artışı ile serum IL-6 seviyesinde artış gözlemlenmiş, TNF-a serum seviyelerinde ise bir farklılık bulunmamıştır (Sun L vd 2016).

Son çalışmalar PKOS'un sadece bir endokrin bozukluk olmadığını üreme bozukluklarının yanısıra obezite, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci, endotel disfonksiyonu, hiperinsülinemi ve metabolik sendrom gibi birçok rahatsızlıkla birlikte seyredildiğini göstermiştir. Bunların yanında PKOS'lu kadınların T2DM gelişme riski artmıştır (Hudecova M vd 2011, Gambneri A vd 2012). Ancak PKOS ile diğer metabolik rahatsızlıkların ortaya çıkış mekanizmaları arasındaki ilişki henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmuş değildir.

Düşük dereceli inflamasyon metabolik bozuklukların gelişmesine ve ovaryum disfonksiyonuna sebep olabilir (Gonza'lez F 2006). Düşük dereceli inflamasyon, IL-6 ve TNF-a'yı da içeren inflamasyon belirteçlerinin dolaşımda ve adipoz dokuda artmasıyla karakterize edilmiştir (Repaci A 2011). Adipositokinlerden olan bu klasik moleküllerin karbonhidrat ve lipit mekanizmasında birçok işlevi olduğu düşünüldüğünde PKOS'un patogeneze etki edebileceği söylenebilir. Sendromun tam olarak etyopatofizyolojisi açık olmamasına rağmen hastalığın fenotipini etkileyen genetik, beslenme alışkanlığı gibi faktörler hastalığın prevalansını arttırmaktadır. Özellikle visseral obezitenin PKOS hastaları arasında sıklığı %33 ile %88 arasında değişmektedir (Deligeoroglou E vd 2012) Androjenlerin, özellikle abdominal bölgede preadipozitlerin adipozitlere farklılaşmasını



düzenlediği düşünülürken visseral tipte yağlanmaya sebep olabileceği söylenebilir. Bu konuda yapılan çalışmalar, hiperandrojenizm, obezite, İD ve PKOS arasındaki patofizyolojik mekanizmayı anlayarak diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimindeki risk faktörlerini önlemeyi amaçlamaktadır. PKOS'ta gözlemlenen hormonal değişimler, obezite, glikoz intoleransı ve diğer metabolik sorunlar arasındaki bağlantının kronik düşük dereceli inflamasyon olabileceği söylenmektedir.

Adipoz doku hipoksiye uğradığında çekirdeğe göç eden hücre içi NF-κB aktivitesini uyarır. NF-κB, bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde, TNF-a, IL-6, IL-1b gibi inflamasyon sürecinde yer alan faktörlerin üretimini ve serbest kalmasını indükleyen, önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörüdür (Deligeoroglou E vd 2012). Bu durum, adipoz dokuya, inflamasyon durumunu muhafaza eden, adipoz hücre fonksiyonunu bozan ve sonucunda hücre sel nekroza neden olan, inflamasyonu kötüleştiren ve kısır bir döngü kurulmasına yol açan makrofajların alınması ile sonuçlanır. Kronik inflamasyon süreci glikoz metabolizması üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir ve insülin direnci gelişmesine yol açar. Bu sürecin kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, dislipidemi ve endotel disfonksiyonu gibi komplike rahatsızlıklara yol açabileceği konusunda çeşitli bulgular olmasına rağmen çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlar çelişkilidir.

*In vitro* çalışmalar TNF-a'nın sıçan teka hücrelerinin proliferasyonunu ve steroidogenezisini uyararak üreme aksını etkileyebileceğini göstermiştir (Deligeoroglou E vd 2012). Bunun yanında TNF-a sıçan ovaryumu teka hücrelerinde apoptotik bir etkiye sahip olabilir. Obezitede veya bozulmuş glikoz toleranslı hastalarda yüksek konsantrasyonların bulunması nedeniyle, bu faktörün insülin metabolizmasına karıştığı varsayılmıştır. Vaka çalışmalarından elde edilen sonuçlar, TNF-a seviyelerinin PKOS ile ilişkili olup olmadığını göstermek açısından tartışmalıdır.

TNF-a ve adiponektinin İD ile ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (Gonzalez F vd 2006). PKOS hastalarında TNF-a serum düzeylerinde ve adipoz dokudan salınımında artış görülürken, adiponektin düzeylerinde azalma görülmüştür (Glintborg D vd 2006, Gonzalez F vd 1999, Sayın L vd 2003). Fakat TNF-a'nın insülin direnci yolaklarını aktive ettiği ve bazı insülin reseptör ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını değiştirerek, insülin duyarlılığını etkileyebileceği görülmüştür (Stephens JM vd 1997). TNF-a reseptör yokluğunda obezitesi olan farelerde insülin duyarlılığının arttığı gösterildiği gibi (Pittas AG vd 2004), insanlarda yapılan çalışmalarda da kilo kaybıyla TNF-a düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmış ve adipoz dokudan TNF-a salınımı ile VKİ ve hiperinsülineminin ilişkili olduğu bulunmuştur (Pittas AG vd 2004, Kern PA vd 1995). Literatürde yüksek hasta sayısı ile yapılan ve TNF-a ile VKİ ve HOMA indeks arasında anlamlı bir korelasyon bulan bir çalışma mevcuttur (Samy N vd 2009)

Bizim çalışmamızda immünohistokimya sonuçlarına bakıldığında IL-1b ve TNF alfa kontrol grubunda (Grup 1) oositlerde, granuloza hücrelerinde ve teka tabakasında negatif bulunmuştur. IL-6 ise kontrol grubu ovaryum dokusunda oositlerde kuvvetli pozitif reaksiyon göstermiştir. PKOS oluşturulan ancak D vitamini uygulanmayan grup 2 ile kontrol grubu (grup 1) karşılaştırıldığında IL-1b ekspresyonun benzer olduğu ancak kontrol grubunda pozitif olan IL-6 ekspresyonunun grup 2'de negatif olduğu, kontrol grubunda negatif olan TNF alfa ekspresyonunun ise pozitif olduğu saptanmıştır.

PKOS oluşturulan ve D vitamini uygulanan grup 3 ve grup 4'te IL-6 ve TNF alfa oositlerde, korpus luteumda ve ovaryum stromasında pozitif immunreaksiyon vermiştir. Grup 4'teki boyanma grup 3 ile karşılaştırıldığında daha şiddetlidir. Bu gruplarda IL-1b ekspresyonu kontrol ve grup 2 ile benzer bulunmuştur. Sadece grup 4 ovaryum dokusunda korpus luteum IL-1 için pozitif reaksiyon göstermiştir.

PKOS oluşturulan ve D vitamini uygulanan grup 3 ve grup 4'te IL-6 ve TNF alfa oositlerde, korpus luteumda ve ovaryum stromasında pozitif immunreaksiyon vermiştir. Grup 4'teki boyanma grup 3 ile karşılaştırıldığında daha şiddetlidir. Bu gruplarda IL-1b ekspresyonu kontrol ve grup 2 ile benzer bulunmuştur. Sadece grup 4 ovaryum dokusunda korpus luteum IL-1 için pozitif reaksiyon göstermiştir.

PKOS'lu hastalarda yapılan bazı klinik çalışmalarda inflamasyon belirteçlerinden olan TNF-a, IL-6 ve IL-1b serum düzeylerinde artış saptanmıştır. Ancak bazı klinik çalışmalar da PKOS'lu hastalarda normal gruba göre inflamasyon belirteçlerinde artış olmadığını ortaya koymuştur. VKİ bağımlı yapılan klinik bir çalışmada VKİ'si yüksek olan PKOS'lu hastalarda santral obezite ile birlikte inflamasyon belirteçlerinde artış olabileceği savunulmuştur. Diğer bir çalışmada ise TNF-a ekspresyonunun kilo kaybı ile azaldığı belirtilmiştir (Pittas AG vd 2004).

İnterlökinler makrofajların alımını, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve bunların tunika medyadan tunika intima'ya geçişini teşvik eden çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde yer alan sitokinlerdir (Deligeoroglou E vd 2012). Ateroskleroz, koroner kalp hastalığı ve insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus gelişiminde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. İnterlökinlerin serum seviyelerini PKOS fenotipi ile ilişkilendirmeye çalışan birçok çalışma vardır ve çoğunda karaciğerde CRP üretiminin bir başlatıcısı olan IL-6'nın önemi üzerinde durulmaktadır. Bazı çalışmalar IL-6 seviyeleri ile PKOS arasında anlamlı bir ilişki olduğunu gösterirken (Escobar-Morreale HF vd 2003-2011), bazıları anlamlı olmadığını savunmuştur (Vgontzas AN vd 2006, Toulis KA vd 2011,). IL-1 ve TNF-a gibi IL-6 da immünoinflamatuvar cevabın düzenlenmesinde ve

savunmada önemlidir. Hepatositlerde akut faz cevabın artmasında rol oynar. Bu etkisini CRP, haptoglobin, fibrinojen ve proteaz inhibitörleri gibi akut faz proteinlerinin üretimini arttırarak gerçekleştirmektedir (Renyong Guo vd 2015).

IL-6 bizim sonuçlarımızda D vitamini verilen kısa dönem PKOS grubunda (grup 3) oositte ve korpus luteumda orta derecede immünreaksiyon vermiştir. Yalnızca D vitamini alan grupta oositte çok zayıf boyanma varken 20 gün sonrasında D vitamini verilen orta dönem PKOS grubunda (grup 4) oositte ve korpus luteumda yüksek derecede ve diğer gruplardan farklı olarak ovaryum stromasında orta derecede boyanma göstermiştir. Grup 4'ün daha uzun süre DHEA'ya maruz kalmasının ve D vitamini tedavisini 20 gün sonra almaya başlamasının IL-6'nın ovaryum dokusundan salınımını arttırdığı söylenebilir. Bu bağlamda D vitamini takviyesine PKOS belirtileri ve maruziyeti artmadan ne kadar önce başlanırsa yararlanma düzeyinin de artabileceği düşünülebilir Ancak IL-6, IL-1b ve TNF-a belirteçlerine bakılarak direkt olarak D vitamininin PKOS'ta ovaryum inflamasyonu ile anlamlı bir ilişkisi olduğu sonucuna varmak güçtür.

IL-1b hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozu içeren inflamatuvar cevabın önemli araçlarından biridir. IL-1a geninin promotöründe -889 C / T polimorfizm üzerine iki çalışma yayınlanmış olup bunlardan sadece biri PKOS ile birliktelik göstermektedir (Wang B vd 2009, Kolbus A vd 2007). Bununla beraber, bu çalışmaların Kafkas ve Çin ırklı kadınlarda gerçekleştirildiğine dikkat edilmelidir. Benzer şekilde, IL-1b geninin polimorfizmleri için farklı popülasyonlardan gelen tartışmalı sonuçlar mevcuttur. IL-1 ailesinin, geniş bir inflamasyon reaksiyonu olarak varsayılan siklik ovulasyon sürecinde anahtar düzenleyici rolünde olabileceği düşünülmektedir. IL-1b'nin granuloza ve teka hücrelerinin, protein sentezi gibi hücrel aktivitelerinin, plazminojen aktivatörü, prostaglandinlerin regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Martoriati A ve Gérard N 2003) Tüm bunlar dikkate alındığında IL-1b'nin ovulasyon ve oosit maturasyonuna öncülük eden kaskada dahil bir faktör olabileceği düşünülmektedir (Martoriati A ve Gérard N 2003).

Çalışmamızda elde ettiğimiz immünohistokimya verilerine bakıldığında IL-1b bütün gruplarda kan hücrelerinde kuvvetli derecede boyanma verirken, grup 4'te korpus luteumda da orta derecede boyanma reaksiyonu vermiştir. Grup 4'ün IL-1b, TNF-a ve IL-6 immünreaksiyonlarının benzer olması, deneysel PKOS çalışmalarında DHEA maruziyeti arttıkça ve D vitamini takviyesi geciktikçe inflamasyon belirteçlerinin ovaryum dokusunda salınımının arttığını ve hastalığın semptomlarının şiddetlendiğini düşündürmektedir. Grup 1, 2'de ve 3'te IL-1 ekspresyonlarında farklılık izlenmemiştir.

D vitamini kadın üreme sisteminde önemli bir role sahiptir bu nedenle PKOS'a alternatif tedavi ya da destekleyici tedavi olarak düşünülmüştür. VDR, ovaryum dokusunda, endometriumda, fallop tüplerinin epitel hücrelerinde, desidua ve plasentada eksprese edilir. D vitamini eksikliği birçok metabolik rahatsızlıkla ilişkilendirilmektedir. D vitamini eksikliği durumunda inflamasyonun arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ozfiat Z ve Chowdhury TA 2010, Tamez H ve Thadhani RI 2012). Buna karşın D vitamini eksikliğin inflamatuvar hastalıkların etiyolojisine katkısı olup olmadığı veya D vitamini eksikliğin bu hastalıkların bir belirtisi olup olmadığı sorusu hala geçerliliğini korumaktadır (Yin K, Agrawal DK 2014). Bir başka önemli soru da hastalara D vitamini verilen sürenin yetersiz kalması ya da D vitamini eksikliği ile birlikte seyreden rahatsızlıklarda, D vitamininin etkisinin hastalığı önleyici mi yoksa tedavi edici mi olduğudur.

Çalışmalar D vitamini eksikliğin PKOS belirtilerini şiddetlendirebileceğini bildirmektedir. Düşük 25(OH)D düzeylerinin insülin direnci, ovülasyon ve menstrual düzensizlikler, düşük gebelik başarısı, hirsutizm, hiperandrojenizm, obezite ve artmış kardiyovasküler hastalık risk faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ancak bu konuda yapılmış yeterli kapsamda deneysel çalışma mevcut değildir. Mevcut veriler PKOS hastalarında ve normal kadınlarda D vitamini seviyesinin benzer olduğunu göstermektedir (Panidis D vd 2005, Li HWR vd 2011). Bununla birlikte PKOS'lu kadınlarda D vitamininin düşük olduğu (Wehr E vd 2011, Lerchbaum E vd 2012) ve yüksek olduğu (Mahmoudi T vd 2010) da rapor edilmiştir. Birçok çalışma 25(OH)D seviyelerinin PKOS'lu kadınlarda düşük olduğunu, ortalama değerleri 11-31 ng/ml (Yildizhan R vd 2009, Li HWR vd 2011, Wehr E vd 2011, Mahmoudi T vd 2010, Muscogiuri G vd 2012) arasında, çoğunluğu (%67-85) ise <20 ng/ml (Hanhn S vd 2006, Wehr E vd 2009, Li HWR vd 2011, Thys-Jacobs S vd 1999) olmak üzere belirtmiştir. Ancak D vitamini eksikliği, dünya üzerindeki genel popülasyona bakıldığında da %10-60 oranında 20ng/ml sınırının altındadır (Prentice A 2008, Lips P 2010)

Mahmudi T vd (2010) yaş (30) ve BMİ (27 kg/m<sup>2</sup>) bakımından aynı PKOS'lu (n=85) ve normal kadınları (n=115) karşılaştırmış ve PKOS'lu kadınlarda D vitamini seviyesini (29,3ng/ml) normal kadınlardaki seviyeden (19,4 ng/ml) daha yüksek bulmuştur.

Li HWR vd (2011) PKOS'lu grubun normal gruptan düşük D vitamini seviyesine (kontrol grubunda 17 ng / ml'ye kıyasla PKOS grubunda 11 ng / ml) sahip olmasına rağmen, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte, ovülasyon kontrol grubu (n = 27), PKOS grubuna (n = 25, 28 yaş ve VKİ= 31 kg / m<sup>2</sup>) kıyasla daha yaşlı (35 yaş) ve VKİ (24 kg / m<sup>2</sup>) daha düşüktür. Bu çalışmayla birlikte

PKOS'lu ve normal grubu ayıran farklılığın VKİ olduğu ve D vitaminiyle ilişkili olabileceği üzerinde durulmalıdır.

PKOS'lu kadınlarda VKİ ile serum 25(OH)D düzeyleri arasında ters orantı bildirilen birçok çalışma vardır (Panidis D vd 2005, Wehr E vd 2009, Li HWR vd 2011, Muscogiuri G vd 2012). PKOS'lu obez kadınlarda obez olmayanlara kıyasla % 27-56 daha düşük D vitamini seviyeleri bildirilmiştir. PKOS'lu kadınlarda yüksek D vitamini eksikliğinin görülme sıklığının obezite ile ilişkili olması mümkündür çünkü D vitamini yağda çözünebilir ve obezitede daha yüksek bir oranda yağ dokusunda tutulur ve biyoyararlanımı azaltılır.

PKOS patogenezi, VDR'nin (TaqI, BsmI, FokI, ApaI ve Cdx2 polimorfizmleri) LH, SHBG, testosteron, İD, ve serum insülin seviyelerine etkisiyle de ilişkili olabilir (Mahmoudi T 2009, Wehr E vd 2011). D vitamini eksikliği, serum kalsiyum ve vitamin D seviyeleri ile düzenlenen PTH üretimini artırır ve artmış PTH bağımsız olarak PKOS, anovulatuvar infertilite ve artmış testosteron ile ilişkilidir D vitamini eksikliği ve diyetle bağlı kalsiyum yetersizliği PKOS'la ilişkili menstrual bozuklukların sebebi olabilir. PKOS'lu kadınlarda düşük kalsiyum alımının yüksek serum testosteron seviyeleriyle ilişkili olduğunun bulunması (Panidis D vd 2005), PKOS'ta görülen hormonal düzensizliğe düşük kalsiyum alımının katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

VDR ovaryumda östrojen üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. D vitamini, aromataz geninin ekspresyonunun direkt regülasyonu ve ekstraselüler kalsiyum homeostazisinin muhafaza edilmesi yoluyla östrojen biyosentezini düzenler (Kinuta K vd 2000). D vitamini eksik farelerde fertilité düşmüştür (Halloran BP ve Deluca HF 1980) ve VDR-eksik farelerde ovaryumda azalan aromataz aktivite ve bozulmuş follikülogenez ortaya çıkmıştır (Kinuta K vd 2000, Yoshizawa T vd 1997). Ovaryum dokusunda 1,25-dihidroksivitamin D3 uyarımı, östrojen ve progesteron üretimi ve testosteron üretimindeki etkisizlik, aromataz aktivitesinin vitamin D ile güçlendirilmesi ile açıklanabilir. Aromataz gen ifadesi PKOS folliküllerinde kontrollere kıyasla azalmıştır ve muhtemelen PKOS folliküllerinin hiperluteinize mikro ortamından dolayı preovulatuvar folliküllerle progesteron ve östradiolün follikül üretimini azaltmıştır (Sander VA vd 2011).

D vitamini eksikliği ilişkili kalsiyum disregülasyonu, PKOS'lu kadınlarda menstrual düzensizlik ve infertilite ile sonuçlanabilen folliküler tutulmada(atılmama) rol oynar (Thys-Jacobs vd 1999). 25(OH)D eksikliği olan PKOS'lu kadınlarda klomifen sitrat tedavisinin etkisini inceleyen bir çalışmada (Ott J vd 2012), 25(OH)D eksikliğinin VKİ ve yaşlılıktan bağımsız olarak klomifen sitrat tedavisi sonrasında follikül gelişimi ve gebelik oranlarının

daha düşük olmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak bunun yanında, PKOS yerine kalsiyum metabolizması ile üreme fonksiyonları arasında bir ilişki olması da mümkündür.

Thys-Jacobs vd.(1999) PKOS'lu D vitamini eksikliği olan (ortalama 25(OH)D değeri 11.2 ng / ml olan) kadınlara, 25(OH)D düzeylerini 2-3 aylık bir terapiyle normal aralıkta (30-40 ng / ml) arttıracak kalsiyum ile D vitamini takviyesi yapmışlardır. Menstrual disfonksiyonu olan dokuz kadından yedisinde, iki ay içinde normalleştirilmiş menstruasyon döngüleri meydana gelmiştir, iki kadın hamile kalmış ve diğer dördü normal adet döngüsünü sürdürmüştür. Bu sonuç, PKOS'lu ve D vitamini seviyesi düşük olan kadınlarda siklusları normale döndürmek için D vitamini ve kalsiyumun destek tedavi olabilmesi yönünden potansiyelini göstermiştir.

Bizim çalışmamızda da D vitamininin, PKOS tam olarak oluşmadan takviye olarak verildiği grupta (grup 3) D vitamini takviyesi verilmeyen PKOS'lu gruba (grup 2) göre kistik follikül sayısında azalma olduğu, olgunlaşmakta olan ve olgun follikül sayısında artış olduğu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde bulunmuştur. Sadece D vitamini verilen normal grupta (grup 5) da antral follikül sayısını yine anlamlı olarak yüksek bulduk. Yapılan önceki çalışmalarla paralellik gösteren sonuçlara göre D vitamininin menstrual döngü üzerine olumlu etkileri olduğunu ve polioovulatar olan sıçanlarda antral follikülü artırırken, kadınlarda PKOS'ta bozulan follikülogenezin düzenlenmesinde ve menstrual döngünün düzenlenmesinde olumlu etkisi olduğu söylenebilir.

M Razavi vd (2016), D vitamini eksikliği olan 60 PKOS'lu hastaya 8 hafta boyunca D vitamini- kalsiyum-K vitamini takviyesi vererek endokrin, inflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerini inceledikleri çalışmada inflamasyon belirteçleri ile D vitamini takviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon görülmemiştir.

He C vd. (2015) metaanalizi içeren çalışma yapmış ve PKOS'lu kadınların serum 25(OH)D konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu hastalarda serum 25(OH)D seviyeleri ile açlık glikozu, açlık insülini, trigliseritler, FAI, CRP ve DHEAS arasında negatif ilişkili bulunmuştur. Fakat PKOS'lu kadınlarda D vitamini takviyesinin olası yararlı etkisini analiz ederken çıkan sonuçlar beklendiği gibi olmamıştır. Aslında, plaseboya kıyasla, D vitamini takviyeli hastalar, diğer metabolik parametrelerde önemli farklılıklar olmaksızın sadece açlık insülin düzeylerinde bir iyileşme göstermiştir (He C vd 2015). D vitamini takviyesi sonrası ve ön müdahale arasındaki karşılaştırmada, PKOS'lu hastalarda trigliserit düzeyleri önemli ölçüde azalmış ve vitamin D tedavisinden sonra serum 25 (OH) D düzeyleri anlamlı olarak artmıştır.

Çalışmalarda ortaya çıkan bulgular İD'nin PKOS patogenezinde önemli bir yere sahip olduğunu ve hem metabolik hem de üreme bozukluklarına katkıda bulunduğunu göstermektedir. PKOS'dan etkilenen kadınlarda metabolik bozuklukların, özellikle de İD'nin mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için birçok çalışma yapılmıştır. İD, obezite nedeniyle olabilir. Bununla birlikte, PKOS'dan etkilenen çok sayıda zayıf kadın, obeziteden bağımsız olarak İD'ye sahiptir (Krul-Poel YHM vd 2013). Son zamanlarda, D vitamini eksikliğinin ID ve PKOS arasındaki muhtemel eksik bağlantı olabileceği söylenmektedir. Aktif vitamin D-vitamin D reseptör (VDR) kompleksinin, glikoz ve lipid metabolizması ile kan basıncının düzenlenmesi için önemli genler de dahil olmak üzere 300'den fazla geni düzenlediği bulgusu göz önünde bulundurulduğunda bu hipotez desteklenmektedir (Bouillon R vd 2008). Fakat yine de PKOS patogenezinde, İD ve D vitamininin nedensel olarak birbiriyle ilişkili olup olmadığı veya PKOS'lu kadınlarda iki farklı bağımsız özellik oluşturup oluşturmadığı hala belirsizdir.

Sadhir M vd (2015) PKOS'lu ergenlik çağındaki hastalara odaklanarak serum 25 (OH) D düzeylerini kontrollerle karşılaştırmışlardır. İki grup arasında ortalama 25 (OH) D düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Diğer çalışmalarda, PKOS'da D vitamini metabolizmasına katılan gen varyantlarının varlığı değerlendirilmiş ve VDR polimorfizmleri ile PKOS'un gelişimi ve insülin direnci arasında ilişki olduğu düşünülmüştür (Wehr E vd 2011, Mahmoudi T 2009) ve VDR'deki varyantların, testosteron, eşey hormon bağlayan globulin ve lüteinizan hormon üzerindeki etkileri yoluyla sendromun patogenezinde yer alabilme ihtimali açıklaması getirilmiştir (Grundmann M vd 2011). Sonuç olarak, çeşitli çalışmalar düşük D vitamini seviyeleri ile PKOS'lu kadınlarda, metabolik bozukluklar ve artmış İD arasında bir ilişki olduğunu belirtse de, hastalık ile yetersiz D vitamini seviyesi arasında nedensel bir bağ olduğunu gösteren kesin kanıtlar hala eksiktir ve bu konuda yapılan pek çok gözlemsel çalışmanın sonuçları, obezitenin ve PKOS'la birlikte seyreden diğer rahatsızlıkların karışık etkisiyle çarpıtılabilir.

İrani M vd (2014), D vitamini ve PKOS arasında alternatif bir bağlantı önermiştir. D vitamininin anti-Müller hormonunun (AMH) üretiminde ve follikül uyarıcı hormonun hassasiyetinde etkili olabileceğini düşünmektedirler. PKOS'lu kadınlarda, AMH düzeyleri genellikle artmaktadır. Vitamin D takviyesi serum AMH düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır ve pro-inflamatuar ileri glikasyon son ürün reseptörünün (sRAGE) serum düzeylerini arttırmıştır. Bu gelişmeler, PKOS'lu hastalardaki follikülogenezi geliştirebilen anti-inflamatuar bir etkiyi desteklemektedir (İrani M vd 2014, Dabrowski FA vd 2015).

Bizim çalışmamızda yer alan ve önceki bazı çalışmalarda inflamasyon durumlarında serum düzeylerinde artış olduğu savunulan belirteçlerden TNF-a, IL-1b ve IL-6 genel olarak D vitamini verilen kısa dönem (20 gün) ve orta dönem(40 gün) gruplarda, özellikle korpus luteumda immünohistokimyasal reaksiyon göstermiştir. Biz serumdaki seviyelerini bakmadık. Sadece dokulardaki artışı immünohistokimyasal olarak belirledik. Kısa dönem grup 3 ile orta dönem grup 4 ve yalnızca vitamin D uyguladığımız grup 5'teki ekspresyonun grup 2 ve grup 1'de görülmemesi bu sitokinlerin ovulasyon ve follikulogenez süreçlerinde olağan bir şekilde ovaryumdan salındığı için olabilir.

D vitaminin polikistik over sendromuna etkisini araştırdığımız çalışmamızda immünohistokimyasal bulgularımız D vitaminin inflamasyon artışına çok etkisi olmadığı yönündedir. Bununla birlikte follikül sayısında gruplar arasında istatistiksel farklılıklar olduğunu saptadık. Deneysel olarak PKOS oluşturmak üzere verdiğimiz DHEA ile vitamin D'yi aynı gün başladığımız grup 3 ile DHEA uygulamasından 20 gün sonra yani PKOS oluşturduktan sonra D vitamini verilen grup4 arasında kistik follikül sayımlarını karşılaştırdığımızda kistik folliküllerin grup 3 de grup 4'e karşın daha azalmış olduğu ( $p=0,020$ ) bulunmuştur. Ayrıca primordial, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin de grup 3'te grup 4'e karşın daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar bize vitamin D'nin PKOS ta koruyucu olmakla birlikte PKOS oluştuktan sonra geri döndürmede çok etkin olmadığını göstermiştir. Sadece D vitamini verilen normal grupta (grup 5) kistik follikül ve korpus luteum hariç tüm folliküller grup 2, grup 3 ve grup 4'teki folliküllere nazaran daha yüksektir. Grup 5'te kistik follikül yapısı izlenmemiştir.

D vitaminin follikül gelişimine etkisini grup 1 ile karşılaştırarak inceledik. Primordiyal follikül grup1'de fazla olmasına karşın istatistiksel olarak bu anlamlı değildi ( $p= 0,286$ ). Primer follikül grup 1'de grup 5'e göre daha fazla idi. Sekonder ve tersiyer folliküller ise grup 5'te daha fazla idi. Sekonder ve tersiyer folliküllerin grup 3'te de grup 1'e karşın daha yüksek bulunması D vitaminin follikül gelişiminde ve daha çok follikülün ovulasyona ulaşmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkisini granuloza hücrelerinde ya da oositte apoptozisi ya da atreziyi önleyerek yapıyor olabileceğini düşündürmektedir..



## 6. SONUÇ

D vitamininin inflamasyonu ve serum CRP düzeylerini düşürdüğü bilinse de aynı zamanda ovaryumda follikül gelişimi, oosit gelişimi ve atılması, menstrual döngünün düzenlenmesi gibi süreçlerde rolleri olduğu düşünüldüğünde D vitamini verilen gruplardaki sitokin artışının bozulan bu süreçleri düzenlemeye yönelik bir yanıt olduğu da düşünülebilir. Ancak kısa dönemde D vitamininin kistik follikül sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltarak bir fayda sağladığı fakat inflamasyon belirteçlerinde anlamlı bir fark yaratan azaltıcı etkisi olmadığı sonucuna ulaştık. Daha uzun dönem yapılacak çalışmalarla bu yanıt durumunun dokuda ve gen düzeyinde ne kadar sürdüğü ve D vitamininin PKOS'un metabolik etkilerini ne zaman tam olarak azaltmaya başladığı incelenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. **J Endocrinol.** 2002; 174(1): 1-5.

Achard C, Thiers J. Le virilisme pileire et son association a l'insuffisance glycolytique (diabete des femme a barbe). **Bull Acad Natl Med.** 1921; 86: 51-83.

Agrawai R, Conway G, Sladkevicius C. Serum vascular endothelial growth factor and Doppler flow velocities in in vitro fertilization: prevalence to ovarian hyperstimulation syndrome and polycystic ovaries. **Fertil Steril.** 1998; 70: 651-658.

Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P. Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. **Ann NY Acad Sci.** 2001; 943: 296-315.

Amato G, Conte M, Mazzioti G, Lalli E, Vitolo G, Tucker AT, Bellastella A, Garella C, Izzo A. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. **Obstet Gynecol.** 2003; 10: 1177-1182.

Asemi Z, Foroozanfard F, Hashemi T, Bahmani F, Jamilian M, Esmailzadeh A. Calcium plus vitamin D supplementation affects glucose metabolism and lipid concentrations in overweight and obese vitamin D deficient women with polycystic ovary syndrome. **Clin Nutr.** 2015; 34(4): 586-592.

Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. **J Clin Endocrinol Metab.** 2000; 85(7): 2434-2438.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. **J Clin Endocrinol Metab.** 2006; 91(11): 4237-4245.

Azziz R, Ehrmann D, Legro RS, et al. Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab.** 2001; 86(4): 1626-1632.

Azziz R. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: a reappraisal. **Fertil Steril.** 2005; 83:1343-1346.

Barrett KE. Cytokines: sources, receptors, and signaling. **Baillieres Clin Gastroenterol.** 1996; 10: 1-15.

Ben-Shlomo I and Adashi EY. Interleukin-1 as a mediator in the ovulatory sequence: evidence for a meaningful role of cytokines in ovarian physiology. **Curr Sci Series.** 1994; 1: 187-192.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A Metalloproteinase Disintegrin That Releases Tumour-Necrosis Factor- $\alpha$  from Cells. **Nature**. 1997; 385: 729-733.

Bonello NP, Norman RJ and Brännström M. Interleukin-1 $\beta$  inhibits luteinizing hormone-induced plasminogen activator activity in rat preovulatory follicles in vitro. **Endocrine**. 1995; 3: 49-54.

Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C & Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine Reviews**. 2008; 29: 726–776.

Brännström M, Wang L and Norman RJ. Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. **Biol Reprod**. 1993; 48: 165-171.

Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovary disease. **J Clin Endocrinol Metab**. 1980; 50: 113-116.

Caldwell AS, Middleton LJ, Jimenez M, Desai R, McMahon AC, Allan CM, Handelsman DJ, Walters KA. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. **Endocrinology**. 2014; 155(8): 3146-3159.

Carmina E, Orio F, Palomba S, et al. Endothelial dysfunction in PCOS: role of obesity and adipose hormones. **Am J Med**. 2006; 119(4): 356.

Cekmez F, Cekmez Y, Pirgon O, et al. Evaluation of new adipocytokines and insulin resistance in adolescents with polycystic ovary syndrome. **Eur Cytokine Netw**. 2011; 22(1): 32-37.

Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand Independent Receptor Assembly and Signaling. **Science**. 2000; 288: 2351.

Corbould A, Kim YB, Youngren JF, Pender C, Kahn BB, Lee A, Dunaif A. Insulin Resistance in The Skeletal Muscle of Women with PCOS Involves Intrinsic and Acquired Defects in Insulin Signaling. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2005; 288: 1047–1054.

Cortón M, Botella-Carretero JI, Bengurí'a A, et al. Differential gene expression profile in omental adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metabol**. 2007; 92: 328–337.

Daan NM, Louwers YV, Koster MP, Eijkemans MJ, de Rijke YB, Lentjes EW, Fauser BC, Laven JS. Cardiovascular and metabolic profiles amongst different polycystic ovary syndrome phenotypes: who is really at risk. **Fertil Steril**. 2014; 102(5): 1444-1451.

Dabrowski FA, Grzechocinska B, Wielgos M. The role of vitamin D in reproductive health – a Trojan Horse or the Golden Fleece? **Nutrients**. 2015; 7: 4139–4153.

Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, et al. Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 1994; 61: 455–460.

Death AK, McGrath KC, Sader MA, et al. Dihydrotestosterone promotes vascular cell adhesion molecule-1 expression in male human endothelial cells via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Endocrinology*. 2004; 145(4): 1889–1897.

Deligeoroglou E, Vrachnis N, Athanasopoulos N, Iliodromiti Z, Sifakis S, Iliodromiti S, Siristatidis C & Creatsas G. Mediators of chronic inflammation in polycystic ovarian syndrome. *Gynecological Endocrinology*. 2012; 28: 12, 974-978.

Deniz R, Baykuş Y, Çelik E. Approach to Recurrent Early Pregnancy Loss. *Kafkas J Med Sci*. 2016; 6(2): 130–137.

Diamanti-Kandarakis E and Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine Reviews*. 2012; 33: 981–1030.

Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, Zapanti ED, Bartzis MI: A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 4006-4011.

Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K, Piperi C, Aessopos A, Katsikis I, Katsilambros N, et al. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Hum Reprod*. 2006; 21: 1426–1431.

Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, Purcarea VL, Hudita D The Polycystic Ovary Syndrome: An update on metabolic and hormonal mechanisms. *Journal of Medicine and Life*. 2015; 8(2): 142-145.

Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 1989; 38: 1165-1174.  
Ebejer K, Agius JC. The Role of Cytokines in Polycystic Ovarian Syndrome. *Gynecol Endocrin*. 2013; 29(6): 536-540.

Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1223-1236.  
Elting MW, Korsen TJM, Rekers-Mombarg LTM. Woman with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when aging. *Human Reprod*. 2000; 15: 24.

Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, Gonzalez F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 2011; 95: 1048–1058.

Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JI, Sancho J, San Millán JL. Obesity, and not insulin resistance, is the major determinant of serum inflammatory cardiovascular risk markers in pre-menopausal women. *Diabetologia*. 2003; 46: 625–633.

Eser B, Taskin Mİ, Hismiogullari AA, Aksit H ve Bodur AS. The effects of IL-1A and IL-6 genes polymorphisms on gene expressions, hormonal and biochemical parameters in polycystic ovary syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2017; 37(3): 358-362.

Ford ES, Giles WH. Prevalance of the metabolic syndrome among US adult: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of the American Medical Association*. 2002; 287(3): 356-359.

Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. ***Hum Reprod Update***. 2008; 14(4): 367-378.

Franks S. Can Animal Models of PCOS Help Point the Way Towards Early and Effective Therapeutic Intervention in Women With the Syndrome? ***Endocrinology***. 2015; 156(7): 2371-2373.

Franks S. Polycystic ovary syndrome. ***N. Engl J. Med.*** 1995; 333(13): 853-861.

Gambneri A, Patton L, Altieri P, et al. Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes: results from a long-term prospective study. ***Diabetes***. 2012; 61(9): 2369-2374.

Gharani N, Waterworth DM, Batty S, White D, Gilling Smith C, Conway GS, et al. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. ***Hum Mol Genet.*** 1997 ;6(3): 397-402.

Glintborg D, Andersen M, Hagen C, et al. Evaluation of metabolic risk markers in polycystic ovary syndrome. Adiponectin, ghrelin, leptin and body composition in hirsute PCOS patients and controls. ***Eur J Endocrinol.*** 2006; 155: 337-345.

Glintborg, D., Andersen, M., Hagen, C. et al. Higher bone mineral density in Caucasian, hirsute patients of reproductive age. Positive correlation of testosterone levels with bone mineral density in hirsutism. ***Clinical Endocrinology***, 2005; 62: 683–691.

Goldzieher JW, Green JA. The polycystic ovary I. Clinical and histological features. ***J Clin Endocrinol Metab.*** 1961; 22: 325-338.

González F, Minium J, Rote NS, Kiwan JP. Hyperlycemia alters tumor necrosis factor- $\alpha$  release from mononuclear cells in women with polycystic ovary syndrome. ***J Clin Endocrinol Metabol.*** 2005; 90: 5336–5342.

González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Increased activation of nuclear factor  $\kappa$ B triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. ***J Clin Endocrinol Metab.*** 2006; 91(4):1508-1512.

Gonzalez F, Thusu K, Rahman EH, et al. Elevated serum levels of tumor necrosis factor in normal weight women with polycystic ovary syndrome. ***Metabolism***. 1999; 48: 437-441.

Gonzalez F. Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Undepinning of Insulin Resistance and Ovarian Dysfunction. ***Steroids***. 2012; 77: 300-305.

Groot PC, Dekkers OM, Romijn JA, Dieben SW, Helmerhorst FM. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. ***Human Reproduction***. 2011; 17: 495–500.

Grundmann M, Von Versen-Hoynck F. Vitamin D-roles in women's reproductive health. ***Reprod Biol Endocrinol.*** 2011; 9: 146.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th edition. ***Elsevier Saunders***, Philadelphia, 2006

Hahn S, Haselhorst U, Tan S, Quadbeck B, Schmidt M, Roesler S, Kimmig R, Mann K & Janssen OE. Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with

insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**. 2006; 114: 577–583.

Halloran BP and Deluca H.F. Effect of Vitamin D Deficiency on Fertility and Reproductive Capacity in the Female Rat. **The Journal of Nutrition**. 1980; 110: 1573–1580.

Hayes FJ, Taylor AE, Martin KA, et al: Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine and androgen dynamics. **J Clin Endocrinol Metab**. 1998; 83(7): 2343–2349.

He C, Lin Z, Robb SW, Ezeamama AE. Serum vitamin D levels and polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**. 2015; 7: 4555–77.

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/jak/stat pathway. **Biochemical Journal**. 1998; 334: 297–314.

Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N, Iwasaki M, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Kudo R. Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. **Biol Reprod**. 2001; 64(1): 157–162.

Homburg R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod**. 2009; 24: 1548–1555.

Hudecova M, Holte J, Olovsson M, Larsson A, Berne C, Poromaa IS. Diabetes and impaired glucose tolerance in patients with polycystic ovary syndrome – a long term follow-up. **Hum Reprod**. 2011; 26(6): 1462–1468.

Hurwitz A, Dushnik M, Solomon H, Ben-Chetrit A, Finci-Yeheskel Z, Milwidsky A, Mayer MD, Adashi EY and Yagel S Cytokine-mediated regulation of rat ovarian function: interleukin-1 stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase. **Endocrinology**. 1993; 132: 2709–2714

Irani M, Merhi Z. Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. **Fertil Steril**. 2014; 102: 460

Jang M, Lee MJ, Lee JM, Bae CS, Kim SH, Ryu JH, Cho IH. Oriental medicine Kyung-Ok-Ko prevents and alleviates dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats. **PLoS One**. 2014; 9(2):e87623.

Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA: Reduced expression of IL-6 and IL-1 $\alpha$  mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. **J Reprod Immunol**. 2007; 73: 74–84

Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gorden P, Martin MM, Roth J. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. **N Engl J Med**. 1976; 294(14): 739–745.

Kahn CR, Goldstein BJ. Molecular defects in insulin action. **Science**. 1989; 245(4913):13.

Kahsar-Miller MD, Nin C, Boots LR, Go RC, Azziz R. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. **Fertil Steril.** 2001; 75: 53-58.

Karakji EG and Tsang BK. Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 $\beta$  and ovarian follicular development. **Biol Reprod.** 1995; 53: 1302-1310.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **J Clin. Invest.** 1995; 95: 2111-2132.

Ketel IJ, Serne EH, Ijzerman RG, Korsen TJ, Twisk JW, Hompes PG, Smulders YM, Homburg R, Vorstermans L, Stehouwer CD et al. Insulin-induced capillary recruitment is impaired in both lean and obese women with PCOS. **Human Reproduction.** 2011; 26: 3130–3137.

Kim JJ, Choi YM, Chae SJ, Hwang KR, Yoon SH, Kim MJ, Kim SM, Ku SY, Kim SH, Kim JG. Vitamin D deficiency in women with polycystic ovary syndrome. **Clin Exp Reprod Med.** 2014; 41(2): 80-85.

Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T. et al. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. **Endocrinology.** 2000; 141: 1317–1324.  
Koçer D, Baskol G, Bayram F. Biochemical Disorders in Polycystic Ovary Syndrome. **Turkiye Klinikleri J Endocrin.** 2009; 2(2): 28-3.

Kolbus A, Walch K, Nagele F, Wenzl R, Unfried G, Huber JC. Interleukin-1  $\alpha$  but not interleukin-1  $\beta$  gene polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome. **J Reprod Immunol.** 2007; 73: 188–193.

Kotsa, K., Yavropoulou, M.P., Anastasiou, O. et al. Role of vitamin D treatment in glucose metabolism in polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility.** 2009; 92: 1053–1058.

Kousta E, White DM and Franks S Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. **Hum Reprod Update.** 1997; 3(4): 359–365.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S.D. A Novel Form of TNF/Cachectin is a Cell Surface Cytotoxic Transmembrane Protein, Ramifications for The Complex Physiology of TNF. **Cell.** 1997; 53: 45-53.

Lakhani K, Constantinovici N, Purcell WM, Fernando R, Hardiman P. Internal carotid artery haemodynamics in women with polycystic ovaries. **Clin Sci (Lond).** 2000; 98: 661–5.

Larissa Paixão Ramon B. Ramos, Anita Lavarda, Debora M Morsh and Poli Mara Spritzer. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 2017; 15:12

Laura Buggio, Elena Roncella, Edgardo Somigliana & Paolo Vercellini Vitamin D and benign gynaecological diseases: a critical analysis of the current evidence. **Gynecol Endocrinol.** 2015; 0951-3590.

Legro RS, Kunesman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. **Am J Med.** 2001;111: 607-13.

Legro RS, Spielman R, Urbanek M et al. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. **Recent Prog Horm Res.** 1998; 53: 217-56.

Legro RS. Polycystic ovary syndrome and cardiovascular disease: a premature association, *Endoc Rev* 2003;24:302-12.

Leon Speroff, RH Class, NG Kase. Anovulation and The Polycystic Ovary Clinical **Gynecologic Endocrinology and Infertility.** 2005; 465-491

Lerchbaum E, Giuliani A, Gruber HJ et al. Adult-type hypolactasia and calcium intake in polycystic ovary syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf).** 2012; 77(6): 834-843.

Li HWR, Brereton RE, Anderson RA et al. Vitamin D deficiency is common and associated with metabolic risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. **Metabolism: Clinical and Experimental.** 2011; 60: 1475–1481.

Lin Y-S, Tsai S-J, Lin M-W, Yang C-T, Huang M-F, Wu M-H. Interleukin-6 as an early chronic inflammatory marker in polycystic ovary syndrome with insulin receptor substrate-2 polymorphism. **Am J Reprod Immunol.** 2011; 66: 527–533.

Lincoln SR, Lei ZM, Ackermann DM. The expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels. **J Clin Endocrinol Metab.** 2002; 76: 1140-4.

Lips, P. Worldwide status of vitamin D nutrition. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.** 2010; 121: 297– 300.

Lobo RA, Kletzky OA, Campeau JD, diZerega GS. Elevated bioactive luteinizing hormone in women with the polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril.** 1983; 39: 674-678

Lord J, Wilkin T. Metformin in polycystic ovary syndrome. **Curr Opin Obstet Gynecol.** 2004; 16(6): 481-486.

Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, et al. (2004) Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. **J Reprod Immunol.** 2004; 64(1–2): 59–74.

MacEwan D.J. TNF Receptor Subtype Signalling: Differences and Cellular Consequences. **Cell Signal.** 2002; 14: 477-492.

Mahmoudi T. Genetic variation in the vitamin D receptor and polycystic ovary syndrome risk. **Fertility and Sterility.** 2009; 92: 1381–1383.

Mahmoudi T, Gourabi H, Ashrafi M et al. Calcitropic hormones, insulin resistance, and the polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility.** 2010; 93: 1208–1214.

Maliqueo M, Benrick A, Stener-Victorin E. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. **Semin Reprod Med.** 2014; 32(3): 183-93.

March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. **Hum Reprod.** 2010; 25(2): 544-551.



Martoriati A, Lalmanach AC, Goudet G and Gerard N Expression of Interleukin-1 (IL-1) System Genes in Equine Cumulus-Oocyte Complexes and Influence of IL-1beta During In Vitro Maturation. **Biol Reprod.** 2002; 67: 630-636.

Martoriati A and Gérard N. Interleukin-1 (IL-1) system gene expression in granulosa cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 2003; 1: 42

Mazloomi S, Sharifi F, Hajhosseini R, Kalantari S & Mazloomzadeh S. Association between hypoadiponectinemia and low serum concentrations of calcium and vitamin D in women with polycystic ovary syndrome. **ISRN Endocrinology.** 2012; 949427.

Mcarthur JW, Ingersoll FM, Worcester J. The urinary excretion of interstitial-cell and follicle-stimulating hormone activity by women with diseases of the reproductive system. **J Clin Endocrinol Metab.** 1958; 18(11): 1202-1215.

Meirow D, Schenker JG. The link between infertility and cancer: epidemiology and possible aetiologies. **Hum Reprod Update.** 1996; 2(1): 63-75.

Misugi T, Ozaki K, El Beltagy K, Tokuyama O, Honda K, Ishiko O. Insulin-lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-induced PCOS rats. **Gynecol Obstet Invest.** 2006; 61(4):208-15.

Mohling M, Spranger J, Osterhoff M, Ristow M, Pfeiffer AF, Schill T, Schlosser HW, Brabant G, Schfl C. The polycystic ovary syndrome per se is not associated with increased inflammation. **Eur J Endocrinol.** 2004;150: 525-532.

Moller DE. Potential Role of TNF-a in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Trends Endocrinol Metab.** 2000;11(6):212-217.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG The developing human: clinically oriented embryology 8th ed. **Saunders/Elsevier.** Philadelphia USA 2008.

Moran C, Knochenhauer E, Boots LR et al. Adrenal androgen excess in hyperandrogenism:relation to age and body mass. **Fertil Steril.** 1999; 71: 671-674.

Moran LJ, Misso ML, Wild RA and Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction.** 2010; 16: 347–363.

Mosca L., Appel LJ., Benjamin EJ. Evidence based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. **J Am. Coll Cardiol.** 2004; 43: 900-21.

Muscogiuri, G., Policola, C., Prioletta, A. et al. Low levels of 25(OH)D and insulin-resistance: 2 unrelated features or a cause-effect in PCOS? **Clin Nutr.** 2012; 31(4): 476-80.

Nagamani M, Stuart CA. Specific binding and growth promoting activity of insulinin en dometrial cancer cells in culture. **Am J Obstet Gynecol.** 1998; 179(1): 6

Navaratnarajah R, Pillay OC, Hardiman P. Polycystic ovary syndrome and endometrial cancer. **Semin Reprod Med.** 2008; 26: 62–71.

Ngo, D.T.M, Chan, W.P., Rajendran, S. et al. Determinants of insulin responsiveness in young women: Impact of polycystic ovarian syndrome, nitric oxide, and vitamin D. **Nitric Oxide.** 2011; 25(3): 326-330.

Ojeda M, Murri M, Insenser M, Escobar Morreale HF. Mediators of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Curr Pharm Des.** 2013; 19: 5775–5791.

Olszanecka-Glinianowicz M, Banas M, et al. Is the polycystic ovary syndrome associated with chronic inflammation. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2007; 133(2): 197-202.

Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, et al. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 2003; 88(6): 2619-2623.

Orio F, Manguso F, Di Biase S, et al. Metformin administration improves leukocyte count in women with polycystic ovary syndrome: a 6-month prospective study. **Eur J Endocrinol.** 2007; 157(1): 69-73.

Orio F, Palomba S, Spinelli L et al. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. **J Clin Endocrinol Metab.** 2004; 89: 3696-701.

Ott J, Wattar L, Kurz C. et al. Parameters for calcium metabolism in women with polycystic ovary syndrome who undergo clomiphene citrate stimulation: a prospective cohort study. **European Journal of Endocrinology.** 2012; 166: 897–902.

Ozfirat Z, Chowdhury TA. Vitamin D deficiency and type 2 diabetes. **Postgrad Med J.** 2010; 86: 18–25;24.

Ozkan S, Jindal S, Greenseid K et al. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. **Fertility and Sterility.** 2010; 94: 1314-1319.

Paixao L, Velez LM, Santos BR, Tusset C, Lecke SB, Motta AB, Spritzer PM. Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. **J Dev Orig Health Dis.** 2016; 7(4): 384-390.

Pal L, Shu J, Zeitlian G. et al. Vitamin D insufficiency in reproductive years may be contributory to ovulatory infertility and PCOS. **Fertility and Sterility.** 2008; 90: S14.

Panidis D, Balaris C, Farmakiotis D. et al. Serum parathyroid hormone concentrations are increased in women with polycystic ovary syndrome. **Clinical Chemistry.** 2005; 51: 1691–1697.

Paradisi G, Steinberg HO, Shepard MK, Hook G, Baron AD. Troglitazone therapy improves endothelial function to near normal levels in women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 2003; 88: 576–80.

Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P. et al. Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor **Horm Metab Res.** 2010 Sep;42(10):754-757.

Park JH, Choi TS. Polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in the d-galactose-induced aging mouse model. **Biochem Biophys Res Commun.** 2012; 427(4): 701-704

Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Labate AM, Venturoli S, Paradisi R, Zannafini L. Insulin and androgen relationships with abdominal body fat distribution in women with and without hyperandrogenism. **Horm Res.** 1993; 39: 179-187.

Pasquali R, Gambineri A, Biscotti D. Effect of long term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. **Clin Endocrinol**. 2000; 85: 2767-2774.

Pereira Santos M, Costa PR, Assis AM, et al. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. **Obes Rev** 2015; 16: 341–349.

Piltonen TT. Polycystic ovary syndrome: Endometrial Markers, Best Practice & Research. **Clinical Obstetrics and Gynaecology**. 2016; 37: 66-79

Pirwany IR, Fleming R, Greer IA, Packard CJ, Sattar N. Lipids and lipoprotein subfractions in women with PCOS: relationship to metabolic and endocrine parameters. **Clin Endocrinol (Oxf)**. 2001; 54: 447-453.

Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**. 2004; 89(2): 447-452.

Plati E, Kouskouni E, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou M, Kaparos G, Baka S. Visfatin and leptin levels in women with polycystic ovaries undergoing ovarian stimulation. **Fertil Steril**. 2010; 94(4): 1451-1456.

Potter van Loon BJ, Kluff C, Radder JK et al. The cardiovascular risk factor plasminogen activator inhibitor type 1 in related to insulin resistance. **Metabolism**. 1993; 42: 945-949.  
Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. **Nutrition Reviews**. 2008; 66: 153–164.

Radavelli-Bagatini S, Blair AR, Proietto J, Spritzer PM, Andrikopoulos S. The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function. **J Endocrinol**. 2011; 209(3): 307-315.

Rashidi B, Haghollahi F, Shariat M et al. The Effects of Calcium-Vitamin D and Metformin on Polycystic Ovary Syndrome: a Pilot Study. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2009; 48: 142–147.

Razavi M, Jamilian M, Karamali M, Bahmani F, Aghadavod E, Asemi Z. The Effects of Vitamin D-K-Calcium Co-Supplementation on Endocrine, Inflammation, and Oxidative Stress Biomarkers in Vitamin D-Deficient Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Horm Metab Res**. 2016; 48(7): 446-451.

Rebar R, Judd HL, Yen SS, Rakoff J, Vandenberg G, Naftolin F. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. **J Clin Invest**. 1976; 57: 1320-1329.

Renyong Guo, Ying Zheng, Jiezuan Yang and Nengneng Zheng, Association of TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome:a meta-analysis. **BMC Genetics**. 2015; 16: 5

Repaci A, Gambineri A, Pasquali R. The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. **Mol Cell Endocrinol**. 2011; 335(1): 30-41.

Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 2004; 81: 19-25.

Ross MH, Paulina W Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, 6. Baskıdan Çeviri, Baykal B, **Lippincott Williams and Wilkins**. Philadelphia USA 2011; 972.

S, Janssen OE, Hahn S, Tan S, Dietz T, et al. Obesity, depression, and chronic low-grade inflammation in women with polycystic ovary syndrome. **Brain Behav Immun**. 2008; 22(2): 177–184.

Sadhir M, Kansra AR, Menon S. Vitamin D deficiency among adolescent females with polycystic ovary syndrome. **J Pediatr Adolesc Gynecol**. 2015; 28: 378–81.

Sam S, Legro RS, Bentley-Lewis R, Dunaif A. Dyslipidemia and metabolic syndrome in the sisters of women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**. 2005; 90: 4797–802.

Samy N, Hashim M, Sayed M, Said M. Clinical significance of inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: their relationship to insulin resistance and body mass index. **Dis Markers**. 2009; 26(4): 163-170.

Sander VA, Hapon MB, Si'caro L et al. Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 2011; 124: 58–64.

Sayin N, Gücer F, Balkanlı-Kaplan P, et al. Elevated serum TNF- levels in normal weight women with polycystic ovaries or the polycystic ovary syndrome. **J Reprod Med**. 2003; 48: 165-170.

Schneider J, Gabriel MD, Christine MD, Samia MD. The metabolic syndrome in women. **Cardiology in review**. 2006; 14; 286-291.

Selimoglu H, Duran C, Kiyici S. et al. The effect of vitamin D replacement therapy on insulin resistance and androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**. 2010; 33: 234–238.

Schindler AE. Progestogen deficiency and endometrial cancer risk. **Maturitas** 2009; 62: 334–337.

Silfen ME, Denburg MR, Manibo AM, Lobo RA, Jaffe R, Ferin M, et al. Early endocrine, Metabolic and sonographic characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS): comparison between nonobese and obese adolescents. **J Clin Endocrinol Metab**. 2003; 88(10): 4682-4688.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Hum Reprod Update**. 2005; 11(5): 461-471.

Spaczynski RZ, Arici A, Duleba AJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. **Biol Reprod**. 1999; 61: 993–998.

Speroff L, Fritz MA. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.pp. 465-491, **Lippincott Williams & Wilkins**, Philadelphia, PA, 2005.

Stein IF and Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. **AJOG**. 1935; 29: 181.

Stephen Franks, Helen Mason, Debbie Willis, Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. ***Molecular and Cellular Endocrinology***. 2000; 163: 49–52.

Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. ***J Biol Chem***. 1997; 272: 971-976.

Stumpf WE and Denny ME. Vitamin D (solatriol), light, and reproduction. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***. 1989; 161: 1375–1384.

Sun L, Ji C, Jin L, Bi Y, Feng W, Li P, Shen S and Zhu D. Effects of Exenatide on Metabolic Changes, Sexual Hormones, Inflammatory Cytokines, Adipokines, and Weight Change in a DHEA-Treated Rat Model. ***Reproductive Sciences***. 2016; 1-8.

Swanson M, Sauerbrei EE, Cooperberg PL. Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries. ***J Clin Ultrasound***. 1981; 9: 219-222.

Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT: Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. ***Hum Reprod*** 1995; 10: 2793-2799.

Talbott EO, Guzieck DS, Suttentoy Tyrell K. Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle aged women. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol***. 2000; 20: 2414-2421.

Tamez H, Thadhani RI. Vitamin D and hypertension: an update and review. ***Curr Opin Nephrol Hypertens***. 2012; 21: 492–499.

Tarkun I, Canturk Z, Aslan BC et al. The plasminogen activator system in young lean women with polycystic ovary syndrome. ***Endocr J***. 2004; 51: 467-472.

Teegarden D. and Donkin SS. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. ***Nutrition Research Reviews***. 2009; 22: 82–92.

Tehrani HG, Mostajeran F, Shahsavari S. The effect of calcium and vitamin D supplementation on menstrual cycle, body mass index and hyperandrogenism state of women with polycystic ovarian syndrome. ***J Res Med Sci***. 2014; 19(9): 875-880.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group,. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). ***Hum. Reprod***. 2004; 19: 41-47.

Thomson RL, Spedding S and Buckley JD. Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. ***Clinical Endocrinology***. 2012; 77: 343–350.

Thys-Jacobs S, Donovan D, Papadopoulos A. et al. Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. ***Steroids***. 1999; 64: 430–435.

Toulis KA, Goulis DG, Mintziori G, Kintiraki E, Eukarpidis E, Mouratoglou SA, Pavlaki A, et al. Meta-analysis of cardiovascular disease risk markers in women with polycystic ovary syndrome. ***Hum Reprod Update***. 2011; 17: 741–760.

Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. ***Clin Endocrinol***. 2004; 60: 1-17.

Tyndall V, Broyde M, Sharpe R, Welsh M, Drake AJ, McNeilly AS. Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats. **Reproduction**. 2012; 143(1): 21-33.

Unluturk U, Harmanci A, Kocafe C, Yildiz BO. The genetic basis of the polycystic ovary syndrome: a literature review including discussion of PPAR- $\gamma$ . **PPAR Res**. 2007; 1-23.

Vgontzas AN, Trakada G, Bixler EO, Lin HM, Pejovic S, Zoumakis E, Chrousos GP, Legro RS. Plasma interleukin 6 levels are elevated in polycystic ovary syndrome independently of obesity or sleep apnea. **Metab Clin Exp**. 2006; 55: 1076–1082.

Wang B, Zhou S, Wang J, Liu J, Ni F, Liu C, Yan J, et al. Lack of association between interleukin-1a gene (IL-1a) C (-889) T variant and polycystic ovary syndrome in Chinese women. **Endocrine**. 2009; 35: 198–203.

Wehr E, Trummer O, Giuliani A. et al. Vitamin D associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. **European Journal of Endocrinology**. 2011; 164: 741–749.

Wehr E, Pieber TR. and Obermayer-Pietsch B. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in PCOS women-a pilot study. **Journal of Endocrinological Investigation**. 2011; 34: 757–763.

Wehr E, Pilz S, Schweighofer N. et al. Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. **Eur J Endocrinol**. 2009; 161(4): 575-82.

Wehr E, Trummer O, Giuliani A. et al. Vitamin D associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. **European Journal of Endocrinology**. 2011; 164: 741–749.

Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C, Lee W. Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. **Nat Genet**. 2014; 46 (11): 1160-1165.

Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Lobo R, Norman RJ, Talbott E, Dumesic DA. Assessment of Cardiovascular Risk and Prevention of Cardiovascular Disease in Woman with The Polycystic Ovary Syndrome: A Consensus statement by The Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. **J Clin Endocrinol Metab**. 2010; 95(5): 2038-2049.

Wild RA, Rizzo M, Clifton S & Carmina E. Lipid levels in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**. 2011; 95: 1073–1079

Wu H, Siegel RM. Progranulin Resolves Inflammation. **Science**. 2011; 332: 427-428.  
Speeckaert MM, Speeckaert R, Laute M, Vanholder R, Delanghe J. Tumor Necrosis Factor Receptors: Biology and Therapeutic Potential in Kidney Diseases. **Am J Nephrol**. 2012; 35: 261-270.

Xiong Y, Liang XY, Yang X, et al. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 2011; 159: 148–150.

Krul-Poel YHM, C Snackey, et al The role of vitamin D in metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome: a systematic review. **Nutrients**. 2015; 7: 4139–4153.

Krul-Poel YHM, C Snackey, Y Louwers, P Lips, C B Lambalk, J S E Laven and S Simsek, Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, Purcarea VL, Hudita D, Carol Davila The role of vitamin D in metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome: a systematic review, **European Journal of Endocrinology**. 2013;169: 853–865.

Yamamoto S, Nanbu K, et al. Increased expression of LH/hCG receptors in endometrial hyperplasia and carcinoma in anovulatory women. **Gynecol Oncol**. 1997; 65(2): 273-80.

Yildirim B, Sabir N, Kaleli B. Relation of intraabdominal fat distribution to metabolic disorders in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**. 2003; 79(6): 1358-1364.

Yildiz BO, Woods KS, Stanczyk f, et al. Stability of adrenocortical steroidogenesis over time in healthy women and women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**. 2004; 89: 5558-62.

Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, Bayraktar M. Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**. 2003; 88: 2031-2036.

Yildiz BO, Bozdog G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. **Hum Reprod**. 2012; 27(10): 3067-3073.

Yildizhan R, Ilhan GA, Yildizhan B, Kolusari A, Adali E, Bugdayci G. Serum retinol binding protein 4, leptin and plasma asymmetric dimethylarginine levels in obese and nonobese young women with polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril**. 2011; 96: 246-50.

Yildizhan R, Kurdoglu M, Adali E. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. 2009; 280: 559–563.

Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. **Journal of Inflammation Research**. 2014; 7: 69–87.

Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y. et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. **Nature Genetics**. 1997; 16: 391–396.

Youn BS, Bang S, Klötting N, Park JW, Lee N, Oh JE, Pi KB, Lee TH, Ruschke K, Fasshauer M, Stumvoll M, Blüher M. Serum Progranulin Concentrations May Be Associated with Macrophage Infiltration into Omental Adipose Tissue. **Diabetes**. 2009; 58: 627-636.

Zittermann A, Schleithoff SS. and Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. **British Journal of Nutrition**. 2005; 94: 483–492.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Seçil Tan 1 Ekim 1991'de Denizli'de doğmuştur. İlköğretimi Sevil Kaynak İlköğretim Okulu'nda tamamlayıp Mustafa Kaynak Anadolu Lisesi'nde öğrenimine devam etmiştir. 2014 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (İng) bölümünden mezun olmuştur. Mezuniyetinin ardından ilk yüksek lisans eğitimine Pamukkale Üniversitesi Biyoloji bölümünde başlayıp Pamukkale Üniversitesi, Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Türk Pırasa (*Allium ampeloprasum L.*) Islah Programlarında Kullanılmak Amacıyla Ginogenik Bitki Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi. 1130232 TUBİTAK projesinde yüksek lisans, proje bursiyeri olarak 10 ay süreyle görev almıştır. 2015 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Bölümünde yüksek lisansa başlamıştır.



**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 2015SBE005
<b>Proje Başlığı:</b> Sıçanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Polikistik Over Sendromunda Vitamin D'nin Ovaryum İnflamasyonuna etkisi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Yüksek lisans öğrencisi Seçil Tan, Araş.gör. Semih Tan, Doç. Dr. Yavuz Dodurga, Arş. Gör. Mücahit Seçme, Yrd. Doç. Dr. Ergun Mete, Dr.Nazlı çil
<b>Projenin Yürütüldüğü Birim:</b> Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim dalı
<b>Varsa, Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Pamukkale Üniversitesi BAP Birimi
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 9.11.2015-30.05.2017
<p><b>Özet</b></p> <p>Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarda yaygın bir endokrin bozukluktur. Bu çalışmada sıçanlarda dihidroepiandesteron (DHEA) ile deneysel PKOS oluşturularak, vitamin D 'nin ovaryum dokusunda proinflamatuvar sitokinlerden IL-1b, IL-6 ve TNF-a üzerine kısa ve orta dönemde etkisine bakılmıştır. D vitamininin kısa dönemde ovaryumda IL-1, IL-6 ve TNF-a belirteçlerine anlamlı bir etkisi olmadığı fakat kistik folikül sayısını azalttığı görülmüştür. Bunun yanında DHEA'ya daha uzun süre maruz kalan grupta IL-6,IL-1b ve TNF-a ekspresyonlarında artış görülmüştür.</p>

<b>Anahtar Kelimeler:</b> Polikistik over sendromu, Vitamin D, inflamasyon, immünohistokimya, ovaryum
<b>Varsa, Projeden Yapılan Yayınlar:</b>

