



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**OVULASYON İNDÜKSİYONUNUN, POLİKİSTİK OVER
SENDROMU OLUŞTURULAN SIÇANLARDAKİ PI3K/AKT
SİNYAL YOLAĞINA VE MİRNA EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Merve ATEŞ

**OCAK 2024
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OVULASYON İNDÜKSİYONUNUN, POLİKİSTİK OVER
SENDROMU OLUŞTURULAN SIÇANLARDAKİ PI3K/AKT
SİNYAL YOLAĞINA VE MİRNA EKSPRESYONUNA ETKİSİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ATEŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nazlı ÇİL

Denizli, 2024

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 : Merve ATEŞ

İmza :

ÖZET

OVULASYON İNDÜKSİYONUNUN POLİKİSTİK OVER SENDROMU OLUŞTURULAN SIÇANLARDAKİ PI3K/AKT SİNYAL YOLAĞINA VE MİRNA EKSPRESYONUNA ETKİSİ

Merve ATEŞ

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Nazlı ÇİL

Ocak 2024, 74 Sayfa

Polikistik over sendromu (PCOS), dünya genelinde üreme çağındaki kadınların %4-21'ini etkileyen, infertilite nedeni olan, metabolik bozukluklar ile karakterizedir. miRNA ekspresyonlarının değişmesinin serviks kanseri, endometriozis, zayıf ovaryum yanıtı ve kardiyovasküler hastalıklara katkıda bulunur. Bu yüzden bazı miRNA'lar, PCOS'ta anormal metabolizma, bozulmuş oosit kalitesi ve düşük endometrial reseptivite için yeni biyobelirteçler olabileceği bulunmuştur. Bu çalışmada amacımız ovulasyon indüksiyonunun, PCOS hastalarındaki PI3K-AKT sinyal yolağına ve miRNA ekspresyonuna etkisini incelemektir.

28 Sprague Dawley erişkin dişi sıçanlar rastgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu yalnızca 25 gün boyunca %0.9 izotonik soydum klorür (1mg/kg) ile gavaj uygulanırken, PCOS ve PCOS+OI gruplarına 25 gün boyunca (1mg/kg) Letrozol gavaj yoluyla uygulandı. Ovulasyon indüksiyonu sağlanması için 25. gün 150-300 IU/kg gebe kısrak serum gonadotropini intraperitoneal enjeksiyonuyla süperovülasyon yapıldı. 48 saat sonra 150-300 IU/kg insan koryonik gonadotropini (hCG) intraperitoneal olarak verildi. Kan FSH, östrojen ve testosteron düzeyleri ELİSA yöntemiyle incelendi. Ovaryum dokuları histopatolojik olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak PI3K/AKT yolağı değerlendirilmesi, miR-451a, miR-33b-5p, miR-378a-5p, miR-486-5p miR-140, miR-320a ekspresyonları RT-PCR yöntemiyle belirlendi.

Çalışmamızda vajinal smear bulguları, kan hormon düzeyleri deneysel PCOS modeli oluşturduğumuzu göstermiştir. Ovulasyon indüksiyonunun T ve E2 düzeyini daha da arttırması ve FSH düzeyini Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşürdü ($p<0,05$). PCOS+OI grubunda miRNA analizlerinde miR-140, 378 ve 486'nın ekspresyonu düşmesi ve miR-451 artışı istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0,05$). İmmünohistokimyasal analiz sonucunda PI3K, AKT, p-PI3K, p-AKT ekspresyonları PCOS+OI grubunda PCOS grubuna göre istatistiksel anlamlı pozitif reaksiyon gösterdi. Ovulasyon indüksiyonu, PCOS deneysel sıçan modelinde miR-140, 378 ve 486 ekspresyonunu azaltıp, miR-451 ekspresyonunu arttırarak, PI3K/AKT sinyal yolağını aktive etmiştir. Bu yolağın aktivasyonu granüloza hücre apoptozisini ve otofajik hücre ölümünü inhibe etmiş olup foliküler atreziyi önlemeye yardımcı olmuştur. Bu sonuçlar PCOS'un patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda infertilite sebebi sayılan PCOS hastalarına tedavi için yeni bir yön sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Letrozol; Micrornas; Ovulasyon İndüksiyonu; PI3K/AKT Sinyal Yolağı; Polikistik Over Sendromu (PCOS).

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022SABE017)

ABSTRACT**EFFECT OF OVULATION INDUCTION ON PI3K/AKT SIGNALING PATHWAY AND MIRNA EXPRESSION IN RATS WITH POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME**

ATEŞ, Merve

Master Thesis, Department of Histology and Embryology

Thesis Advisor: Doç. Dr. Nazlı ÇİL

January 2024, 74 Pages

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is characterized by metabolic disorders that affect 4-21% of women of reproductive age and is a cause of infertility. Altered miRNA expression contributes to cervical cancer, endometriosis, poor ovarian response and cardiovascular disease. Therefore, some miRNAs have been found to be novel biomarkers for abnormal metabolism, impaired oocyte quality and reduced endometrial receptivity in PCOS. The aim of this study was to investigate the effect of ovulation induction on PI3K-Akt signaling pathway and miRNA expression in PCOS patients.

28 Sprague Dawley adult female rats were randomly divided into 3 groups. The control group received only 0.9% isotonic 0.9% sodium chloride (1mg/kg) by gavage for 25 days, while PCOS and PCOS+Ovulation induction (PCOS+OI) groups received Letrozole at a dose of 1mg/kg by gavage for 25 days. For ovulation induction, superovulation was performed by intraperitoneal injection of 150-300 IU/kg pregnant mare serum gonadotropin on the 25th day. After 48 hours, 150-300 IU/kg human chorionic gonadotropin (hCG) was given intraperitoneally. Blood FSH, estrogen and testosterone levels were analyzed by ELISA method. Ovarian tissues were evaluated histopathologically. PI3K/AKT pathway was evaluated immunohistochemically and miRNA-451a, miRNA-33b-5p, miRNA-378a-5p, miRNA-486-5p, miRNA-140, miRNA-320a expressions were determined by RT-PCR method.

In our study, vaginal smear findings and blood hormone levels showed that we created an experimental PCOS model. Ovulation induction further increased T and E2 levels and decreased FSH levels significantly compared to the control group ($p<0.05$). In miRNA analysis, miR-140, 451 and 378 expression decreased and miR-451 increased significantly in PCOS+OI group ($p<0.05$). As a result of immunohistochemical analysis, PI3K, AKT, p-PI3K, p-AKT expressions showed statistically significant positive reaction in PCOS+OI group compared to PCOS group.

Ovulation induction activated PI3K/AKT signaling pathway by decreasing miR-140, 378 and 451 expression and increasing miR-451 expression in PCOS experimental rat model. Activation of this pathway inhibited granulosa cell apoptosis and autophagic cell death and helped prevent follicular atresia. These results not only help to understand the pathogenesis of PCOS, but may also provide a new direction for the treatment of PCOS patients with infertility.

Anahtar Kelimeler: Letrozol; Micrornas; Ovulation Induction; PI3K/AKT Signaling Pathway; Polycystic Ovary Syndrome (PCOS).

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project number 2022SABE017

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini, önerilerini ve değerli tecrübesini benimle paylaşan yalnızca tez danışmanım olarak değil her konuda bana fazlasıyla yardımcı olan ve inanan tez danışmanım Doç. Dr. Nazlı ÇİL'e,

Tez çalışmam süresince yardımını esirgemeyen ve değerli yorumlarıyla tezime katkı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye

Ders dönemim sürecinde destekleri ve emekleri için değerli bölüm hocalarım Prof.Dr. Hülya ÇETİN, Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR, Doç.Dr. Nazan KESKİN, Dr.Öğr. Üyesi Serkant ÜNAL ve asistan hekimlerimize; cerrahi aşamada yardımcı olan veteriner hekim BARBAROS ŞAHİN'e ve veteriner hekimlerine teşekkür ederim.

Tez sürecimde yardıma ihtiyacım olduğunda en çok yanımda olan erkek kardeşim Kerem ATEŞ'e ve sabır, ilgi ve anlayışlarıyla Sercan CEK'e, maddi manevi beni destekleyen, sabır ve sevgileriyle günlere gelmeme yardımcı olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Kadın Genital Sistem Embriyolojisi.....	3
2.2. Ovaryum Embriyolojisi.....	4
2.3. Kadın Genital Sistem Histolojisi.....	4
2.4. Ovaryum.....	5
2.4.1. Ovaryum folikül gelişimi.....	6
2.5. Ovulasyon.....	8
2.6. Korpus Luteum.....	9
2.7. Menstrual Siklus.....	9
2.8. Sıçanlardan Folikül Gelişimi.....	10
2.9. Polikistik Over Sendromu	11
2.10. İnfertilite.....	12
2.11. Ovulasyon İndüksiyonu.....	13
2.12. mikroRNA.....	14
2.13. Sinyal Yolakları.....	16
2.13.1. PI3K-AKT sinyal yoluna genel bakış.....	16
2.13.2. Sinyal yolunda Akt'ın rolü.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
3.1. PCOS Oluşturulması ve Deney Prosedürü	18
3.2. Vajinal Smear Uygulaması.....	19
3.3. ELISA Yöntemi.....	22
3.3.1. Follicle stimulating hormone (FSH).....	23
3.3.2. Estradiol (E2)	24
3.3.3. Testosteron.....	25
3.4. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu	26
3.5. cDNA Sentezi.....	27
3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	28
3.7. Histopatolojik İnceleme.....	30
3.7.1. Fiksasyon.....	30
3.7.2. Doku takip yöntemi.....	30
3.7.3. Hematoksilen-Eozin boyama	31

3.7.4. Folikül sayımı yöntemi.....	32
3.7.5. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi.....	33
3.8. İstatiksel Analiz	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Hayvan Ağırlıkları Bulguları.....	35
4.2. ELISA Bulguları.....	36
4.3. Vajinal Smear Bulguları.....	38
4.4. Makroskopi Bulguları.....	43
4.5. RT-PCR Bulguları.....	44
4.6. Histopatolojik Bulgular.....	45
4.6.1. Hemotoksilen&Eozin boyama bulguları.....	46
4.7. Folikül Sayımı Bulguları.....	47
4.8. İmmünohistokimyasal Bulgular	49
4.8.1. PI3K immünohistokimyasal bulguları.....	49
4.8.2. p-PI3K immünohistokimyasal bulguları.....	52
4.8.3. AKT immünohistokimyasal bulguları.....	54
4.8.4. p-AKT immünohistokimyasal bulguları.....	57
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ.....	66
7. KAYNAKLAR.....	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	74

EKLER

Ek-1. Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu Onayı

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1.	Over kesitinde primordiyal, primer ve sekonder folikül..... 6
Şekil 2.2.	Ovaryum korteksinde bulunan graaf folikül..... 8
Şekil 2.3.	mikroRNA'ların sinyal yollarına etki mekanizması..... 15
Şekil 3.1.	Östrus sikluslarının dairesel grafiği..... 20
Şekil 3.2.	Östrus sikluslarının evreleri ve görülen hücreler..... 22
Şekil 4.1.	Sıçanlardan alınan vajinal smear preparatlarının boyama öncesi görüntüleri..... 38
Şekil 4.2.	Deney süresince gruplardan alınan vaginal smear örneklerinin boyanması sonucu elde edilen görüntüler..... 41
Şekil 4.2.Devam	Deney süresince gruplardan alınan vaginal smear örneklerinin boyanması sonucu elde edilen görüntüler..... 42
Şekil 4.3.	Ovaryum örnekleri makroskobik resmi..... 43
Şekil 4.4.	Üç ayrı gruptan alınan ovaryum kesitlerinin Hematoksilen-Eozin boyama sonuçları..... 46
Şekil 4.5.	Ovaryum dokularında PI3K ekspresyonu..... 51
Şekil 4.6.	Ovaryum dokularında p-PI3K ekspresyonu..... 53
Şekil 4.7.	Ovaryum dokularında AKT ekspresyonu..... 56
Şekil 4.8.	Ovaryum dokularında p-AKT ekspresyonu..... 58

TABLOLAR

		Sayfa
Tablo 3.1.	Vajinal smearde hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları.....	20
Tablo 3.2.	PCR için kullanılan primer dizileri.....	29
Tablo 4.1.	Gruplardaki sıçanların başlangıç ve son ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	35
Tablo 4.2.	Grupların kan hormon düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	36
Tablo 4.3.	Kontrol grubu vajinal smearde hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları..	39
Tablo 4.4.	PCOS grubu vajinal smearde hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları..	39
Tablo 4.5.	PCOS+OI grubu vajinal smearde hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları..	40
Tablo 4.6.	RT-PCR sonucuna göre kontrol ve diğer grupların miRNA ekspresyon seviyelerinde değişiklikleri.....	44
Tablo 4.7.	Deney gruplarının folikül sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.8.	PI3K ekspresyonu immünohistokimyasal olarak sonuçları.....	50
Tablo 4.9.	p-PI3K ekspresyonu immünohistokimyasal olarak sonuçları.....	52
Tablo 4.10.	AKT ekspresyonu immünohistokimyasal olarak sonuçları.....	55
Tablo 4.11.	p-AKT ekspresyonu immünohistokimyasal olarak sonuçları.....	57

SİMGE VE KISALTMALAR

μ l	Mikrolitre
AKT	protein kinaz B
DHEA	Dehidroepiandrosteron
E2	Östradiol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FF	Foliküler sıvı
FSH	Folikül stimule edici hormon
hCG	İnsan koryonik gonadotropini
GLUT	Glukoz taşıyıcı protein
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
IRS	İnsülin reseptör substratı
H&E	Hematoksilen-Eozin Boyama
IVF	İn vitro fertilizasyon
miR	miRNA
ml	Mililitre
PCOS	Polikistik over sendromu
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
T	Testosteron

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PCOS), hiperandrojenizm, yumurtlama bozukluğu ve polikistik ovaryumlarda sıklıkla insülin direnci, obezite ve kronik inflamasyonun eşlik ettiği morfolojik değişiklikler ile karakterizedir (Caldwell ve ark., 2014). PCOS infertilite için kadınlarda önde gelen nedenlerden biridir (S. Y. Li ve ark., 2016). PCOS hastalarının %60'ından fazlasında değişen derecelerde IR vardır (Sirmans & Pate, 2013).

PCOS patofizyolojisinde miRNA'nın olası etki biçimleri çok az araştırılmıştır ve şimdiye kadar sadece birkaç miRNA-PCOS çalışması mevcuttur. Altta yatan moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılması, bu sendromun tanı ve tedavisini iyileştirmeye yardımcı olabilir (Anja Elaine Sørensen ve ark., 2014). miRNA kodlayıcı olmayan, 19-25 nükleotid içeren küçük tek iplikli RNA anahtarıdır. Gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olan miRNA, ekspresyonu etkileyebilir ve down stream hedef genini değiştirebilir ve hücre büyümesini, farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptozu, inflamasyonu, stres yanıtını ve malign tümör metastazını etkileyebilir (Flynt & Lai, 2008; Lim ve ark., 2005).

Birçok çalışma, miRNA'ların değişmesinin serviks kanseri, endometriozis, zayıf ovaryum yanıtı ve kardiyovasküler hastalıkların başlangıcına etki edebileceğini saptamıştır. Bu nedenle potansiyel tanı ve izleme biyobelirteçleri olarak hizmet edebileceğini göstermiş olup PCOS hastaları arasında, serum, yağ dokusu (AT), foliküler sıvı (FF), granüloza hücreleri (GC'ler) ve kümülüs hücrelerinde (CC'ler) birkaç miRNA farklı şekilde eksprese edildiği bulunmuştur (Cortez ve ark., 2011). Bu yüzden bazı miRNA'lar, PCOS'ta anormal metabolizma, bozulmuş oosit kalitesi ve düşük endometrial alıcılık için yeni biyobelirteçler olabilir (Kamalidehghan ve ark., 2020). Araştırmacılar, PCOS'un patogenezinde sinyal yollarının rolüne yakından dikkat etmeye başladılar. Son yıllarda, PCOS ile ilgili olarak fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt) üzerinde çalışmışlar. PI3K'nın aktivasyonu, büyük ölçüde, plazma zarının alt tabakasına

yakın iç tarafında meydana gelir. PCOS üzerine artan araştırma ile bilim adamları, PCOS ve PI3K-Akt sinyal yolu arasındaki ilişkiye dikkat ettiler ve vücut insüline, androjene, obeziteye, foliküler gelişime vb. dirençli olduğunda PI3K-Akt sinyal yolu üzerindeki değişikliği buldular. PI3K-Akt sinyal yolundaki bu değişiklik, PCOS patogenezinde anahtar faktör olarak rol oynayabilir.

Selektif östrojen reseptör modülatörleri ve/veya aromataz inhibitörü ile tedavi sonrasında yumurtlamayı başaramayan kadınlarda düşük doz FSH stimülasyonu endike olabilir. Tedavi gonadotropin stimülasyonu ile ilgili deneyim, dikkatli takip ve multifoliküler gelişim durumunda IVF'ye dönüş imkanı gerektirir. Normal başlangıç dozu 2 hafta süreyle 50-75 IU'dur ve yanıt alınamaması durumunda haftalık 25-37.5 IU'luk bir artış sağlanır. Folikül gelişimi meydana gelirse, folikül boyutu 18-20 mm'ye ulaşana kadar aynı doz sürdürülür, ardından insan koryonik gonadotropin veya LH ile nihai foliküler olgunlaşma indüksiyonu yapılır. IVF ile kontrollü ovaryen stimülasyonu, PCOS'lu kadınlara yalnızca diğer tedaviler başarısız olursa veya çok faktörlü infertilite durumunda önerilmelidir. FSH stimülasyonuna aşırı tepki verme ve dolayısıyla ovaryum hiperstimülasyon sendromu geliştirme riski yüksektir. PCOS'ta FSH ile her türlü ovaryen stimülasyon, foliküler gelişim deneyimli personel tarafından dikkatle izlenmeli ve aşırı yanıtı ele alma stratejileri mevcut olmalıdır. Ovulasyon indüksiyonunu PCOS hastalarında kullanımı yukarıda da anlattığımız gibi IVF tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat bu tedavinin PCOS'lu hastalarda oosit aktivasyonu için önemli olan PI3K sinyal yolağını ve miRNA ekspresyonuna nasıl bir etki yaptığı bilinmemektedir (Tanbo ve ark., 2018).

1.1. Amaç

Bu çalışmada amacımız ovulasyon indüksiyonunun, PCOS hastalarındaki PI3K-Akt sinyal yolağına ve miRNA ekspresyonuna etkisine ilişkin daha fazla araştırma yapmaktır. Bu durum PCOS'un patogenezinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur ve aynı zamanda infertilite sebebi sayılan PCOS hastalarına tedavi için yeni bir yön sağlayabilir.

2. KURUMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kadın Genital Sistem Embriyolojisi

Dişi genital sistemi iç genital organlar olarak iki ovaryum, iki genital boşaltma yolları (tuba uterina), uterus ve vaginadan oluşan ve dış genital organlar olan mons pubis, klitoris, labia minor ve labia major'dan oluşan dış genital organlardan meydana gelmiştir. Embriyonik 7. haftaya kadar gonadlar (testisler ve overler) gelişmeye başlamazlar. Erken dönemde genital sistem farklılaşmamıştır. Her iki cinste de farklılaşmamış gonadlar birbirlerine benzer görünümündedirler.

Gonadlar posteriyör karın duvarının sölom epitelinde, mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve ilkel germ hücreleri olarak 3 ayrı orjinden köken almaktadır. Gelişimi 5.haftada başlar bu evre 'farklılaşmamış evre' olarak adlandırılır.

Gonadların over veya testise farklılaşmasında, primordiyal germ hücrelerinin baskılayıcı etkisi bulunmaktadır. Mezonefrozun medialinde mezotelyal bir kalınlaşmanın gelişimi ile 5.haftada ortaya çıkmaktadır. Daha sonra epitelin ve altındaki mezenşimin farklılaşmasıyla medialde bir 'Gonadal Kabartı' oluşur. Parmak biçimindeki epitel kordonları (birincil cinsiyet kordonları), alttaki mezenşime doğru hızla büyürler. Dış kısmında korteks iç kısmında ise medulla oluşur. Korteks tabakası embriyonun XX seks kromozomlarına sahip olmasıyla overe differansiye olur. Medulla ise geriler.

İnsanda gelişimin 6.haftasına kadar gonadal belirginleşme germ hücreleri bulunmamaktadır. Primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri içerisinde belirginleşir. Bu hücreler amip hareketlerle son barsağın mezenteriumu üzerinden dorsale doğru ilerleyerek belirginleşen primitif gonadal kabartıya ulaşır. Ulaşamayan germ hücreleri gelişemez.

2.2. Ovaryum Embriyolojisi

Ovaryumların görevi oosit üretmek ve bu üretim üzerine etkili olan hormonları salgılamaktır (Moore K ve ark. 2002).

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş gerçekleşmektedir. XX kromozomları ile birlikte otozomal bir genin de histolojik olarak 10.haftalığa kadar seçilemeyen ovaryumların gelişiminde rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Gonadal kordonlar belirgin değildir ve medulla içerisine girinti yaparlar. Rudimenter bir yapı olarak rete ovariiyi oluşturup gonadal kordonlar ile dejenere olup kaybolmaktadırlar. Dişi gonadda yüzey epiteli sürekli çoğalarak kordonları yani sekonder kordonları oluştururlar. Erken fetal dönemde overin yüzey epitelinden köken alarak kortikal kordonlar altındaki mezenkim içerisine doğru girerler. Bu epitel peritonun mezotelinden gelişmektedir. Boyutları artmaya devam eden kortikal kordonlar primordial germ hücrelerinin içlerine girerler. Yaklaşık 16.haftada hücre kümelerine parçalanırlar ve primordiyal foliküller oluşur. Foliküller primordiyal germ hücrelerinden köken almış oogonium içerirler ve onun çevresinde yüzey epiteli kökenli tek katlı yassı şeklinde foliküler hücreleri içerirler. Fetal dönemde oogoniumların mitozla uğramasıyla birlikte çok sayıda primordiyal folikül meydana gelir fakat birçoğu doğumdan önce dejenerasyona uğrar. Postnatal dönemde yeni oluşan primordiyal foliküller mümkün değildir. (Moore K ve ark. 2002) Doğumun ardından over yüzeyi tek katlı epitel haline gelir.

2.3. Kadın Genital Sistem Histolojisi

Kadın genital sistemi internal genital organlarından ve eksternal genital yapılardan oluşmaktadır. Kadın internal (iç) üreme organları pelviste, iki ovaryum ve tuba uterina, uterus ve vajina yer almaktadırlar. Dış genital yapılar (eksternal genitalya) ise perineumun vulva adı verilen anterior bölgesinde mons pubis, labium majuslar ve minuslar, klitoris, vestibul, vajina açıklığı, hymen ve dış üretra ağzından oluşmaktadır.

Cinsel olarak matür dişilerde ovaryumlar, tuba uterinalar ve uterus belirgin bazı değişiklikler göstermekte ve bu değişiklikler nöral aktivite ve hormon düzeylerinin her

menstrual siklusta ve gebelik sırasında değişimlerinden etkilenmektedir. Siklik değişiklikler menopoz dönemine süresince devam eder fakat bu aşamada seyrekleşmeye başlayarak durur.

2.4. Ovaryum

Ovaryumların birbiriyle ilişkili iki fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar gametogenez (gametlerin üretilmesi) ve steroidogenez (steroidlerin üretilmesi) (Ross ve Pawlina 2011). Steroidogenez sonucu üretilen östrojenler iç ve dış genital organların büyümesini ve olgunlaşmasını desteklerler ve pubertede dişi cinsiyet karakteristiklerinin gelişimini sağlarlar.

Ovaryum dış bölümde korteks ve iç bölümde medulladan oluşmaktadır (Ross ve Pawlina 2011). Medulla ya da medullar bölge, ovaryumun merkezinde bulunmaktadır ve gevşek bağ dokusu, kısmen büyük, kıvrımlı kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirleri içermektedir. Korteks, zengin bir şekilde selüler bağ dokusu içine gömülü ovaryum folikülerini içermektedir (Ross ve Pawlina 2011). Korteksin en iyi ayırt edici özelliği, çeşitli gelişme ve gerileme aşamalarında olan ovaryum folliküllerinin yerleşmiş olmasıdır. Korteks ve medulla arasındaki sınır belirsizdir.

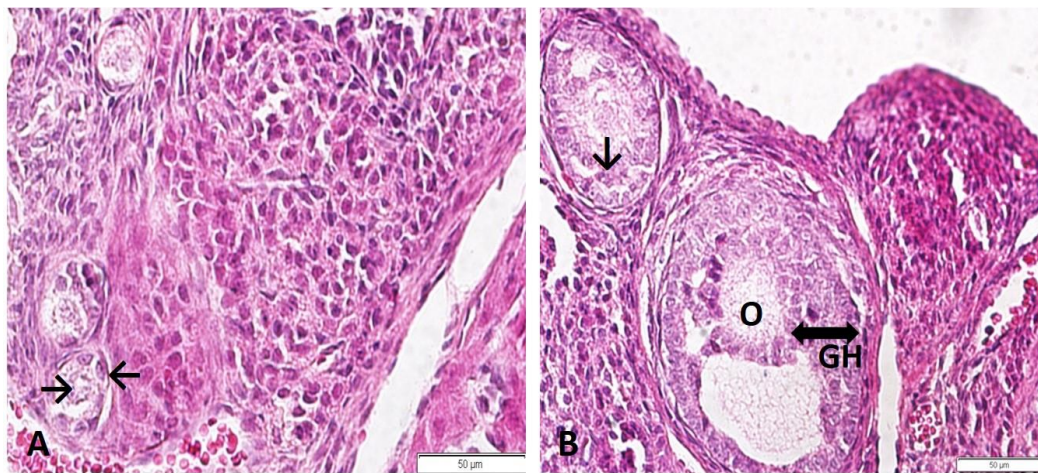
Ovaryumun yüzeyi tek katlı kübik epitel ile çevrilidir fakat bazı bölgelerde germinal epitel olarak bilinen yassı epitel ile döşelidir. Korteks ile germinal epitel arasında tunika albuginea adında sıkı bağ dokusu bulunur. Tek bir oosit içeren çeşitli boyutlardaki ovaryum foliküleri korteksin stromasına dağılmışlardır. Folikülün yaklaşık büyüklüğü, oositin gelişim evresini belirtir. Doğum sırasında zaten bulunan oositler birinci mayotik bölünmesinde arreste uğramış olarak dururlar. Puberte başlangıcıyla gruplar halinde siklik büyümeye ve matürasyona başlarlar. Her menstrual siklusta bir oositin tam olarak olgunlaşması ve ovulasyonu beklenmektedir. Doğum esnasında mevcut olan tahmini 600.000-800.000 primer oositin birçoğu olgunlaşmasını bitiremez ve atreziye uğrarlar. Atrezi primer oosit sayısını yaşam boyunca logaritmik olarak azaltmaktadır (Ross ve Pawlina 2011).

2.4.1. Ovaryum Folikül Gelişimi

Histolojik olarak gelişim evrelerine göre ovaryum folikülleri 3 gruba ayrılabilir: primordiyal foliküller, gelişmekte olan foliküller ve olgun (Graf) foliküller. (Ross ve Pawlina 2011) Primordiyal foliküller folikül gelişiminin en erken evresidir. Fetal gelişimin 3. ayında ilk olarak ortaya çıkarlar. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yer alır. Gelişiminin erken evresinde gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Oosit etrafında tek bir kat halinde yassı folikül hücreleri çevreleyerek bu hücrelerinin dış yüzeyi bir bazal lamina tarafından bağ dokusundan ayrılmaktadır. Folikülün içindeki oosit ortalama 30 µm çapındadır. Bir ya da daha fazla sayıda nükleolus içeren büyük eksantrik bir nükleusa sahiptir.

Bir primordiyal folikül, gelişen bir foliküle dönüşürse, oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler başlar. Oosit büyür ve oositin etrafını çevreleyen yassı folikül hücreleri kübik şekline gelirler ve bu aşamada primer folikül denir. (Ross ve Pawlina 2011)

Oositin büyüdükçe oosit ile folikül hücreleri arasında özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek ekstraselüler bir örtü olan zona pellusidayı oluştururlar. Folikül hücreleri, primer folikülün granüloza tabakasını oluşturmak için tabakalanmaya uğrarlar ve stratum granulosum adı verilen çok katlı bir epitel oluştururlar (Şekil 2.1.).



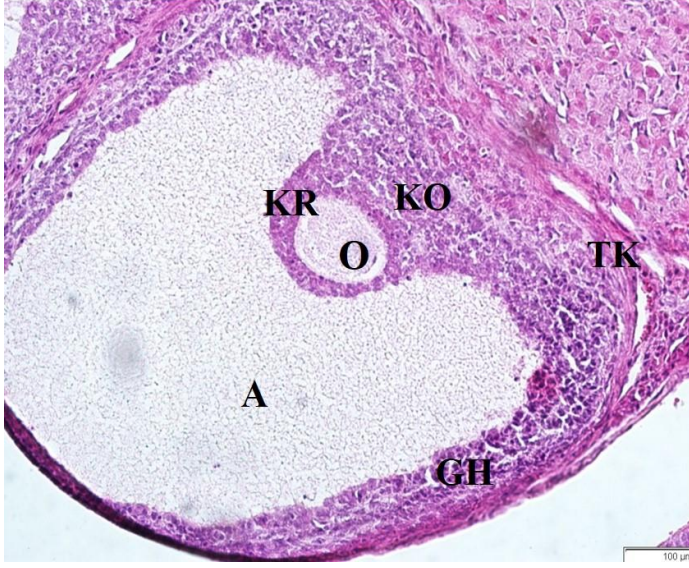
Şekil 2.1. Over kesitinde primordiyal, primer ve sekonder folikül A: Primordiyal folikül, yassı granüloza hücre tabakası (←), oosit (→), B: Üstteki primer folikül, kübik granüloza hücre tabakası (↓), altaki sekonder folikül, O: Oosit, GH (↔): Granüloza hücre tabakası, H&E, Bar 50µm.

Aynı zamanda granüloza hücreleri proliferasyona uğradığında folikülün çevresindeki stromal hücreler bazal laminanın hemen dışında teka folikülü adı verilen primer folikülün teka tabakalarını oluştururlar. Teka folikülü, iç tabaka teka interna, dış bağ dokusu hücrelerinden ve kollajen fiber demetleri içeren teka eksterna olarak iki tabakaya farklılaşır. Teka internanın hücreleri birçok luteinizan hormon (LH) reseptörlerine de sahiptir.

Oositler kortikal granül olarak bilinen özelleşmiş salgı vezikülleri sergilerler. Bunlar, oolemmenin (oositin plazma membranı) hemen altında yer almaktadırlar. Aynı zamanda, granüloza hücrelerinde ince uzantılar oluşur ve oosite doğru uzanırken oositin mikrovillusları ile iç içe geçer ve bazıları da oositin plazma membranının içine doğru uzamaya başlar. Uzantılar plazma membranına temas edebilirler ama hücrelerin arasında sitoplazmik devamlılık sağlamazlar. Stratum granulozum 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında granüloza hücrelerinin arasında likör folikülü denen ve hyaluronan bakımından zengin sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlar, sıvı biriktikçe kaviteler birleşir ve en sonunda antrum adı verilen bir kavite oluşur. Folikül artık sekonder folikül ya da antral folikül adını almaktadır. Yaklaşık 125 µm çapındaki oositin, granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salgılanan küçük, 1-2 kilodaltonluk bir peptit olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından daha fazla büyümesi inhibe edilmektedir.

Sekonder folikül büyüdükçe antrum genişler. Oosit ile ilişkili olduğu bölgede granüloza hücreleri kumulus ooforus denilen ve antruma doğru bir yükselti oluştururlar. Oositin hemen etrafını çevreleyen ve ovulasyonda oositle birlikte kalan kumulus ooforus hücreleri korona radiata'dır. (Ross ve Pawlina 2011)

Graaf folikülü (Şekil 2.2.) büyük boyutundan dolayı ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanır ve ovaryumun yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Bu durum devam ettikçe oosit ve kumulus hücreleri ile geri kalan granüloza hücreleri arasındaki yakınlık gevşer ve ovulasyona hazırlanmaya başlanılır. Oositin hemen çevresindeki kumulus hücreleri korona radiatanın tek hücre tabakasını oluşturmaktadır. Folikül maturasyonunun bu aşamasında teka tabakaları daha belirgin hale gelirler (Ross ve Pawlina 2011). Ovulasyondan tam 1 gün önce adenohipofizde LH salınımı ani bir şekilde artışa geçtikten sonra 12-24 saatin sonunda primer oositin mayotik bölünmesi sonlanır ve sekonder oosit ve birinci kutup cisimciği oluşumu ile sonuçlanır.



Şekil 2.2. Ovaryum korteksinde bulunan graaf folikül, TK: Teka tabakası, GH: Granüloza hücre tabakası, A: Antrum boşluğu, KR: Korona Radiata, O: Oosit, KO: Kümülüs Ooforus, H&E, Bar 100µm.

2.5. Ovulasyon

Ovulasyon, sekonder oositin Graaf folikülünden atıldığı bir aşamadır. Ovulasyon sırasında oosit, tüm foliküler duvarı geçer. Foliküler sıvı hacminin artması bu şekilde basıncının artması ve teka eksternadaki düz kas liflerinin prostaglandinler tarafından tetiklenmesi ile kasılarak sekonder oositin salıverilmesinden sorumlu faktörlerdir.

Ovulasyon sırasında tuba uterinanın fimbriyaları ovaryumun yüzeyine yaklaşarak oositi içeren kumulus fimbriyalar tarafından tuba uterinanın abdominal ostiumuna doğru yavaşça süpürülür. Kumulus kütlesi fimbriyaya sıkıca tutunur. Tuba uterinayı döşeyen silyalı hücreler tarafından aktif bir şekilde taşınmaktadır. Ovulasyondan sonra sekonder oosit yaklaşık 24 saat canlı kalmaktadır. Bu periyotta fertilizasyon gerçekleşmez ise sekonder oosit tuba uterinayı geçerken dejenerasyona uğrar kumulus oosit kompleksinin atılımı gerçekleşir (Ross ve Pawlina 2011).

2.6. Korpus Luteum

Ovulasyonda geriye kalan granüloza ve teka hücrelerinden oluşan folikül duvarı derin katlantılar yapar ve korpus luteuma (sarı cisim) ya da luteal beze dönüşür. Granüloza ve teka interna tabakalarının hücreleri luteinizasyon denen bir süreçte granüloza luteal ve teka luteal hücrelere farklılaşır. Bu luteal hücreler ani morfolojik değişimlere uğrayarak, boyutları artar ve yağ damlacıkları ile dolmaya başlarlar. Korpus luteumun içinde progesteron ve östrojenleri salgılayan zengin damar ağı oluşur. Bu hormonlar uterusu döşeyen endometriyumun büyümesini ve salgı aktivitesini stimüle ederek fertilizasyon gerçekleştiğinde zigotun yerleşmesi için hazırlar (Ross ve Pawlina 2011).

Fertilizasyon ve implantasyon eğer gerçekleşmez ise korpus luteum sadece 2 hafta aktif halde kalır. Bu durumda menstruasyon korpus luteumu denir. İnsan koryonik gonadotropini (hCG) ve diğer luteotropinlerin yokluğunda progesteronun ve östrojenlerin salgılanma hızı azalır ve korpus luteum ovulasyondan 10-12 gün sonra dejenere olmaya başlar.

2.7. Menstrual Siklus

Üreme çağında endometriyum ardışık olarak her 28 günde bir kendisini embriyo implantasyonuna ve sonrasında gelen embriyonik ve fetal gelişimler olaylarına hazırlayan siklik değişimlere uğrar. Kanın ve dokunun vajinadan genellikle 3-5 gün süren boşaltılması menstruasyon ya da menstrual kanama olarak adlandırılmaktadır. (Ross ve Pawlina 2011) Östrojen ve progesteron gibi ovaryan foliküller ve korpus luteumdan salgılanan hormonlar endometriyumda siklus değişikliklere sebep olur. Gonodotropik ve ovaryan hormonların konsantrasyonun değişiklikleri ile endometriyal değişiklikler birlikte gözlenir. Menstrual siklus 28 gün civarı sürer ve menstrüel kanamanın başladığı ilk siklusun 1.günü sayılır. (Moore K ve ark. 2002) Menstrual siklusun fazları gerçekleşirken endometriyumun kalınlığı 1-6 mm arasında değişir. (Ross ve Pawlina 2011)

Siklus üç ardışık fazdan oluşmaktadır. Bunlar: • Proliferasyon fazı, foliküler maturasyon ile aynı anda gerçekleşir ve ovaryan östrojen salgılanmasından etkilenir. • Sekretuar faz, korpus luteumun fonksiyonel aktivitesiyle aynı zamana denk gelir ve primer olarak progesteron salgısından etkilenir. • Menstrual faz, korpus luteumun dejenerasyonu nedeniyle ovaryumun hormon üretiminin azalmasıyla başlar. Bütün fazlar devamlı bir sürecin parçasıdır ve birinden diğerine ani geçişler olmaz. Menstrual fazın sonunda endometriyum yaklaşık 1 mm kalınlığında ince bağ dokusundan meydana gelmektedir. Bu tabaka stratum bazaledir. Dökülen tabaka ise stratum fonksiyonaleydi. Östrojenlerin etkisi altında, proliferasyon fazı başlar. Proliferasyon fazı ovulasyondan 24 saat daha devam eder. Ovulasyon 28 günlük siklusun ortalama 14. gününde gerçekleşir.

2.8. Sıçanlarda Folikül Gelişimi

Dişi sıçanlarda postnatal ovaryum gelişimi 4 sikludan oluşmaktadır. Doğumdan sonraki ilk hafta gonadotropin hormon salgısının artması ile neonatal dönem; 8-21. günler arası follikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) salgılanması ile folliküllerin gelişim gösterdiği infantil dönem; 22-30 günler arası foliküllerden E2 hormon salgılanmasının başladığı juvenil (prepubertal) dönem ve juvenil dönem sonrasındaki 3 gün peripubertal dönem olarak adlandırılır (Yiğit ve ark., 2019; Westwood, 2008).

Östrüs siklus döngüsü vajinal açıklığın tespit edildiği ortalama 32. ve 36. günlerde başlamaktadır (Goldman ve ark., 2007). Sıçanlar, 4-5 günde bir siklik aktivite gösteren poliöstrik deney hayvanlarıdır. Östrüs siklusu, proöstrus (12-14 saat), östrus (25-27 saat), metöstrus (6-8 saat) ve diöstrus (55-58 saat) olarak 4 siklustan oluşur (Westwood, 2008). Ovulasyon, proöstrus ile östrus dönemleri arasında LH'nın yüksek seviyede olmasıyla gerçekleşmektedir. Daha sonra östradiol ve progesteron hormon seviyeleri düşerek bazal seviyelerine inmektedir (Ekizceli ve ark., 2015); (Toft ve ark., 2014) .

Sıçan vajinal epiteli, steroid hormonların seviyelerine bağlı olarak morfolojik değişkenlik (Toft ve ark., 2014) göstermektedir. Çok katlı yassı epitelden oluşmaktadır. Proöstrus döneminin başlamasıyla stratum granulozumda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında keratohyalin granülleri birikmeye başlar. Epitelin lümenine doğru bakan

tarafında kübik gibi şekilli hücrelerin mukus salgılaması sonucunda bir mukozal tabaka oluşmaya başlar. Mukozal tabakanın hemen altında yassılaştırmış epitelyal hücrelerin keratinizasyon sürecini başlatmasıyla en dışta yer alan mukuslu tabaka olan stratum musifikasyon'un hemen altında bir stratum korneum tabakası gelişmeye başlar.

Östrus döneminde, yüzeyel mukoza tabakası (stratum musifikasyon) ile keratinize tabakalarda (stratum korneum) bir dökülme yaşanır bu dökülmelerin ürünü olan çekirdeğini kaybetmiş keratinize epitelyal hücreler görülmeye başlar. Metöstrus döneminde, epitel kalınlığının çok daha az olduğu dönemdir; stratum granulozum bulunmaz, ancak; stratum germinativum varlığını devam ettirir. Yoğun bir nötrofil infiltrasyonu yaşanır ve vajinal lümende de nötrofil lökositlere rastlamak mümkündür. Diöstrus döneminin başında, epitel kalınlığı 3-7 sıra iken epitel hücrelerin proliferasyonu ile bu kalınlık 2 katına çıkmaktadır. Diöstrus döneminin ilk aşamasında stratum granulozum yoktur ancak son aşamasında ile proöstrus döneminin başında stratum granulozum oluşumu başlar. Bu farkın bilinmesiyle her iki dönemi birbirinden ayırt etmeyi sağlamaktadır (Cora ve ark., 2015), (Westwood, 2008).

2.9. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PCOS), dünya genelinde üreme çağındaki kadınların %4-21'ini etkileyen infertilite nedeni sayılabilen en karmaşık ve yaygın endokrin ve metabolik bozukluk hastalığıdır. (Brakta ve ark. 2017) PCOS, hiperandrojenizm, ovulasyon bozukluğu ve polikistik ovaryumlarda sıklıkla insülin direnci, obezite ve kronik inflamasyonun eşlik ettiği morfolojik değişiklikler ile karakterizedir (S. Y. Li ve ark. 2016). PCOS üç farklı kritere göre tanımlanabilir; Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) (Lujan ve ark. 2008), Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği/Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ESHRE/ASRM, Rotterdam) ve Androjen Fazlalığı Derneği (AES). Tüm kriterler bir dereceye kadar anovülasyon, hiperandrojenizm (klinik ve/veya biyokimyasal) ve diğer androjenik, hipofiz veya adrenal nedenlerin dışlanmasıyla polikistik overleri içerir (Sørensen ve ark. 2014).

PCOS infertilite için kadınlarda önde gelen nedenlerden biridir (S. Y. Li ve ark. 2016). PCOS hastalarının %60'ından fazlasında değişen derecelerde insülin direnci vardır

ve insülin alım etkinlikleri sağlıklı insanlara göre %20-40 daha düşüktür (Çakir ve ark. 2014). PCOS'un etiyolojisi hala belirsizdir, ancak çevresel ve genetik faktörler patogeneze katkıda bulunabilir. Androjen fazlalığının visceral abdominal yağ dağılımını desteklediği, ovaryumlar ve/veya adrenal bezler tarafından androjenlerin artan salgılanmasını kolaylaştırdığı, patolojik etkilerin sürekli bir kısır döngüsünün varlığı ile açıklanabilir.

2.10. İnfertilite

İnfertilite, 35 yaş altındaki kadınlarda 12 ay normal cinsel birlikteliğe rağmen gebelik sonuçlanmamasıyla üreme sistemi hastalığı olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite, dünya çapında doğurganlık çağındaki (18-45 yaş) çiftlerin %10-25'ini etkilemektedir. Risk faktörleri arasında yaş, ovulasyon disfonksiyonu, azalmış ovaryum rezervi, menstrual bozuklukları ve endometriozis yer alabilmektedir (Ma ve ark. 2022).

Kadın infertilitesi, bazıları implantasyonu ve takiben plasentasyonu etkileyen, plasenta disfonksiyonuna ve olumsuz sonuçlara yol açan birden fazla etiyolojiden kaynaklanır. Bu etiyolojiler arasında PCOS endometriozis ve açıklanamayan infertilite yer almaktadır. PCOS, infertilite vakalarının %27'sini oluşturan ovulasyon disfonksiyonu vakalarının %70'inden sorumludur (Pisarska ve ark. 2019).

İnfertil çiftlerde gebeliğe giden yol genellikle uzun aşamalıdır ve tıbbi prosedürler, ekonomik maliyetler ve psikolojik stres gibi birçok faktörler nedeniyle yüksek seviyede dayanıklılık gerektirmektedir. Etkiyi en hafife indirmek ve yüksek düzeyde sonuç almak için, tüm farklı üreme uzmanlarını içeren iyi entegre edilmiş ve çok disiplinli bir yaklaşım gerekmektedir. Kesin bir teşhis ve en etkili terapötik seçeneği elde etmek için her iki partnere de kademeli bir yaklaşımla en uygun prosedürü belirlemek zorunludur (Garolla ve ark. 2021).

2.11. Ovulasyon İndüksiyonu

PCOS'lu hastalarda ovulasyon indüksiyonunda ilk önce infertilite tetkikleri bitirilmeli, tiroid fonksiyonları araştırılmalı, kilolu hastalara diyet ve egzersizle zayıflamaya yön gösterilmeli, folik asit (400 µg/gün) önerilmeli, hastanın uygun durumuna göre indüksiyon protokolü belirlenmelidir. PCOS'taki ovulasyon indüksiyonunda amaç tek bir dominant folikül gelişiminin başarılmasıdır. Amaç ovulasyon için yalnız bir folikül geliştirmektir. Bu olayı aşağıdaki diğer iki ovaryan uyarı şeklinden ayırmak gerekir;

- i) açıklaması olmayan infertilitesi olan hastalarda düşük ovaryan uyarı yaparak birden fazla folikül elde edip fertilizasyon şansının yükseltilmesi, buda tedavi intrauterin inseminasyon (IUI) ile birleştirilebilir;
- ii) ovülatuvar kadınlarda birden fazla folikülün geliştirileceği in vitro fertilizasyon (IVF) tedavi uygulamasıdır (Yiğit ve ark., 2019).

PCOS Ovulasyon İndüksiyonunda Kullanılan İlaçlar

Anti-östrojenler (Zeyneloolu ve ark. 2005) Klomifen sitrat anovulasyon tedavisinde en çok kullanılan ajandır. Klomifen sitrat ile E2 blokajı sağlanarak hipofizer FSH artışı olmakta ve ovaryan uyarı sağlanmaktadır. Serum FSH düzeylerinde %50 ila 60 artış olduğu bilinmektedir.

İnsülin sensitize eden ajanlar Birçok PCOS'lunun ovaryan bozukluğunun patofizyolojisinde insülin direnci önemli bir rol oynamaktadır. En sık kullanılan ilaç metformindir. Fakat planlanmış çalışmalar hala az sayıdadır.

Aromataz inhibitörleri Son yıllarda klomifenin yaptığı işlevi benzer olarak yapan aromataz inhibitörlerinin kullanımları daha sıklaşmıştır. Aromataz inhibitörleri androsteneidionun sırasıyla E2 ve E3'e çevrilmesini engeller. Böylece hipotalamik-hipofizer yolda östrojen seviyesini azaltarak gonadotropin salımını ve folikül uyarımını artırır.

Gonadotropinler Gonadotropinlerle yapılan birden fazla ovulasyon indüksiyonu protokolleri tanımlanmışken, en sık lowdose-step-up ve low-dose-step-down protokolleri klinik pratikte uygulanmaktadır.

Gonadotropinler özellikle de FSH, follikülogenezde büyük rol oynamaktadır. FSH in vitro olarak folikül gelişimi ve devamını sağlayabilmektedir. PCOS'lu hastalardaki fizyolojiyi taklit ederek foliküler fazda foliküler gelişim sırasında gonadotropin dozunu azaltarak uyarı yapma anlayışı Fauser tarafından tanımlanmıştır.

2.12. mikroRNA

Önceki yıllarda, mesajcı RNA'nın bilgi kodlama transkriptinden farklı olarak RNA için bir dizi önemli hücresel rolü ortaya çıkardı (Beringer & Rodnina, 2007). Ribozomal RNA, ribozomun hem yapısal hem de katalitik bir parçasıdır; tRNA'lar, protein sentezi için amino asit kalıntılarını taşıırken mesajcı RNA'nın kodonlarının kodunun çözülmesinde bilgilendirici bir rol oynar; (Boyd, 2008) spliceozomun küçük nükleer RNA'ları, birleşme yerlerini tanır ve pre-mRNA transkriptlerinin dönüşümlü olarak eklenmesini katalize eder ve birkaç küçük nükleolar RNA, diğer RNA bazlarının kovalent modifikasyonunda yer alır. Gen aktivitesinin düzenleyicileri olarak çok kısa kodlamayan RNA'ların keşfi, neredeyse 15 yıl önce, nematod solucanı *C.elegans*'ta larva gelişimini inceleyen araştırmacıların, mesajcı RNA'nın translasyonunu engelleyebilen kısa RNA transkriptlerini kodlayan bir gen, *lin-4* keşfetmesiyle başladı.

miRNA kodlayıcı olmayan, 19-25 nükleotid içeren küçük tek iplikli RNA parçasıdır. MikroRNA'ların çoğu, protein kodlayan genleri kopyalayan aynı RNA polimeraz olan RNA polimeraz II tarafından üretilen birincil transkriptlerden (pri-miRNA'lar) üretilir, ancak genomun tekrarlayan bölgelerindeki bazı mikroRNA'lar, RNA polimeraz III tarafından kopyalanır (Bracht ve ark., 2004).

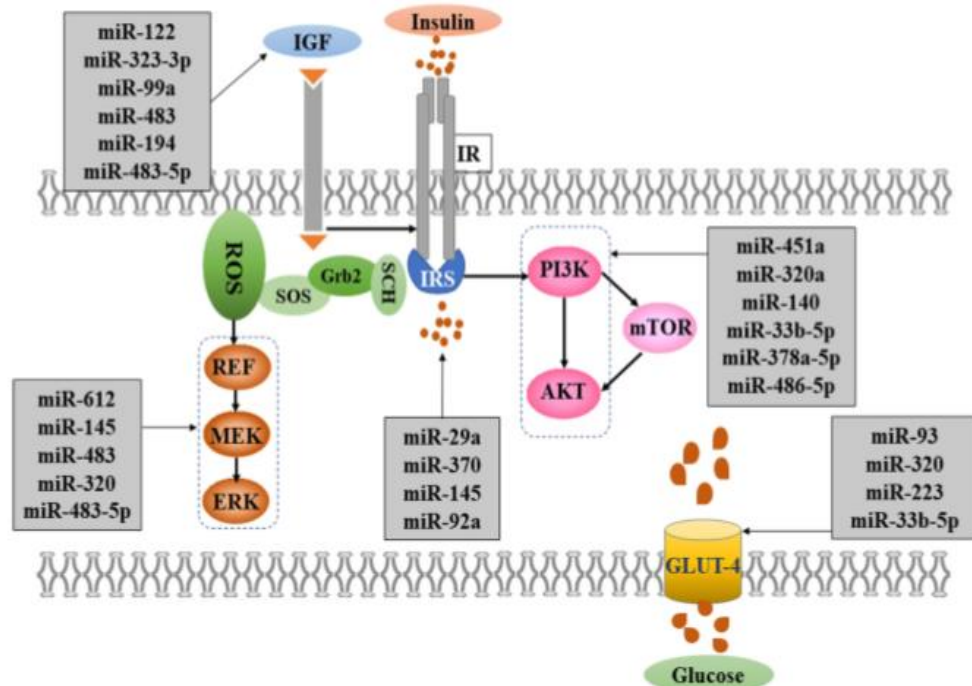
Normal İnsan Doku ve Hücrelerindeki miRNA'ların Profilleri

Çeşitli insan dokularından mikroRNA'ların klonlanması ve ölçümü hızla ilerlemiştir. En spesifik miRNA ekspresyon modelleri arasında karaciğerde miR-122, pankreas adacık dokusunda miR-375, hematopoyetik sistemde miR-142 ve miR-223 ve kasta miR-1 ve miR-133 bulunur (Landgraf ve ark., 2007; Poy ve ark., 2004; Sempere ve ark., 2004). miRNA, mRNA ekspresyonunu baskılayabilmektedir ve protein

translasyonunu inhibe etmekte rol oynamaktadır. Ayrıca miRNA, ekspresyonu etkileyebilir ve hedef geni değiştirebilir ve hücre büyümesini, farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptozu, inflamasyonu, stres yanıtını ve malign tümör metastazını etkileyebilir.(Luo ve ark., 2021)

Birçok çalışma, miRNA'ların değişmesinin serviks kanseri (Bu ve ark., 2018), endometriozis, zayıf ovaryum yanıtı ve kardiyovasküler hastalıkların, başlangıcına katkıda bulunabileceğini ve bu nedenle potansiyel tanı ve izleme biyobelirteçleri olarak hizmet edebileceğini göstermiştir. PCOS hastaları arasında, serum, yağ dokusu, foliküler sıvı, granüloza hücreleri (Naji ve ark., 2017) ve kumulus hücrelerinde birkaç miRNA farklı şekilde eksprese edilmektedir. Bu yüzden bazı miRNA'lar, PCOS'ta anormal metabolizma, bozulmuş oosit kalitesi ve düşük endometrial reseptivite için yeni biyobelirteçler olabilir. Örneğin miR-27, miR-125b, miR-184 ve miR-105 progesteron ve östrojen salınımını baskılar ve miR-224 granüloza hücrelerini düzenler (Zhang ve ark., 2017).

Dişi üreme sisteminde, miR-320a'nın ekspresyon seviyesi, oositlerin gelişimi ile yakından ilişkilidir oosit gelişimi için anormal ekspresyon seviyesinin korunması gereklidir. Araştırmalar, olgun oositlerin daha yüksek bir miR-320a seviyesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Scalici ve ark., 2016).



Şekil 2.3. mikroRNA'ların sinyal yollarına etki mekanizması (Luo ve ark., 2021).

2.13. Sinyal Yolakları

PI3K-Akt-mTOR yolu, çeşitli hücre dışı sinyalleri birleştirir ve hücre büyümesi, farklılaşması, transformasyonu gibi çeşitli hücresel işlevleri düzenler. Fosfatidilinositol-3-kinazın (PI3K) aktivasyonu, tirozin kinaz aktivitesine sahip büyüme faktörü reseptörleri (RTK'ler), G-protein bağlı reseptörler (GPCR'ler), Ras gibi onkogenler veya steroid hormonlarının nongenomik etkileri yoluyla meydana gelebilir (Li ve ark. 2017).

- Aktive edilmiş PI3K, fosfatidilinositol-4,5 bifosfatın (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfata (PIP3) dönüşümünü katalize eder.
- PIP3, Akt dahil olmak üzere birden fazla substrata sahip olan PI3K'ya bağlı protein kinaz 1 ve 2'yi fosforiller.
- Tümör baskılayıcı protein PTEN (ten kromozom üzerinde silinen fosfataz ve tensin homologu), PIP3 ve PIP2'yi fosforilatlayarak PI3K sinyalleşmesini negatif olarak düzenler.
- Akt, glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3), fosfofruktokinaz (PFK), Bad, kaspaz-9, endotelial nitrik oksit sentaz, tuberin (Tüberöz Skleroz Kompleksi 2, TSC2), transkripsiyon faktörü FKHRL1 ve tümör baskılayıcı protein gibi proteinlerin fosforilasyonu ile proliferasyonu, apoptozu ve hücre büyümesini düzenler.

İnsülin reseptör substratı (IRS) fonksiyonunun inhibisyonu yoluyla PI3K-Akt yolunun aktivasyonunu bloke eden mTOR ve S6K1'den oluşan bir negatif feedback döngüsü karakterize edilmiştir.

2.13.1. PI3K-Akt sinyal yoluna genel bakış

PI3K-Akt sinyal yolunun aktivasyonu

Yapısına ve substrat tercihinine göre PI3K protein ailesi 3 sınıfa (I, II ve III) ayrılabilir. Sınıf I PI3K, temel fizyolojik ve patolojik rolleri nedeniyle en çok incelenmiştir. Sınıf I PI3K, bir düzenleyici alt birimden ve bir katalitik alt birimden oluşan heterolog dimerler içerir. Katalitik alt birim, karşılık gelen bağlanma bölgeleriyle etkileşime girer ve SH2 ve SH3 alanlarını içeren p85 olarak adlandırılır. Çoğu zaman,

sınıf I PI3K, p85'in kendi kendini inhibisyonu nedeniyle çok az kinaz aktivitesine sahiptir. Bununla birlikte, PI3K kinaz aktivitesi gösterebilir ve ayrıca bir fosfat grubunu 3-fosfatidilinositole (PI) transfer ederek PI-3-fosfat ve PI-3,4-difosfat veya PI-3,4,5-trifosfat oluşturur, hücre proliferasyonu, adezyonu ve göçü üzerinde önemli etkileri vardır. PI3K'nın aktivasyonu, büyük ölçüde, plazma zarının alt tabakasına yakın iç tarafında meydana gelir. İnsülin ve sinyal bileşikleri gibi çeşitli büyüme faktörleri PI3K sinyal yolunu aktive edebilir. Reseptör aktive edildiğinde, otofosforile olur.

Reseptörler üzerindeki fosforillenmiş kalıntılar, PI3K'nın p85 alt birimleri için bir bağlanma yeri sağlayabilir. Bağlandıktan sonra, belirli iç veya dış uyarımlarla fosforile reseptör, protein bağlanmasına aracılık eder (Li ve ark. 2017).

2.13.2. Sinyal yolunda Akt'ın rolü

PI3K'nın aktivasyonu, plazma zarında ikinci haberci, PI-3,4,5-trifosfat (PIP3) üretebilir. PIP3, pleckstrin homoloji alanı yoluyla Akt ve fosfoinositide bağımlı kinaz 1 (PDK1) ile birleşir. PDK1 tarafından fosforile edilen Akt Ser308, Akt'yi aktive edebilir. Fosforillenmiş enzimler, kinazlar, down stream transkripsiyon faktörleri ve diğer faktörler, glikoz metabolizmasını uyararak, apoptotik kaskadın aktivasyonunu önleyerek ve hücre hayatta kalmasını teşvik ederek hücre fonksiyonunu düzenleyebilir. Sinyal Yolunda PTEN'in İnhibisyonu Kromozom 10'da silinen fosfatase ve tensin homologu (PTEN), negatif düzenleyici olarak işlev görür ve 30 fosfatı PIP3'ten uzaklaştırarak, tüm aşağı akış sinyal olaylarını durdurabilen PI-3,4-bifosfat (PIP2) üretir. Bununla birlikte, PTEN, Akt'yi engellemekten çok daha fazla işleve sahiptir. Vücuttaki PIP2, fosfolipaz C (PLC- β) tarafından fosforile edilebilir ve 2 önemli ikinci haberci üretir: 2-deoksiglukoz (DG) ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP3). IP3, ligandların reseptörlerini aktive etmek ve hücre içi kalsiyumu yükseltmek için ligandlarla birleşebilir. Sitoplazmik zar üzerindeki DG, down stream moleküllerini fosforile edebilen ve farklı etkiler üretebilen protein kinaz C'yi (PKC) aktive edebilir. Defosforile edici PIP2, fosfolipaz D ve seramid-1-fosfat içerenler dahil olmak üzere çeşitli lipid metabolizması enzim aktivitesine de katılabilir. Böylece hücre fonksiyonlarını geniş ölçüde etkileyebilir. Bazı bilim adamları, hücrelerde düşük PTEN ekspresyonunun daha fazla Akt protein fosforilasyonuna izin verdiğini gösterdi.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. PCOS Oluşturulması ve Deney Prosedürü

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından (PAUHADYEK-2022/30) numarasıyla onaylanmıştır (Ek 1). Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 24 adet Sprague Dawley erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Deney protokolü süresince; sıçanlar 21 ± 1 °C oda sıcaklığında, rutubeti (65-70%) kontrol altında tutulan 12 saat ışık-karanlık çevrimi olan sessiz bir oda içinde, ayrı kafeslerde tutuldu. Deney gruplarına, günlük düzenli olarak içme suyu (çeşme suyu) ve standart sıçan yemi (pelet yem) verilerek ad libitum olarak beslendi. Sıçan ağırlıkları (200-250gr) ölçüldükten sonra rastgele olarak 3 gruba ayrılarak işaretlendi.

I. Grup (n:6) Kontrol Grubu (K): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca %0,9 izotonik soydum klorür (1mg/kg) ile gavaj uygulandı.

II. Grup (n:9) PCOS Grubu (PCOS): Bu gruptaki sıçanlara PCOS oluşturmak için Letrozol kullanıldı. Sıçanlara 25 gün boyunca (1mg/kg) Letrozol (çözücü olarak %0,9 izotonik soydum klorür) ile gavaj uygulandı. (Femara, Teng 2019)

III. Grup (n:9) PCOS + Ovulasyon İndüksiyonu Grubu (PCOS +OI): Letrozol ile PCOS oluşturulan hayvan modeli grubuna 25. gün 150-300 IU/kg gebe kısarak serum gonadotropini (PMSG, Adooq Bioscience) intraperitoneal enjeksiyonu kullanılarak süperovülasyona teşvik edildi. 48 saat sonra 150-300 IU/kg insan koryonik gonadotropini (hCG) (Ovitrelle, Merck) intraperitoneal olarak enjekte edildi (Hino ve ark., 2020).

hCG uygulamasından 17-19 saat sonra, süperovüle edilmiş sıçanlara anestezi uygulandı. Sıçanlara anestezi işlemi, 50 mg/kg ketamin ve 5-10 mg/kg ksilazin hidroklorid ile intraperitoneal olarak sağlandı. Genel anestezi altındaki sıçanlardan, kan örnekleri alınıp

ELİSA yöntemiyle FSH, Testosteron, E2 değerlerine bakıldı. Sıçanların her iki over dokusu alındı. Sağ over dokusu histopatoloji için ayrılırken, sol over dokusu PCR analizleri için trizole konup -80'e kaldırıldı. Alınan sağ over dokuları %10 formaldehitte tespit edildikten sonra rutin doku takibinin ardından kesitler alınarak hematoksilin-eozin boyanıp ilk değerlendirme yapıldı. Dokularda PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT reaksiyonları immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Sıçan ovaryum mRNA ve miRNA eldesi yapıldıktan sonra reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanıldı ve değerlendirme yapıldı.

3.2. Vajinal Smear Uygulaması

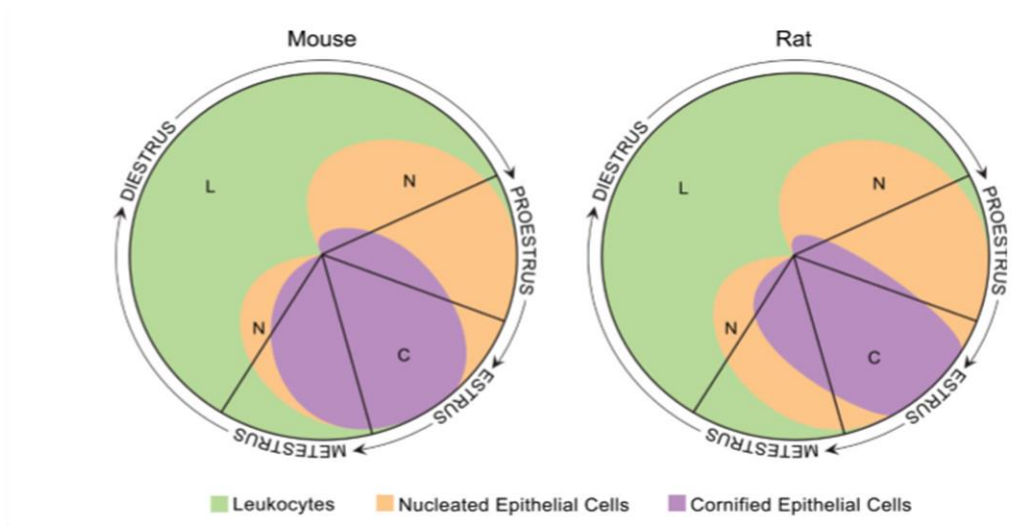
Deney prosedürü oluşturulduktan 13 gün sonra 24 sıçan için her gün saat 10.00'da vajinal smear yapıldı ve östrus siklusları gözlemlendi.

Vajinal yaymada her sıçan için serum fizyolojik, steril pastör pipeti ve lam kullanıldı. Vajinal yayma örneklerini alırken sıçanlar kuyruk ve kuyruk dibinden tespit edildi ve kaldırılarak kafası aşağıya gelecek ters bir biçimde tutuldu (Cora ve ark., 2015). Vajinal kanaldan hücre toplamak için, pipete 0,2 ml serum fizyoloji çekildi. Damlalığın ucu vajinal deliğe yaklaşık 5-10 mm derinlikte hafifçe sokuldu ve ardından vajinaya akıtıldı ve 2 veya 3 kez geri çekildi. Vajinal açıklığa yerleştirirken ve sıvıyı boşaltırken, servikal stimülasyonu önlemek için ucu çok derine sokmamaya özen gösterildi. Numuneden küçük bir damla ince bir tabaka (smear) halinde lam üzerine eşit bir biçimde yayıldı ve açık havada kurumaya bırakıldı (Macdonald ve ark., 2014). Kuruyan lamlar daha sonra Diff Quick boyama seti ile boyandı (Makker ve ark., 2012).

Diff Quick Boyama

1. Metanol (fiksasyon) 3dk bekletildi.
2. Xanthene (eozinofilik) 2 dk bekletildi.
3. Thiazine (bazofilik) 2 dk bekletildi.
4. Çeşme suyunda 2 sn fazla boyanın giderilmesi için tutuldu.
5. Havada kurutulmaya bırakıldı.

Vajinal smear preparatları boyama işlemi tamamlandıktan sonra ışık mikroskobu altında incelendi. Hücreler 10'luk 20'lik ve 40'lık büyütmede değerlendirildi (Şekil 3.1.). Östrus siklusu evreleri proöstrus, metöstrüs ve diöstrüs olarak sınıflandırıldı. İncelenen hücrelerin yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldı. Hücre gözlemlenmedi ise "0", birkaç hücre gözlemlendi ise "+", orta sayıda gözlemlendi ise "++", yoğun gözlemlendi ise "+++" olarak değerlendirildiği Tablo 3.1. de görülmektedir (Cora ve ark. 2015).



Şekil 3.1. Östrus sikluslarının dairesel grafiği. Hücre türlerinin temsili ve oranlarının östrus siklusunda 4 aşaması. (Cora ve ark., 2015)

Tablo 3.1. Vajinal smearda hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları (Cora ve ark., 2015).

Siklus	Nötrofil	Küçük nükleuslu epitel hücreler	Büyük nükleuslu epitel hücreler	Çekirdeksiz keratinize epitel hücreler
Proöstrus	0 veya +	++ veya +++	0 veya +	0 veya +
Östrus				
Rat	0 veya +	0 veya ++	0 veya ++	++ veya +++
Mouse	0 veya +	0 veya +	0 veya +	++ veya +++
Metöstrus				
Rat	+ veya +++	+ veya ++	+ veya ++	+ veya +++
Mouse	+ veya +++	0 veya +	0 veya +	++ veya +++
Diöstrus	++ veya +++	+ veya ++	+ veya ++	0 veya +

Not: 0 = hücre yok; + = birkaç hücre; ++ = orta seviyede hücre; +++ = yüksek seviyede hücre.

Östrus Siklusunun Evreleri ve Hücreleri

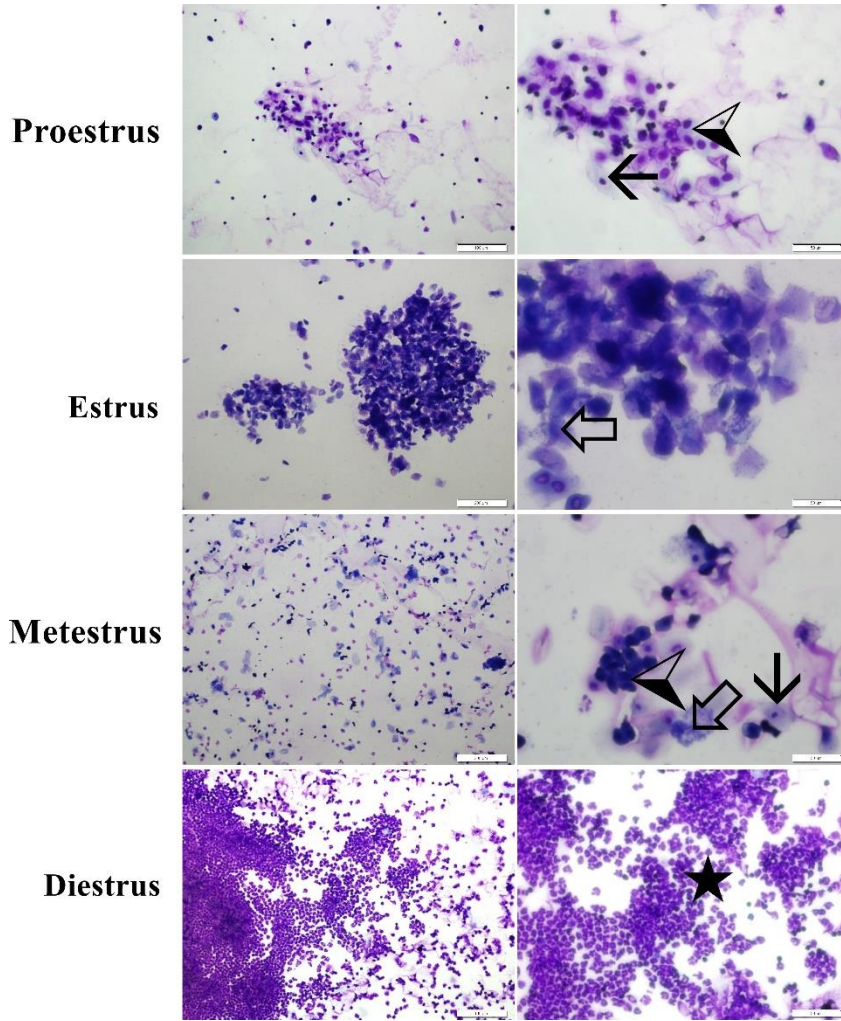
Sıçanlarda 4-5 gün süren östrus siklusunun evreleri lamda görülen hücreler ve yoğunluğuna göre belirlendi. Siklus, proöstrus, östrus, meöstrus ve diöstrus olmak üzere dört aşamaya ayrılır (Şekil 3.2.).

Proöstrus ortalama 14 saat süren bir aşamadır. Belirgin olarak küçük, yuvarlak, çekirdekli epitel hücrelerinin varlığı ile gözlenir. Genellikle birbirine bağlı kümeler (üzüm salkımları) halinde görülürler. Tipik olarak nötrofil görülmemekle birlikte kısmen siklus geçişlerinde görüldüğü olmuştur.

Östrus 24 ila 48 saat arasında değişen bir aşamadır. Çoğunlukla çekirdeksiz keratinize epitel hücrelerinin varlığıyla gözlemlenmesine rağmen çekirdekli epitel hücreleri de gözlenebilir ve nötrofiller yoktur veya ara sıra geç östrus döneminde gözlenir. Sıçanların geç östrus döneminde, nötrofillerin ve metöstrusun ortaya çıkmasından önce, daha fazla sayıda çekirdekli epitel hücresi ortaya çıkar. Bu hücreler küçükten büyüğe; yuvarlak, oval veya iğ şeklinde, düzgün veya düzensiz kenarlı olmaktadır.

Metöstrus 6-8 saatlik kısa bir aşamadır. Metöstrus, çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri ve nötrofillerin bir kombinasyonu ile karakterize edilir. Erken metöstrus döneminde, nötrofiller epitel hücreleri arasında dağılmıştır ve bazen sıkı bir şekilde bir araya toplanmış veya hücrelerin etrafında kümelenmiştir; epitel hücreleri genellikle baskındır ancak nötrofillerle eşit oranda olabilir. Meöstrus ilerledikçe nötrofillerin sayısı çok artar. Nötrofil ve epitel hücre sayıları, diöstrusa geçişten önce, smear hücreliliğinde azalmayla birlikte geç metöstrus ile azalır.

Diöstrus, ortalama 2-3 gün süren östrus siklusunun en uzun aşamasıdır. Bu aşama, hayvanın metöstrus dışına geçişi sırasında çekirdeğini kaybetmiş keratinize epitel hücrelerinin miktarında önemli bir azalma (ancak yokluğu olması şart değildir) ile karakterize edilir. Nötrofiller, küçük ve büyük çekirdekli epitel hücreleri ve az sayıda çekirdeksiz keratinize hücre kombinasyonu ile genel hücrelilik orta ila düşük düzeydedir. Nötrofil sayıları değişebilir ancak genellikle epitelyal hücrelere göre sayıca daha yüksektir ve smearlar bazen yalnızca nötrofiliktir. Bazen erken diöstrus döneminde nötrofiller hala kümeler halinde görünebilir. Geç diöstrus döneminde epitel hücreleri daha yuvarlak hale gelebilir veya küçük öbekler halinde organize olabilir, bu da ertesi gün proöstrusun göstergesidir; ancak nötrofiller yine de tutarlı bir şekilde gözlemlenecektir (Cora ve ark 2015).



Şekil 3.2. Östrus siklusu evreleri ve görülen hücreler. ← ile gösterilen büyük nükleuslu epitel hücreleri ⇐ ile gösterilen çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri ★ ile gösterilen nötrofil hücreleri, ➤ gösterilen küçük nükleuslu epitel hücreleri göstermektedir. Diff Quick boyama 20X ve 40X büyütme.

3.3. ELİSA Yöntemi

50 mg/kg ketamin ve 5-10 mg/kg ksilazin hidroklorid ile intraperitoneal olarak anestezi uygulanan sıçanlardan intrakardiyak olarak kanlar tüplere toplandı ve etiketlendi. Örnekler 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve 4000 devirde 15 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant toplandı. Elde edilen serumlar tüplere ayrılarak çalışma gününe kadar -80 derecede etiketlenerek saklandı. Çalışma günü numuneler oda sıcaklığına getirildi. Elde edilen serumlardan ELISA (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay) yöntemi kullanılarak Follicle stimulating Hormone (FSH) (BT LAB, Rat FSH,

ELISA Kit), Estradiol (E2)(BT LAB, Rat E2 Hormone, ELISA Kit) ve Testosterone (T) (BT LAB, Rat T Hormone, ELISA Kit) değerlerine bakıldı. Test prosedürüne göre uygulandıktan sonra 450 nanometrede (nm) Biotek Elx800 Mikroplaka okuyucu (BioTek Instruments Inc., USA) kullanılarak kuyucukların absorbans değerleri okundu. Gen5 data analiz programı ile serum absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı.

3.3.1. Follicle Stimulating Hormone (FSH) ölçümü

Solüsyonlar ve reaktifler kit prosedürüne göre hazırlandı. 25X yıkama tamponu 1X olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Konsantrede kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı. Çalışmaya başlamadan önce standart solüsyonlar ticari kit prosedürüne göre oluşturuldu. 25.6 mIU/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 150 µl standart ve 150 µl standart seyreltici kullanıldı. Sırasıyla 12.8, 6.4, 3.2, 1.6 ve 0.8 mIU/ml solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonu (25.6 mIU/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltilerek çift standart kuyucukları oluşturuldu. 25X yıkama tamponu 500 ml hazırlamak için 480 ml distile su içerisine 20 ml yıkama tamponu eklendi.

Biyotinlenmiş antijen hazırlamak için total 6 ml biyotinlenmiş antijen seyrelticiğine 1 ml biyotinlenmiş antijen solüsyonu eklendi ve 10 dk hazır hale gelmesi için beklendi. Avidin-HRP solüsyonu düşük hızda santrifüj edildi ve avidin-HRP seyrelticiğinin içine tamamen boşaltıldı. Totalde 6 ml stok solüsyon hazırlandı ve 10 dk hazır hale gelmesi için beklendi.

Assay Prosedürü:

1. Çalışmaya başlamadan önce kitler, malzemeler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.
2. Testte kullanılacak şeritler kit çerçevesine yerleştirildi. FSH değerinin ölçümü ikili kontrol olarak yapıldı.
3. Standart kuyulara sırasıyla hazırlanan standartlar 50 µl olarak eklendi.
4. Numune kuyularına 50 µl numune eklendi.
5. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl biyotinleşmiş antijen eklendi ve plaka kapaticısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.

6. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 300 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
7. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl avidin-HRP eklendi ve plaka kapatıcısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
9. Her kuyuya 50 µl substrat A ve substrat B solüsyonu eklendi.
10. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca yeni bir plaka kapatıcı ile kaplanmış olarak inkübe edildi.
11. Her kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Solüsyon eklendikten sonra mavi renk sarı renge dönüştü.
12. 450 nm'de mikropilaka okuyucu ile her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.
13. Sonuçlar hesaplanarak analiz edildi.

3.3.2. Estradiol (E2) ölçümü

Solüsyonlar ve reaktifler kit prosedürüne göre hazırlandı. 25X yıkama tamponu 1X olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Konsantride kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı. Çalışmaya başlamadan önce standart solüsyonlar ticari kit prosedürüne göre oluşturuldu. 3200ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için 150 µl standart ve 150 µl standart seyreltici kullanıldı. Sırasıyla 1600, 800, 400, 200 ve 100ng/L solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonu (3200ng/L) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltilerek çift standart kuyucukları oluşturuldu. 25X yıkama tamponu 500 ml hazırlamak için 480 ml distile su içerisine 20 ml yıkama tamponu eklendi.

Biyotinlenmiş antijen hazırlamak için total 6 ml biyotinlenmiş antijen seyrelticiğine 1 ml biyotinlenmiş antijen solüsyonu eklendi ve 10 dk hazır hale gelmesi için beklendi. Avidin-HRP solüsyonu düşük hızda santrifüj edildi ve avidin-HRP seyrelticiğinin içine tamamen boşaltıldı. Totalde 6 ml stok solüsyon hazırlandı ve 10 dk hazır hale gelmesi için beklendi.

Assay Prosedürü:

1. Çalışmaya başlamadan önce kitler, malzemeler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.
2. Testte kullanılacak şeritler kit çerçevesine yerleştirildi. E2 değerinin ölçümü ikili kontrol olarak yapıldı.
3. Standart kuyulara sırasıyla hazırlanan standartlar 50 µl olarak eklendi.
4. Numune kuyularına 50 µl numune eklendi.
5. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl biyotinleşmiş antijen eklendi ve plaka kapaticısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 300 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
7. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl avidin-HRP eklendi ve plaka kapaticısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
9. Her kuyuya 50 µl substrat A ve substrat B solüsyonu eklendi.
10. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca yeni bir plaka kapaticı ile kaplanmış olarak inkübe edildi.
11. Her kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Solüsyon eklendikten sonra mavi renk sarı renge dönüştü.
12. 450 nm'de mikropilaka okuyucu ile her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.
13. Sonuçlar hesaplanarak analiz edildi.

3.3.3. Testosteron ölçümü

Reaktifler ve solüsyonlar kit talimatlarına göre hazırlandı. 25X yıkama tamponu 1X olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Konsantrede kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı. Çalışmaya başlamadan önce standart solüsyonlar ticari kit prosedürüne göre oluşturuldu. 1600ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 µl

standart ve 120 µl standart seyreltici kullanıldı. Sırasıyla 800, 400, 200 ve 100ng/L solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonu (1600ng/L) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltilerek çift standart kuyucukları oluşturuldu.

Assay Prosedürü:

1. Çalışmaya başlamadan önce kitler, malzemeler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.
2. Testte kullanılacak şeritler kit çerçevesine yerleştirildi. T değerinin ölçümü ikili kontrol olarak yapıldı.
3. Standart kuyulara sırasıyla hazırlanan standartlar 50 µl olarak eklendi.
4. Numune kuyularına 40 µl numune eklendi.
5. Numune kuyularına 10 µl anti-T antikoru eklendi. (Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiği için, standart kuyuya antikor eklenmemektedir.)
6. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve plaka kapatıcısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
8. Her kuyuya 50 µl substrat A ve substrat B solüsyonu eklendi.
9. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca yeni bir plaka kapatıcı ile kaplanmış olarak inkübe edildi.
10. Her kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Solüsyon eklendikten sonra mavi renk sarı renge dönüştü.
11. 450 nm'de mikropilaka okuyucu ile her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.
12. Sonuçlar hesaplanarak analiz edildi.

3.4. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu

mRNA ve miRNA düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla bütün gruplarda RNA izolasyonu Trizol Reagent ile gerçekleştirildi.

- Homejenize edilmiş dokulardan her bir doku başına 500 µl olacak şekilde Trizol ependorf tüplere (1 ml'lik) transferi yapıldı.
- Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- Soğutmalı santrifüj ile +4°C' de 15.000 g'de 20 dk santrifüj edildi ve renksiz olan üst faz toplanıp, ayrı ependorf tüplere alındı.
- Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklendi, pipetlendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- +4°C'de 15.000 g'de 30 dk santrifüj edildi.
- Peletin üzerine %70'lik etanol konuldu ve +4°C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp, pelet kısa bir süre hava ile kurutuldu.
- Pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözünmesi basamakları gerçekleştirildi.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Termo) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/µl'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1µl RNase free su ile Nanodrop cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde pipetlenip ve bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1µl olacak şekilde pipetlenip 230, 260, 280 nm'de okundu.

3.5. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi ABM OneScript Plus cDNA Synthesis Kit with OneScript Plus RTase (CatNo:G236) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi.

Protokol:

1. Kullanmadan önce tek tek bileşenleri iyice çözüldü ve karıştırıldı.
2. Rt buffer, dNTP, primerler ve enzimden bir ependorfta mix hazırlandı. Kısa bir santrifüj edilerek karışım sağlandı. MiRNA için Cdna sentezinde Dntp yerine Oligo(Dt) eklendi ve her miRNA'ya spesifik stemloop eklendi.
3. RNA'lar kit protokolüne göre en yüksek konsantrasyondan hesaplanıp etiketlenen ependorflara konuldu.
4. İçinde RNA olan ependorflara hazırladığımız mix eşit olarak dağıtıldı.
5. En son hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz-free water ile tamamlandı.
6. Protokole uygun olarak 50-55°C'de 15 dakika, 85°C'de 5 dakika inkübe ederek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.6. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR)

Çalışmada 96 kuyucuklu Thermo Scientific PikoReal 96 cihazıyla PCR yapıldı. miRNA-451a, miRNA-33b-5p, miRNA-378a-5p, miRNA-486-5p miRNA-140, miRNA-320a ekspresyonları RT-PCR kullanılarak saptanmıştır. İlgili hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış olup takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi bulunmuştur. Sonrasında, total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili miRNA'ların ve referans-housekeeping miRNA olan U6 ile RT-PCR ile ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

RT-PCR Protokolü

1. Initial denaturation 95°C'de 300 saniye 1 siklus
2. Denature 95°C'de 10-30 saniye 40 siklus
3. Anneal 55-68°C'de 10-60 saniye 40 siklus
4. Extend 72°C'de 2-5 saniye/step 1 siklus

Tablo 3.2. PCR için kullanılan primer dizileri.

GEN NO	SEMBO L	GEN ADI	PRİME R	Sequence (5'->3')	Produ ct length
NM_001014013.1	Usb1	U6 snRNA biogenesis phosphodiesterase 1	F → R →	GCAGGAACTACAGGAAATT GTGG ATGGCACAAGGCTCACTCA	130
NR_031955.1	Mir451	rno-mir-451	F → R →	GCGGAAACCGTTACCATTAC GTAATGGTAACGGTTTCCGC	72
NR_031945.1	Mir320a	rno-mir-320a	F → R →	GCGGGCCTTCTCTCCCGGT ACCGGGAAGAGAAGGCCCG C	82
	Mir486-5p	rno-miRNA-486-5P	F → R →	GCGGTCCTGTAAGTACTGAGCTGC GCAGCTCAGTACAGGACCGC	
NR_037335.1	Mir378a-5p	rno-miR-378a-5p	F → R →	GCCTCCTGACTCCAGGTCC GGACCTGGAGTCAGGAGGC	113
NR_031847.1	Mir33b	rno-mir-33b	F → R →	GCGGGTGCATTGTAGTTGC GCAACTACAATGCACCCGC	69
NR_031779.1	Mir140	rno-mir140	F → R →	GCGGCAGTGGTTTTACCCTA T ATAGGGTAAAACCACTGCCG C	99

Not: F:forward, R: reverse.

3.7. Histopatolojik İnceleme

3.7.1. Fiksasyon

- Nötral tamponlanmış formalin solüsyonu:
- %40'lık formalin
- 100ml Distile su
- 900ml Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat
- 4 gr Sodyum fosfat, dibazik, anhidroz 6.5 gr

Fiksatif için nötral tamponlanmış formalin solüsyonu hazırlanırken distile su, %40'lık formalin, sodyum fosfat monobazik monohidrat ve sodyum fosfat dibazik anhidroz yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırılıp, Ph metre ile ölçüm yapılarak Ph değerinin 6,5 olması sağlandı. Her denekten alınan dokular farklı kaplarda olacak şekilde kaplar numaralandırıldı ve etiketlendi. Kaplar içerisine hazırlanan fiksatif solüsyonu eşit miktarlarda aktarıldı. Fiksatif miktarı dokunun en az 100 katı olacak şekilde eklendi. Alınan dokular 7 gün formaldehitte fikse edildi.

3.7.2. Doku takip yöntemi

1. Alınan dokular 72 saat formaldehitte bekletildi.
2. Akarsuda 60 dakika yıkandı.
3. %70 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
4. %80 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
5. %90 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
6. %100 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
7. Ksilen I de 1 saat bekletildi.
8. Ksilen II de 1 saat bekletildi.

9.Parafin I de 1 saat bekletildi.

10.Parafin II de 1 saat bekletildi.

11.Dokulara parafine gömme ve etiketleme işlemi yapıldı.

3.7.3. Hematoksiklen-Eozin boyama

Dokular etüvde 1 gece boyunca deparafinizasyona uğratıldı. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi kullanılan etil alkol solüsyonları, %100 etil alkol (Ethanol, IsoLab) ve distile su kullanılarak %96,%80,%70,%50 oranlarda hazırlandı. Kullanılacak ksilen (Xylol, Isimerengemisch, Supelco) miktarı kaplara alınarak kullanıma hazır hale getirildi. Etüvden alınan dokular sırasıyla şu aşamalardan geçirildi:

- 1.Ksilen I (şeffaflaştırma amacı ile) de 30 dakika bekletildi
2. Basamak KsilenII'de 30 dakika bekletildi
3. Basamak %100 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
4. Basamak %90 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
5. Basamak %80 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
6. Basamak %70 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
7. Basamak %50 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
8. Basamak Distile suda 10 dakika bekletildi
9. Basamak Hematoksilende 3 dakika bekletildi
10. Basamak Akan suda 1 dakika yıkandı
11. Basamak Asit-alkol batırıp çıkarma
12. Basamak Akan suda yıkandı
13. Basamak Amonyak batırıp çıkarma
14. Basamak Akan suda yıkandı
15. Basamak Eozinde 3 dakika bekletildi
16. Basamak %50 etil alkol'de 5 dakika bekletildi

17. Basamak %70 etil alkol'de 5 dakika bekletildi

18. Basamak %80 etil alkol'de 5 dakika bekletildi

19. Basamak %90 etil alkol'de 5 dakika bekletildi

20. Basamak %100 etil alkol'de 5 dakika bekletildi

21. Basamak KsilenI'de 5 dakika bekletildi

22. Basamak KsilenII'de 5 dakika bekletildi

23. Basamak Ksilen den alınan lamalar üzerine entellan (Merck) damlatıldı. Hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatılarak ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirdi.

3.7.4. Folikül sayımı yöntemi

Doku takibinin ardından ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom cihazıyla 5 mikronluk seri kesitler alındı. Tüm sıçanların ovaryum dokularından 1., 5. ve 10. kesitler su banyosunda bekletildikten sonra pozitif yüklü lamalara alındı ve taşıma sepetine yerleştirildi. 1 gece 37C°de inkübatörde bekletildi. Hematoksilen-Eozin boyama uygulandıktan sonra ışık mikroskobu ile folikül sayıldı. Folikül sayımında primordial, primer, sekonder, tersiyer ve atretik foliküllerin sayımı yapıldı. Ayrıca overlerde bulunan korpus luteumların sayımı da yapıldı. Aşağıda belirtilen kriterlere göre folikül sınıflandırması yapıldı.

- Primordial Folikül: Oosit etrafında tek katlı yassı granüloza hücreleri ile çevrili,
- Primer Folikül: Oosit etrafında tek katlı kübik granüloza hücreleri ile çevrili,
- Sekonder Folikül: Oosit tek tabakadan fazla kübik granüloza hücreleri ile çevrili ve antral boşluğu bulunmayan foliküller,
- Tersiyer (Graaf) Folikül: Oositin etrafı çok katlı kübik granüloza hücreleriyle çevrili, antum boşluğu ve muhtemelen kumulus ooforus, teka tabakası bulunan foliküller,

- Atretik Folikül: Ovulasyon olmadan dejenerasyon sürecine girmiş folikül, oosit nükleusu küçülüp büzülmüş, kromozomlar ve sitoplazma erimiş, granüloza hücre tabakası azalmış ve foliküler membran hücreleri hipertrofik olan şekilde değerlendirilmiştir.

3.7.5. İmmunohistokimyasal boyama yöntemi

Doku takip yöntemi tamamlanan doku bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µm'lik kesitler alınıp, kesitler benmariye bırakıldı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir:

1. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
2. Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 gece bekletildi.
3. Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
4. Ksilenden çıkarılıp havada kurutularak PAPPEN ile dokular işaretlendi.
5. Kesitler sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
6. Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
7. Antijen retrieval işlemi için önceden hazırlanmış ve 37°C'de bekletilen Tripsin solüsyonu (200cc PBS + 0,2gr Tripsin) ile 37°C'de 30 dakika bekletildi.
8. 10 dakika PBS'de bırakıldı.
9. Dokulardaki endojenperoksidaz aktivitesi, %30'luk H₂O₂: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
10. Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. Kesitler üzerine uygun primer antikolar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bütün primer antikolar distile su ile dilüe edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikolar PI3K(FineTest, FNab06416,dilüe 1:50,China), p-PI3K(FineTest, FNab06422,dilüe 1:50,China), AKT(FineTest, FNab00271,dilüe 1:200,China),p-AKT (FineTest, FNab06402,dilüe 1:100,China)dir.

12. Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edildi.
13. Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edildi.
14. Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB (Thermo Scientific) ile 3- 10 dakika kadar muamele edildi.
15. Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.
16. Kesitler akan suda yıkanır ve sırasıyla %50, %70, %80, %96, %100' lük etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
17. Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilen II'de 2 şer dakika bekletildi.
18. Ksilenden alınan dokuların üzeri kuruması beklenilmeden entellan ile kapatıldı.
19. Boyanmanın değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanıldı. (+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok.

3.8. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca, çeyrekler arası aralık (ÇAA) ve en küçük-en büyük değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc: Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hayvan Ağırlıkları Bulguları

Kontrol grubundaki sıçanların başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı $203 \pm 14,86$ gr, PCOS grubunun başlangıç ortalama ağırlığı $196,38 \pm 7,31$ gr ve PCOS+OI grubunun başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı $203 \pm 14,36$ gr olarak ölçüldü. Grupların başlangıç ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$). Deney sonunda ortalama vücut ağırlıkları kontrol grubunda $249,17 \pm 17,62$ gr, PCOS grubunda $260,5 \pm 10,98$ gr ve PCOS+OI grubunda $261,33 \pm 22,49$ gr olarak ölçüldü. Grupların deney sonundaki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç olmamasına rağmen PCOS ve PCOS+OI gruplarında vücut ağırlığının deney sonunda artmış olduğu saptandı. Tablo 4.1.'de gösterildi.

Tablo 4.1. Gruplardaki sıçanların başlangıç ve son ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.

		Kontrol	PCOS	PCOS+OI	Gruplar arası p
Başlangıç ağırlığı (gr)	A.O \pm S.S	$203 \pm 14,86$	$196,38 \pm 7,31$	$203 \pm 14,36$	0,708 (kw=0,69)
	Med (IQR)	200 (190,5 - 214,5)	196,5 (192,75 - 199,25)	207 (189 - 210,5)	
	Min - maks	189 - 228	184 - 210	184 - 230	
Bitiş ağırlığı (gr)	A.O \pm S.S	$249,17 \pm 17,62$	$260,5 \pm 10,98$	$261,33 \pm 22,49$	0,528 (kw=1,276)
	Med (IQR)	254,5 (228 - 261,5)	262,5 (254 - 269,5)	253 (243 - 286)	
	Min - maks	228 - 272	238 - 271	231 - 291	

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdelikler); kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi.

4.2. ELİSA Bulguları

Deney gruplarına ait serum E2, FSH ve T düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.2.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Grupların kan hormon düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

		Kontrol	PCOS	PCOS+OI	Gruplar arası p
Estradiol (ng/L)	A.O ± S.S	107,53 ± 31,39	416,73 ± 868,85	131,61 ± 65,49	0,835 (kw=0,36)
	Med (IQR)	99,18 (85,02 - 130,59)	111,95 (84,54 - 162,74)	121,39 (82,53 - 192,75)	
	Min - maks	74,97 - 164,06	74,37 - 2565,57	34,49 - 226,83	
Testosteron (ng/L)	A.O ± S.S	201,44 ± 35	232,85 ± 70,51	295,85 ± 21,01	0,006* (kw=10,218) b
	Med (IQR)	202,79 (177,71 - 222,6)	266,98 (148,8 - 288,49)	297,99 (277,7 - 307,01)	
	Min - maks	148,12 - 255,83	147,35 - 303,97	268,43 - 338,15	
FSH (mIU/ml)	A.O ± S.S	6,7 ± 8,67	0,96 ± 0,74	1,64 ± 2,06	0,029* (kw=7,079) b
	Med (IQR)	1,71 (1,4 - 14,42)	0,71 (0,67 - 0,96)	0,68 (0,45 - 2,54)	
	Min - maks	1,24 - 22,29	0,4 - 2,76	0,35 - 6,31	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdeler); kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi; a: Kontrol ve PCOS arası anlamlı farklılık; b: Kontrol ve PCOS+O arası anlamlı farklılık; c: PCOS ve PCOS+O arası anlamlı farklılık

Deney gruplarında incelendiğinde E2 düzeyi en yüksek olarak letrozol uygulanan PCOS grubunda (416,73 ± 868,85 ng/L) bulundu. Grupların serum E2 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Testosteron düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır (p=0,006). T düzeyi kontrol grubunda 201,44 ± 35 ng/L olarak PCOS+OI grubuna (295,85 ± 21,01 ng/L) göre daha düşük olduğu görüldü. Aynı zamanda PCOS grubunda kontrol grubuna göre yüksek seviyede T düzeyi (232,85 ± 70,51 ng/L) bulunmuştur. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu.

Grupların FSH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür (p=0,029). PCOS+OI grubunda kontrol grubuna göre FSH düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düşüktü.

En yüksek FSH düzeyi kontrol grubunda $6,7 \pm 8,67$ mIU/ml saptanırken, PCOS+OI grubunda $1,64 \pm 2,06$ bulunmuştur. En düşük FSH seviyesi ise $0,96 \pm 0,74$ mIU/ml olarak PCOS grubunda görüldü.

4.3.Vajinal Smear Bulguları



Şekil 4.1. Sıçanlardan alınan vajinal smear preparatlarının boyama öncesi görüntüleri.

Letrozol ile PCOS indüksiyonu oluşturulduktan 12. günden itibaren tüm gruplara vajinal smear yapıldı. Yapılan vajinal smearda kontrol grubunun östrus siklusu düzenli olarak devam etmekteydi (Tablo 4.3.). Tüm kontrol gruplarının vajinal smearlarının boyalı preparatlarında en az 3 siklus: proöstrus, östrus, diöstrus ve metöstrus gözlemlendi. Kontrol grubunda proöstrus aşamasında kümeler halinde küçük nükleuslu epitel hücreleri saptanırken östrus aşamasında bu hücreler görülmedi. Düzensiz sitoplazmalı kornifiye epitel hücreleri saptandı. Diöstrus aşamasında azalan miktarda nükleuslu epitel hücreleri görünürken nötrofil hâkimiyeti görüldü. Metöstrus aşamasında ise yer yer nükleuslu hücreler ve kornifiye hücreler de vardı.

PCOS ve PCOS+OI grubu incelendiğinde östrus sikluslarının düzensizleştiği görüldü. Uzayan diöstrus siklusu gözlemlendi. Yapılan 15 günlük vajinal smear incelemesinde büyük nükleuslu epitel hücreleri ve kornifiye hücrelerin miktarının çok azaldığı, küçük nükleuslu epitel hücrelerinin ise yeryer daha fazla sayıda (++) olduğu gözlemlendi. Fakat nötrofil hâkimiyeti 15 günlük süreçte tüm PCOS oluşturulan gruplarda oldukça yoğun miktardaydı (+++). Ovulasyon indüksiyonunda smear görüntülerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı saptandı (Tablo 4.4. ve Tablo 4.5).

Tablo 4.3. Kontrol grubu vajinal smearde hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları.

Tarih	Nötrofil	Küçük nükleuslu epitel hücreler	Büyük nükleuslu epitel hücreler	Çekirdeksiz keratinize epitel hücreler	Siklus
8.05.2023	0	+++	+	0	Proöstrus
9.05.2023	0	0	+	+++	Östrus
10.05.2023	0	+	0	0	Metöstrus
11.05.2023	+	+	+	+	Metöstrus
12.05.2023	+++	++	+	0	Diöstrus
13.05.2023	0	+++	+	0	Proöstrus
14.05.2023	0	0	+	+++	Östrus
15.05.2023	+	++	++	0	Metöstrus
16.05.2023	+++	++	+	0	Diöstrus
17.05.2023	+++	++	+	0	Diöstrus
18.05.2023	0	+++	+	0	Proöstrus
19.05.2023	0	0	+	+++	Östrus
20.05.2023	+	+	+	+	Metöstrus
21.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
22.05.2023	+++	+	+	0	Diöstrus

Not:0 =hücre yok; + = birkaç hücre; ++ =orta seviyede hücre; +++ = yüksek seviyede hücre.

Tablo 4.4. PCOS grubu vajinal smearde hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları.

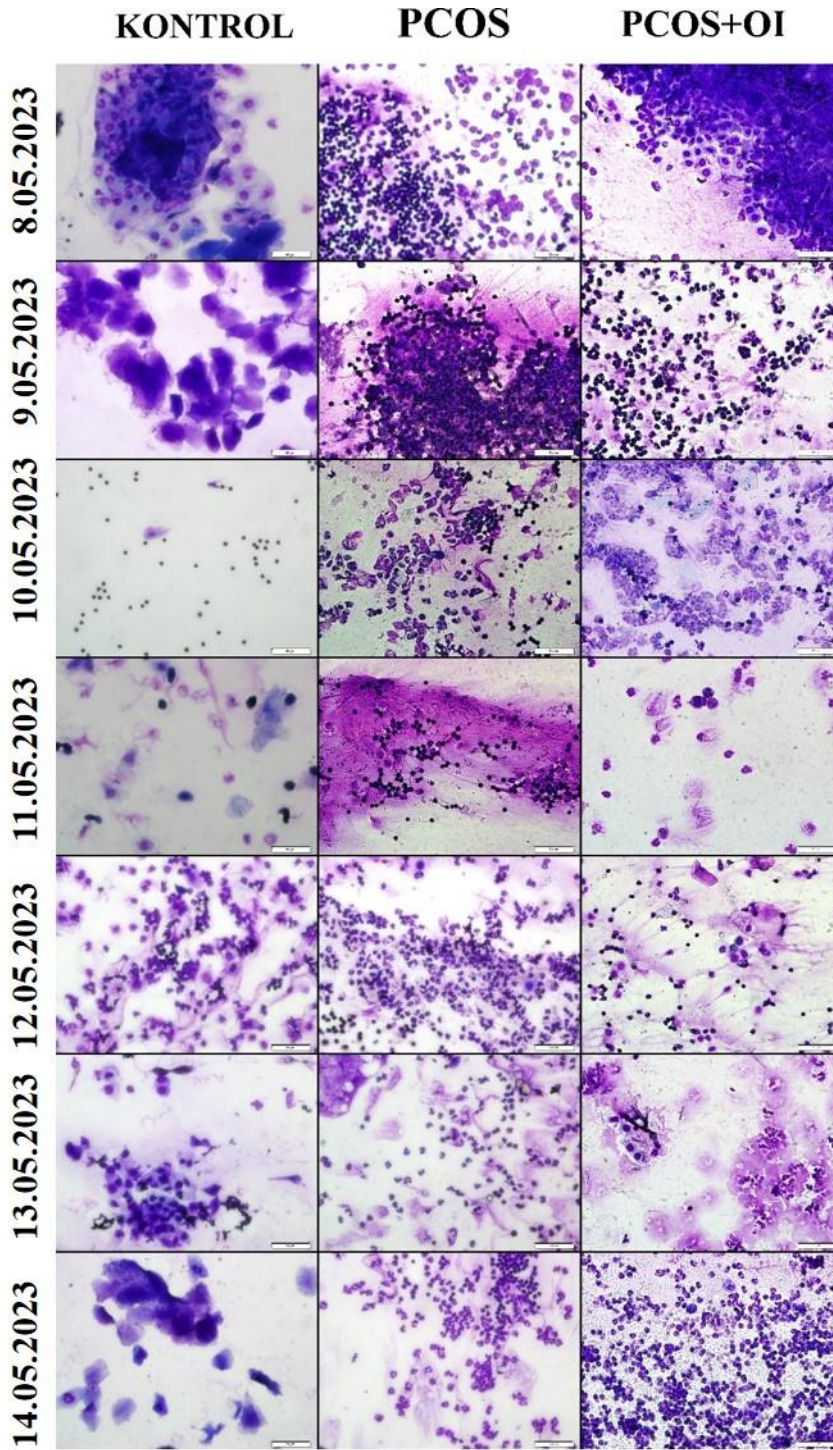
Tarih	Nötrofil	Küçük nükleuslu epitel hücreler	Büyük nükleuslu epitel hücreler	Çekirdeksiz keratinize epitel hücreler	Siklus
8.05.2023	+++	+	+	0	Diöstrus
9.05.2023	++	+	+	0	Diöstrus
10.05.2023	++	++	++	+	Metöstrus
11.05.2023	+	+	+	0	Proöstrus
12.05.2023	+++	+	+	+	Diöstrus
13.05.2023	+++	0	0	0	Diöstrus
14.05.2023	+++	0	0	0	Diöstrus
15.05.2023	+++	0	0	0	Diöstrus
16.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
17.05.2023	++	0	0	+	Diöstrus
18.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
19.05.2023	+++	0	+	0	Diöstrus
20.05.2023	+++	0	0	0	Diöstrus
21.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
22.05.2023	+++	0	0	0	Diöstrus

Not:0 =hücre yok; + = birkaç hücre; ++ =orta seviyede hücre; +++ =yüksek seviyede hücre.

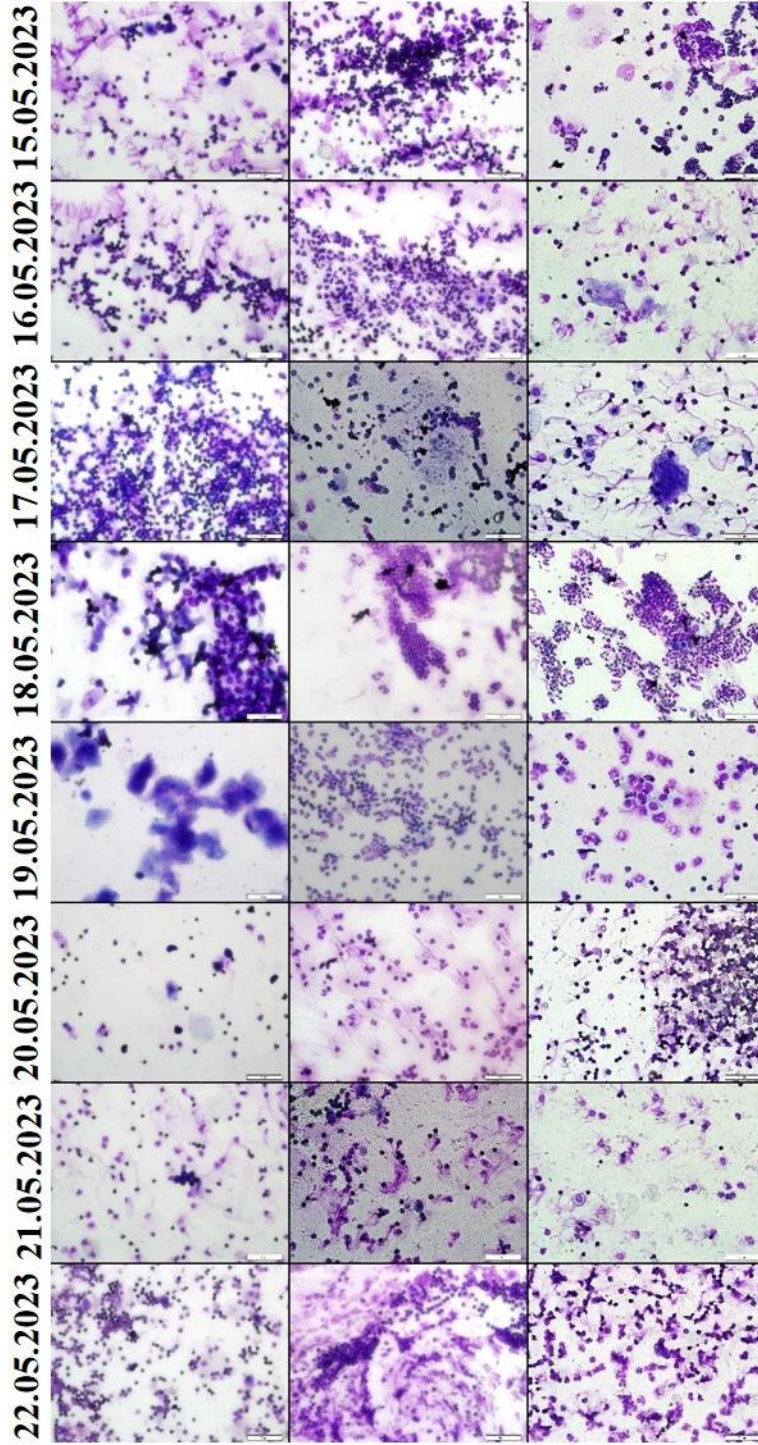
Tablo 4.5. PCOS+OI grubu vajinal smearde hücre tiplerinin kısmen numaralandırılması ve hücre tiplerinin östrus siklusunun aşamaları.

Tarih	Nötrofil	Küçük nükleuslu epitel hücreler	Büyük nükleuslu epitel hücreler	Çekirdeksiz keratinize epitel hücreler	Siklus
8.05.2023	+++	+++	0	0	Diöstrus/proöstrus
9.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
10.05.2023	+++	+	+	+	Diöstrus
11.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
12.05.2023	+++	+	+	+	Diöstrus
13.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
14.05.2023	+++	++	0	0	Diöstrus
15.05.2023	+++	++	+	+	Metöstrus/ diöstrus
16.05.2023	+++	+	+	+	Diöstrus
17.05.2023	+++	+	+	+	Diöstrus
18.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
19.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
20.05.2023	+++	+	0	0	Diöstrus
21.05.2023	++	+	+	+	Diöstrus
22.05.2023	+++	+	+	0	Diöstrus

Not:0 =hücre yok; + = birkaç hücre; ++ =orta seviyede hücre; +++ =yüksek seviyede hücre.



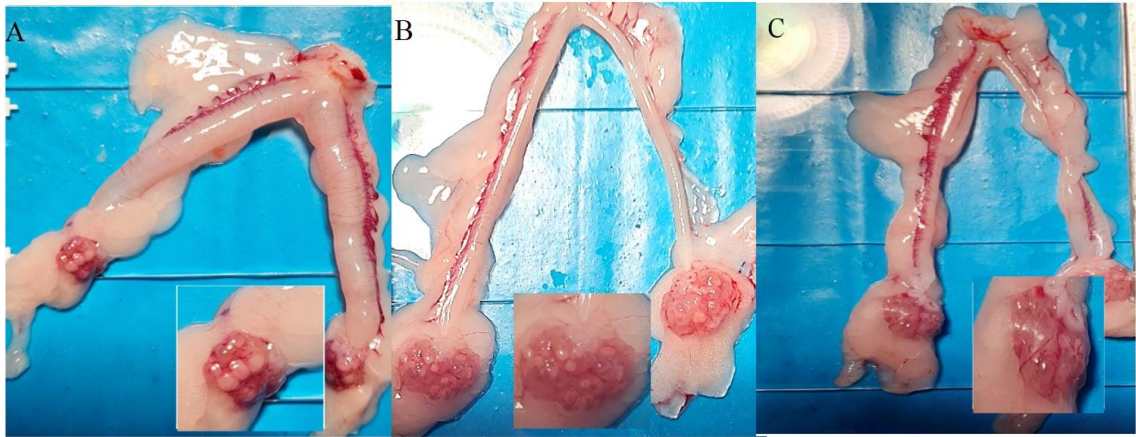
Şekil 4.2. Deney süresince gruplardan alınan vaginal smear örneklerinin boyanması sonucu elde edilen görüntüler.



Şekil 4.2. Devam. Deney süresince gruplardan alınan vaginal smear örneklerinin boyanması sonucu elde edilen görüntüler.

4.4. Makroskopi Bulguları

Yapılan makroskobik incelemede kontrol grubu sıçanlarının her iki ovaryum dokusu normal görünümdeydi. PCOS, PCOS+OI gruplarında polikistik foliküller gözlemlenmekle birlikte PCOS+OI grubundaki tüm sıçanlarda kanlanma artışı dikkat çekiciydi. PCOS grubunda dikkat çeken diğer özellik ise her iki uterusun daha ince gözükmeydi. Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil. 4.3. Ovaryum örnekleri makroskobik resmi. A: Kontrol grubu, B: PCOS grubu, C: PCOS+OI grubu.

4.5. RT- PCR Bulguları

RT-PCR sonucuna göre: miR-33b-5p ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında PCOS grubu kontrol grubuna göre düşük seviyede saptandı. PCOS+OI grubunda yüksekti fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). miR-140 ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre her iki grupta düşük seviyede saptandı. PCOS+OI grubunda PCOS grubuna göre daha yüksek seviyede düşüş olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). miR-320a ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre PCOS grubunda yüksek olduğu saptandı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) fakat PCOS+OI grubunda ekspresyon seviyesi düşük olduğu görüldü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). miR-378a-5p ekspresyon seviyesi gruplar arasında karşılaştırıldığında her iki grupta kontrol grubuna göre düşük seviyede ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). miR-378a-5p ekspresyonu PCOS grubunda 2 kat düşüş gözlemlenirken PCOS+OI grubunda 5 kat düşük gözlemlenmesi dikkat çekiciydi. miR-451a ekspresyonu gruplarda karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre iki grupta yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. PCOS+OI grubunda miR-451a artışı 11 kat daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). miR-486a-5p ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre iki grupta istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. RT-PCR sonucuna göre kontrol ve diğer grupların miRNA ekspresyon seviyelerinde değişiklikler.

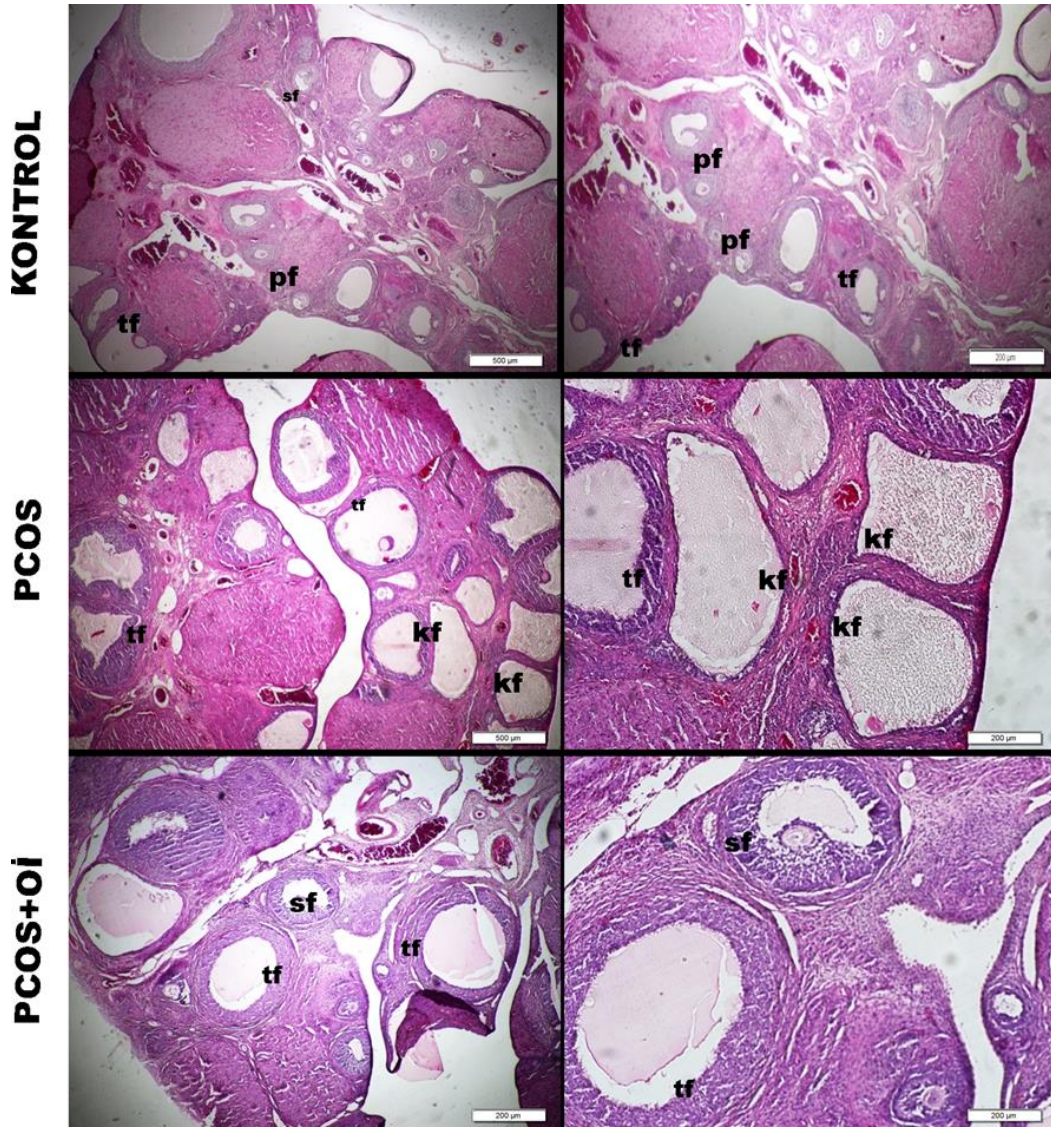
Gen Adı	PCOS		PCOS+OI	
	Fold Regulation	p-value	Fold Regulation	p-value
u6	1.00	0.000000	1.0	0.000000
miR-33b-5p	-1.56	0,756501	1.31	0,903215
miR-140	-1.49	0.430138	-4.28	0.006102*
miR-320a	2.16	0.018059*	-1.39	0.289851
miR-378a-5p	-2.07	0.007962*	-5.22	0.004852*
miR-451a	1.23	0.478652	11.62	0.002346*
miR-486-5p	-2.05	0.008883*	-7.37	0.000004*

(* $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık)

4.6. Histopatolojik Bulgular

4.6.1. Hemotoksilen&Eozin boyama bulguları

Kontrol grubunda ovaryum normal yapıdaydı. Gelişimsel yapıdaki tüm foliküller primordiyalden tersiyer foliküle kadar normal yapıda izlendi. PCOS'da ovaryum dokusunda kistik foliküller belirgindi. Gelişim sürecindeki foliküllerin bir çoğunda dejenerasyon izlendi. Sekonder ve tersiyer folikülde granüloza hücrelerinde ayrılmalar, düzensiz lümen, teka tabakalarında incelme foliküller ile stroma arasında boşlukların olduğu yeryer ayrılmalar başladığı görüldü. PCOS+OI grubunda ovaryum dokusunda hala kistik foliküller izlenmesine karşın görünümün daha normale yakın olduğu gözlemlendi. Gelişim sürecindeki foliküllerin PCOS grubunda granüloza hücrelerinde görülen ayrılmaların bu grupta görülmediği belirlendi. Hala bazı foliküllerde stromayla aradaki boşluk gözlenmesine rağmen daha normal olduğu görüldü (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Üç ayrı gruptan alınan ovaryum kesitlerinin Hematoksilen-Eozin boyama sonuçları
Bar 500µm. (kl: korpus luteum, kf: kistik folikül, gf: graaf folikül, tf: tersiyer folikül, sf:
sekonder folikül, pf: primer folikül, prf: primordiyal folikül)

4.7. Folikül Sayımı Bulguları

Deney gruplarının primordial folikül sayıları değerlendirildiğinde; kontrol grubunda $5,17 \pm 4,79$, PCOS grubunda $1,2 \pm 2,17$ ve PCOS+OI grubunda $1 \pm 1,26$ olarak bulundu. Primer folikül sayıları kontrol grubunda $3,33 \pm 1,51$, PCOS grubunda $1,2 \pm 1,3$ ve PCOS+OI grubunda $1,17 \pm 0,75$ olarak bulundu. Yapılan folikül sayımında primordiyal ve primer folikül sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$). PCOS+OI grubunda primordiyal ve primer folikül sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş görüldü. Sekonder folikül sayıları kontrol grubunda $3,5 \pm 3,51$, PCOS grubunda $1,4 \pm 0,55$ ve PCOS+OI grubunda $2,17 \pm 1,17$ olarak bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$). Fakat deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, sekonder folikül sayısı kontrol grubuna göre hem PCOS hemde PCOS+OI grubunda bir miktar azalış olduğu görüldü.

Tersiyer folikül sayıları değerlendirildiğinde kontrol grubunda $2 \pm 1,26$, PCOS grubunda $1 \pm 0,71$ ve PCOS+OI grubunda $1,83 \pm 0,98$ olarak bulundu. Sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$). Fakat deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, tersiyer folikül sayısı kontrol grubuna göre hem PCOS hemde PCOS+OI grubunda az miktarda azalış olduğu görüldü.

Gruplarda atretik folikül sayısı değerlendirildiğinde; kontrol grubunda $4,5 \pm 1,76$, PCOS grubunda $10,6 \pm 3,85$, PCOS+OI grubunda $6,5 \pm 2,43$ adet atretik folikül bulundu. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında atretik folikül sayısı yönünden anlamlı farklılık bulunmuştur ($p = 0,028$). PCOS grubunda bulunan atretik folikül sayısı diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Deney gruplarında bulunan korpus luteum sayıları incelendiğinde; kontrol grubunda $6,17 \pm 2,86$, PCOS grubunda $5,8 \pm 3,9$ ve PCOS+OI grubunda $3,33 \pm 2,42$ adet korpus luteum bulundu. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak korpus luteum sayısında anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0,05$). Kontrol grubunda bulunan korpus luteum sayısı diğer iki gruba göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Deney gruplarına ait primordial, primer, sekonder, tersiyer, atretik ve korpus luteum sayısının H skor değerlendirilmesi Tablo 4.7.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Deney gruplarında, folikül sayımının istatistiksel olarak karşılaştırılması.

		Kontrol	PCOS	PCOS+OI	Gruplar arası p
primordiyal	A.O ± S.S	5,17 ± 4,79	1,2 ± 2,17	1 ± 1,26	0,047* (kw=6,131) b
	Med (IQR)	3,5 (1,75 - 8,75)	0 (0 - 3)	0,5 (0 - 2,25)	
	Min - maks	1 - 14	0 - 5	0 - 3	
primer	A.O ± S.S	3,33 ± 1,51	1,2 ± 1,3	1,17 ± 0,75	0,021* (kw=7,732) b
	Med (IQR)	3 (2 - 4,5)	1 (0 - 2,5)	1 (0,75 - 2)	
	Min - maks	2 - 6	0 - 3	0 - 2	
sekonder	A.O ± S.S	3,5 ± 3,51	1,4 ± 0,55	2,17 ± 1,17	0,612 (kw=0,981)
	Med (IQR)	2,5 (0,75 - 6,75)	1 (1 - 2)	2 (1 - 3,25)	
	Min - maks	0 - 9	1 - 2	1 - 4	
tersiyer	A.O ± S.S	2 ± 1,26	1 ± 0,71	1,83 ± 0,98	0,229 (kw=2,95)
	Med (IQR)	1,5 (1 - 3,25)	1 (0,5 - 1,5)	2 (1,5 - 2,25)	
	Min - maks	1 - 4	0 - 2	0 - 3	
atretik	A.O ± S.S	4,5 ± 1,76	10,6 ± 3,85	6,5 ± 2,43	0,028* (kw=7,134) a
	Med (IQR)	4 (3 - 6,25)	12 (6,5 - 14)	6,5 (4,5 - 8,5)	
	Min - maks	3 - 7	6 - 14	3 - 10	
Korpus_luteum	A.O ± S.S	6,17 ± 2,86	5,8 ± 3,9	3,33 ± 2,42	0,185 (kw=3,375)
	Med (IQR)	6 (3,75 - 8,5)	7 (2 - 9)	3 (1,5 - 5,5)	
	Min - maks	3 - 10	0 - 10	0 - 7	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdeler); kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi; a: Kontrol ve PCOS arası anlamlı farklılık; b: Kontrol ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık; c: PCOS ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık.

4.8. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.8.1. PI3K İmmünohistokimyasal bulguları

PI3K reaksiyonunun kontrol ve PCOS grubunda primordial, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin hem oositlerde hem de granuloza hücrelerinde ekspresyonun zayıf pozitif olduğu izlenirken PCOS+OI grubunda tüm folliküllerde oositlerde orta derecede pozitif olduğu belirlendi. Granuloza hücrelerinde ise reaksiyon nukleuslarda negatif sitoplazmalarda kuvvetli pozitif. Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.

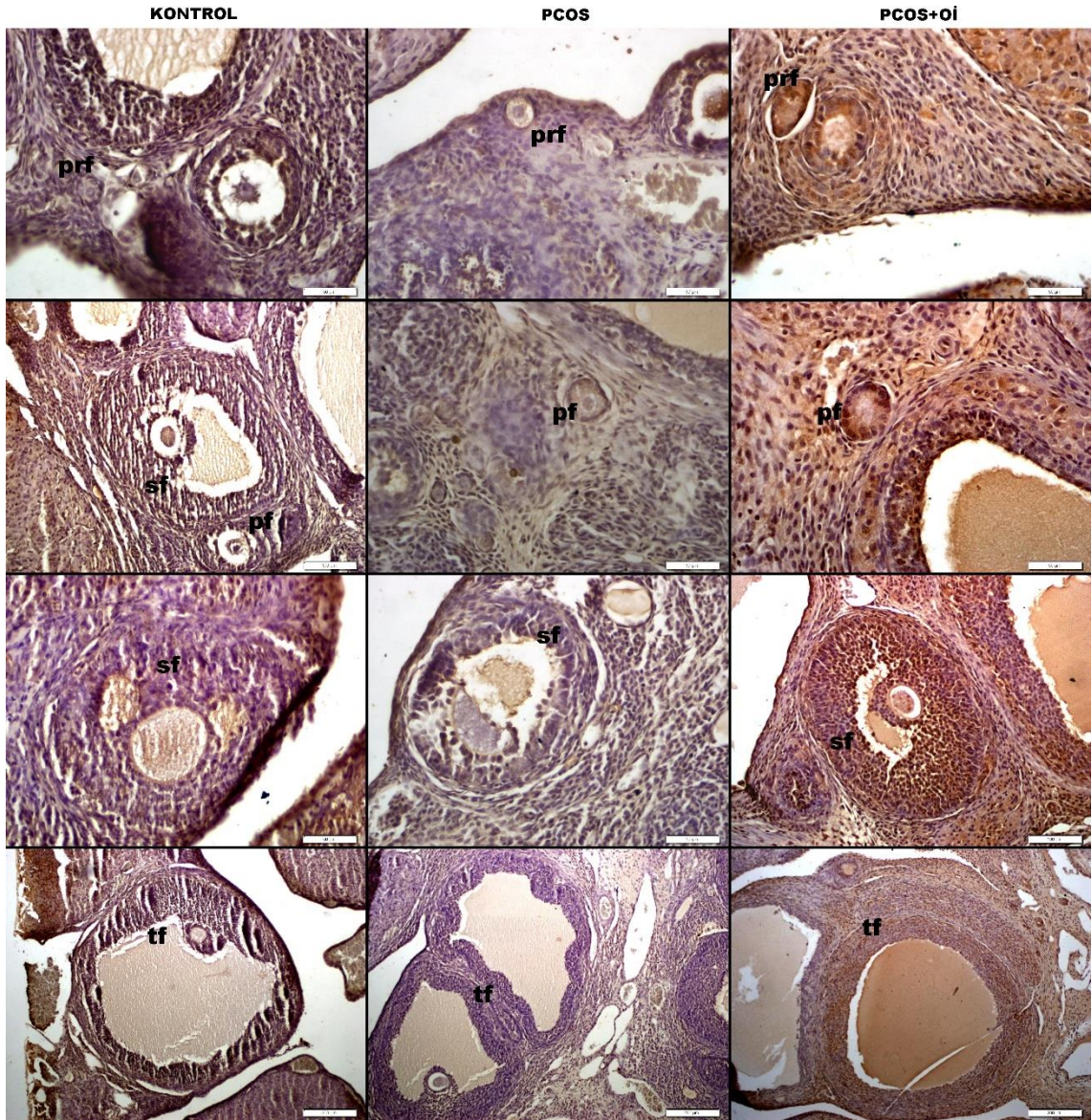
Yapılan H skor analizinde primordiyal folikül ve korpus luteumda PI3K ekspresyonu kontrol ve PCOS+OI gruplarında PCOS grubuna göre anlamlı yüksek pozitif reaksiyon gösterdi. Primer, sekonder ve tersiyer foliküller için PI3K ekspresyonu PCOS+OI grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek pozitif reaksiyon bulundu.

Tersiyer foliküldeki PI3K ekspresyonunun PCOS+OI grubundaki fazlalık diğer iki gruba göre anlamlı olarak yüksek pozitif reaksiyon gösterdi ($p<0,05$). Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. PI3K ekspresyonu immünohistokimyasal olarak sonuçları.

		Kontrol	PCOS	PCOS+OI	Gruplar arası p
PI3K_Primordiyal	A.O ± S.S	58,17 ± 19,62	10 ± 0	74,67 ± 15,59	0,002* (kw=12,832) a, c
	Med (IQR)	55,5 (43,5 - 80)	10 (10 - 10)	77 (58,75 - 85,25)	
	Min - maks	30 - 80	10 - 10	55 - 98	
PI3K_Primer	A.O ± S.S	10 ± 0	20,17 ± 7,36	107,67 ± 11,18	0,001* (kw=14,891) b
	Med (IQR)	10 (10 - 10)	20 (13,75 - 26,5)	102,5 (99,5 - 119,75)	
	Min - maks	10 - 10	10 - 31	98 - 125	
PI3K_Sekonder	A.O ± S.S	10 ± 0	17,5 ± 7,15	116,67 ± 27,6	0,001* (kw=14,292) b
	Med (IQR)	10 (10 - 10)	17,5 (10 - 23,5)	115,5 (92 - 142,75)	
	Min - maks	10 - 10	10 - 28	83 - 151	
PI3K_Tersiyer	A.O ± S.S	10 ± 0	10 ± 0	81,17 ± 8,75	0,0001* (kw=16,129) c, B
	Med (IQR)	10 (10 - 10)	10 (10 - 10)	82 (72,25 - 89,5)	
	Min - maks	10 - 10	10 - 10	70 - 91	
PI3K_korpus_luteum	A.O ± S.S	288,33 ± 12,91	10 ± 0	287,5 ± 19,43	0,002* (kw=12,296) a, C
	Med (IQR)	290 (275 - 300)	10 (10 - 10)	295 (276,25 - 300)	
	Min - maks	275 - 300	10 - 10	250 - 300	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdeler); kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi; a: Kontrol ve PCOS arası anlamlı farklılık; b: Kontrol ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık; c: PCOS ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık.



Şekil 4.5. Ovaryum dokularında PI3K ekspresyonu. Prf: primordiyal folikül, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, tf: tersiyer folikül. İmmunoperoksidaze-hematoksilen X20.

4.8.2. p-PI3K İmmünohistokimyasal Bulguları

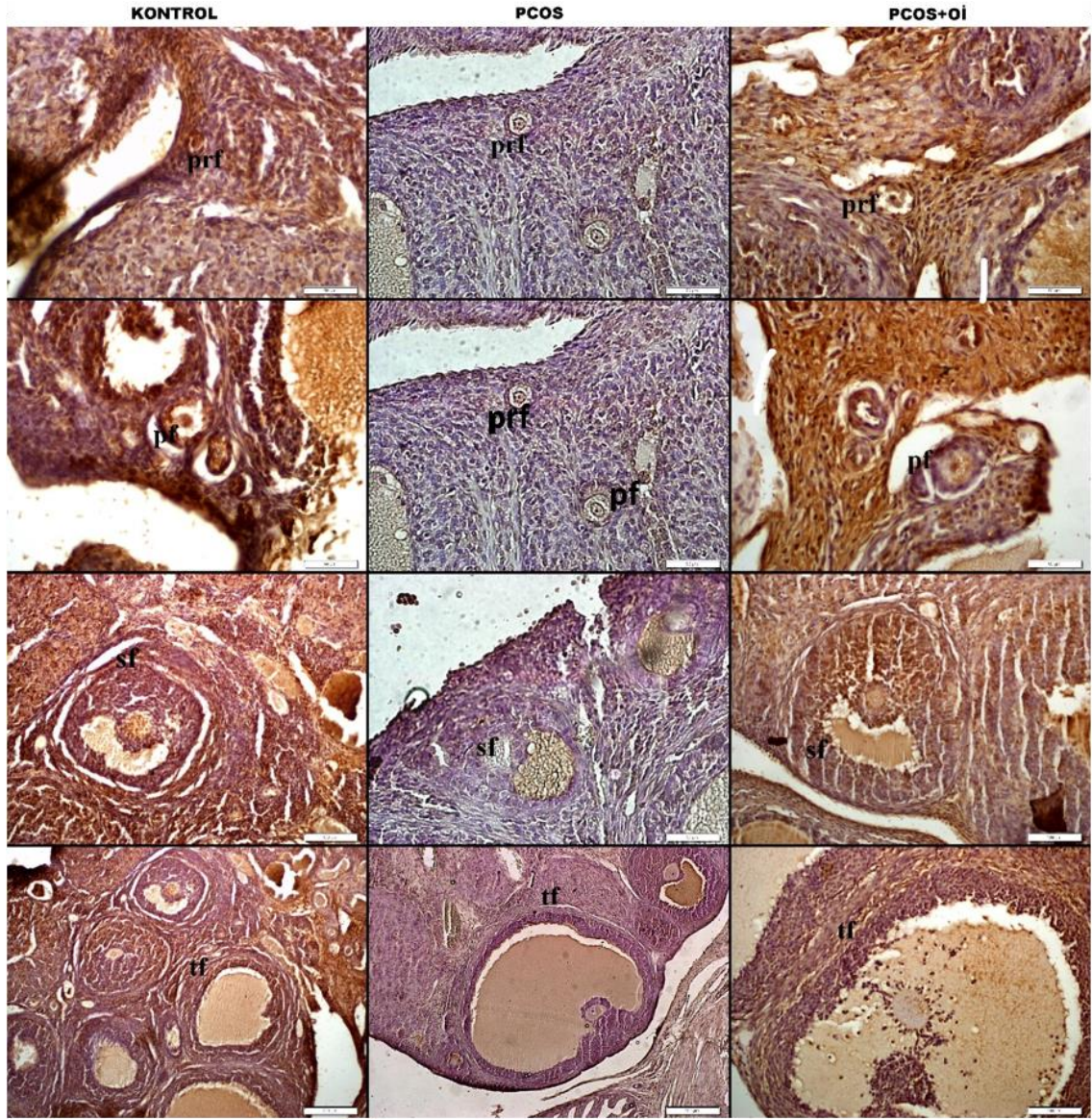
Kontrol ve PCOS+OI grubunda p-PI3K ekspresyonu tüm gruplarda oositlerde ve granuloza hücrelerinde kuvvetli pozitif. Bununla birlikte PCOS grubunda primordial ve primer folliküllerde oositler ve granuloza hücreleri zayıf pozitif ekspresyon gösterirken sekonder ve tersiyer folliküllerde ekspresyonun negatif yer yer zayıf pozitif olduğu dikkati çekti. Şekil 4.6.'de gösterilmiştir.

p-PI3K ekspresyonu H skoru değerlendirildiğinde gelişmekte olan foliküllerin hepsinde ve korpus luteumda PCOS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düşük ekspresyon gösterdi. Primordiyal foliküller ve korpus luteum için p-PI3K ekspresyonu PCOS+OI grubunda PCOS grubuna göre anlamlı yüksek pozitif bulundu. ($p < 0,05$). Tablo 4.9.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. p-PI3K ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak sonuçları.

		Kontrol	PCOS	PCOS+OI	Gruplar arası p
p_PI3K_Primordiyal	A.O ± S.S	294,17 ± 9,17	13 ± 4,69	294,33 ± 8,89	0,002* (kw=12,25) a,c
	Med (IQR)	300 (283,75 - 300)	10 (10 - 18,5)	299 (287 - 300)	
	Min - maks	280 - 300	10 - 20	278 - 300	
p_PI3K_Primer	A.O ± S.S	276,67 ± 38,82	41,5 ± 18,45	212,33 ± 16,66	0,001* (kw=13,732) a
	Med (IQR)	290 (260 - 300)	42,5 (23,75 - 58,75)	213 (196 - 227,5)	
	Min - maks	200 - 300	20 - 61	190 - 235	
p_PI3K_Sekonder	A.O ± S.S	277,5 ± 18,64	56,17 ± 14,29	191,83 ± 10,09	0,001* (kw=15,189) a
	Med (IQR)	282,5 (255 - 292,5)	55,5 (45,5 - 65)	193 (184 - 200,75)	
	Min - maks	255 - 300	38 - 80	175 - 203	
p_PI3K_Tersiyer	A.O ± S.S	283,33 ± 15,38	16,33 ± 7,53	83,5 ± 19,02	0,0001* (kw=15,268) a
	Med (IQR)	282,5 (268,75 - 300)	15 (10 - 22)	87,5 (71 - 97)	
	Min - maks	265 - 300	10 - 28	50 - 103	
p_PI3K_korpus_luteum	A.O ± S.S	295 ± 10	31,67 ± 21,78	300 ± 0	0,001* (kw=14,227) a,c
	Med (IQR)	300 (290 - 300)	29 (10 - 53)	300 (300 - 300)	
	Min - maks	275 - 300	10 - 62	300 - 300	

* $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdeler); kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi; a: Kontrol ve PCOS arası anlamlı farklılık; b: Kontrol ve PCOS+O arası anlamlı farklılık; c: PCOS ve PCOS+O arası anlamlı farklılık



Şekil 4.6. Ovaryum dokularında p-PI3K ekspresyonu. Prf: primordiyal folikül, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, tf: tersiyer folikül. İmmunoperoksidaz-hematoksilen X20.

4.8.3. AKT İmmünohistokimyasal bulguları

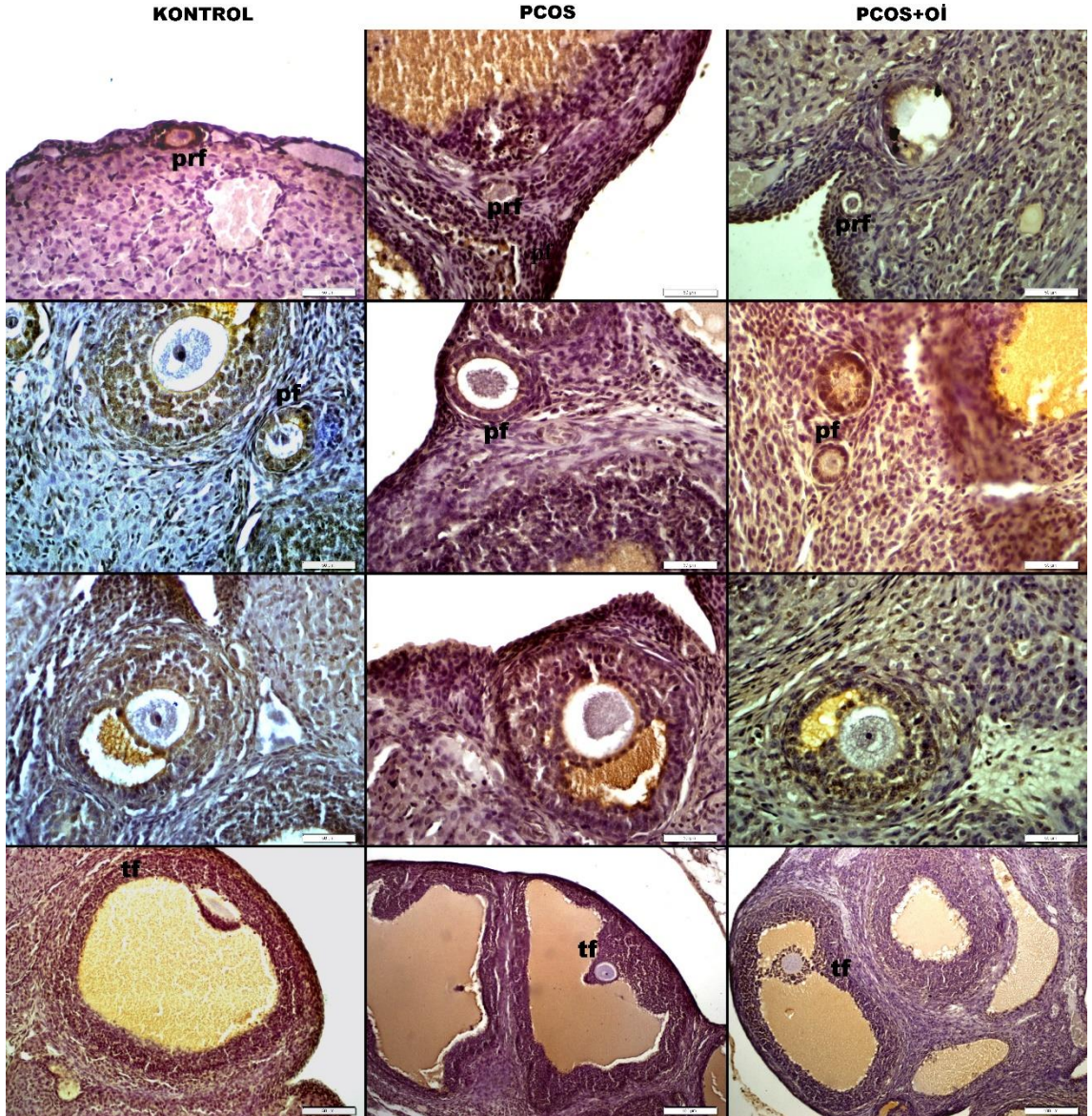
AKT reaksiyonu kontrol grubu primordial folliküllerde oositlerde pozitif reaksiyon gösterirken, granuloza hücrelerinde reaksiyon negatifti. Primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde oositler negatif olarak izlenirken granuloza hücreleri orta ve zayıf derecede reaksiyon gösterdi. PCOS grubunda AKT ekspresyonu primordial, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde oositler ve granuloza hücrelerinde negatifti. PCOS+OI grubunda primordial, sekonder ve tersiyer folliküllerde AKT reaksiyonu oositlerde ve granuloza hücrelerinde negatif/ zayıf pozitif izlenirken primer folliküllerde ise ekspresyonun hem oosit hem de granuloza hücre sitoplazmasında kuvvetli pozitif olduğu saptandı. Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.

H skoru değerlendirildiğinde primordiyal, sekonder ve tersiyer foliküllerde AKT ekspresyonu PCOS+OI gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düşük reaksiyon gösterdi. Primer foliküller ve korpus luteum için AKT ekspresyonu PCOS+OI grubunda PCOS grubuna göre anlamlı düşük reaksiyon bulundu. Tersiyer foliküldeki AKT ekspresyonu kontrol grubuna göre PCOS grubunda anlamlı olarak düşük reaksiyon saptandı ($p<0,05$). Tablo 4.10.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.10. AKT ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak sonuçları

		Kontrol	PCOS	PCOS+OI	Gruplar arası p
AKT_Primordiyal	A.O ± S.S	158,33 ± 38,04	70,5 ± 9,14	34,83 ± 10,87	0,0001* (kw=15,221) b
	Med (IQR)	180 (115 - 185)	70 (63,25 - 80)	37 (23,75 - 42,5)	
	Min - maks	100 - 185	58 - 80	20 - 50	
AKT_Primer	A.O ± S.S	94,67 ± 6,68	104,17 ± 8,61	35,5 ± 12,71	0,001* (kw=13,064) c
	Med (IQR)	92,5 (89,5 - 101,25)	105 (95 - 111,25)	40 (31 - 41,25)	
	Min - maks	88 - 105	95 - 115	10 - 45	
AKT_Sekonder	A.O ± S.S	93 ± 8,12	68 ± 9,7	25,5 ± 9,03	0,001* (kw=14,84) b
	Med (IQR)	91,5 (85 - 101,25)	67,5 (59,5 - 73,75)	29 (17,5 - 31,25)	
	Min - maks	85 - 105	58 - 85	10 - 35	
AKT_Tersiyer	A.O ± S.S	75,83 ± 10,53	22,5 ± 11,73	15,83 ± 9,17	0,002* (kw=12,258) a, b
	Med (IQR)	77 (66 - 85,75)	22,5 (10 - 32,5)	10 (10 - 26,25)	
	Min - maks	60 - 88	10 - 40	10 - 30	
AKT_korpus_luteum	A.O ± S.S	101,67 ± 21,13	294,17 ± 6,65	49,67 ± 32,17	0,001* (kw=14,659) c
	Med (IQR)	95 (83,75 - 126,25)	295 (288,75 - 300)	61,5 (10 - 73,75)	
	Min - maks	80 - 130	285 - 300	10 - 85	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdeler); kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi; a: Kontrol ve PCOS arası anlamlı farklılık; b: Kontrol ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık; c: PCOS ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık.



Şekil 4.7. Ovaryum dokularında AKT ekspresyonu. Prf: primordiyal folikül, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, tf: tersiyer folikül. İmmunoperoksidaze-hematoksilen X20.

4.8.4. p-AKT İmmünohistokimyasal bulguları

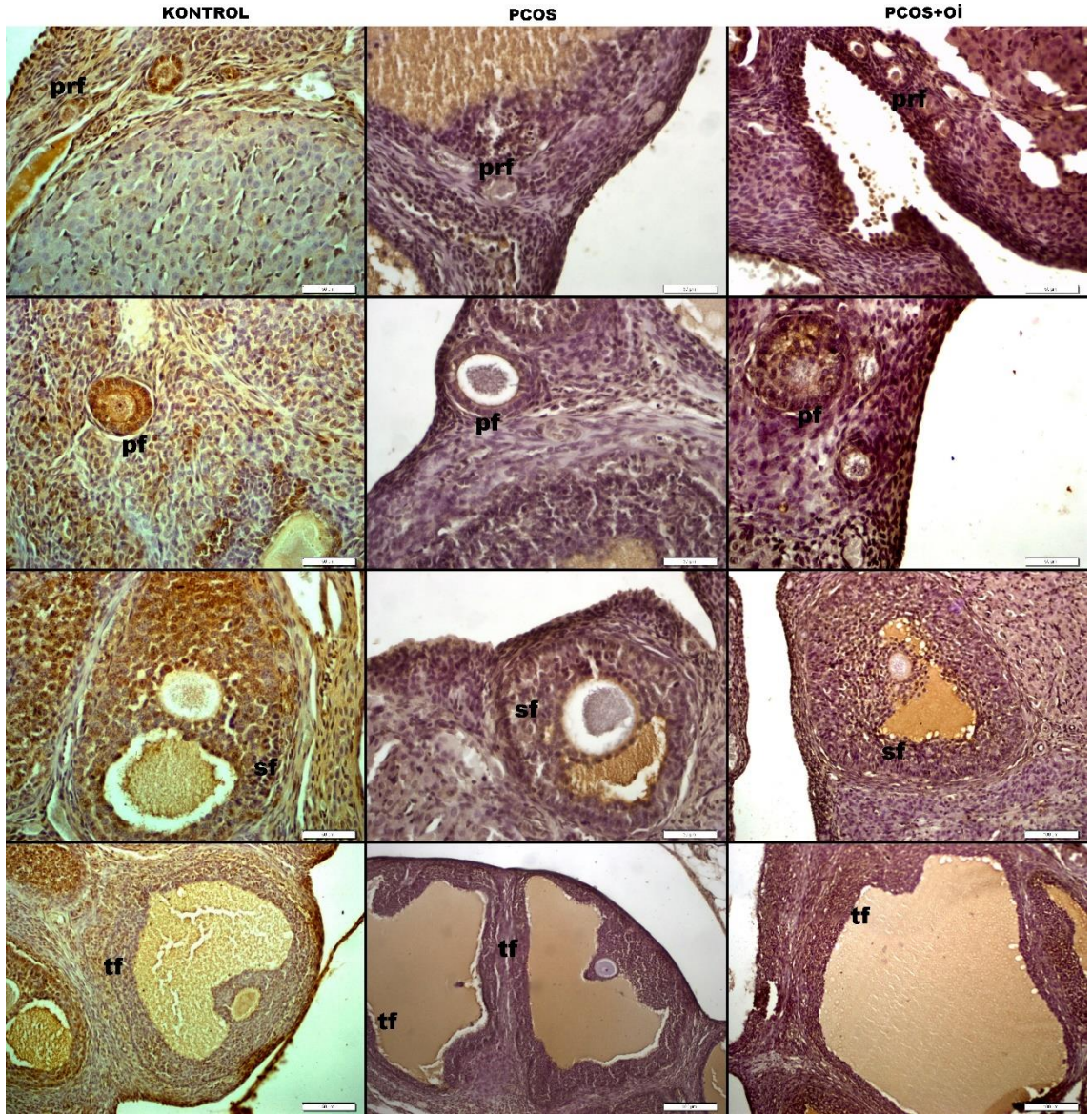
p-AKT ekspresyonu kontrol grubunda primordial, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde hem oositlerde hem de granuloza hücrelerinde kuvvetli pozitif. PCOS ve PCOS+OI grubunda ise primordial, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde hem oositlerde hem de granuloza hücrelerinde ekspresyonun zayıf pozitif ve negatif olduğu izlenmiş olup Tablo 4.11.'de belirtilmiştir.

p-AKT ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde primordiyal, sekonder ve tersiyer folikülleri ve korpus luteum için PCOS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşük ekspresyon saptandı. Primer folikülde ise PCOS+OI grubu kontrol grubuna göre anlamlı düşük ekspresyon vardı. Ayrıca sekonder folikül ve korpus luteumda da PCOS+OI grubu kontrol grubuna göre anlamlı düşük ekspresyon görüldü. Şekil 4.8. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. p-AKT ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak sonuçları.

		Kontrol	PCOS	PCOS+OI	Gruplar arası p
p_Akt_Primordiyal	A.O ± S.S	143,17 ± 12,09	10 ± 0	128,67 ± 8,76	0,001* (kw=13,705) a
	Med (IQR)	144,5 (130,25 - 153,25)	10 (10 - 10)	129 (119,5 - 136,5)	
	Min - maks	128 - 160	10 - 10	118 - 141	
p_Akt_Primer	A.O ± S.S	221,5 ± 12,34	24,17 ± 12,81	10 ± 0	0,001* (kw=14,292) b
	Med (IQR)	222,5 (213,5 - 232)	25 (10 - 36,25)	10 (10 - 10)	
	Min - maks	200 - 235	10 - 40	10 - 10	
p_Akt_Sekonder	A.O ± S.S	242,5 ± 14,4	23 ± 11,14	16,67 ± 8,16	0,002* (kw=12,151) a, b
	Med (IQR)	242,5 (231,25 - 256,25)	25 (10 - 32)	15 (10 - 22,5)	
	Min - maks	220 - 260	10 - 38	10 - 30	
p_Akt_Tersiyer	A.O ± S.S	105,5 ± 19,22	10 ± 0	18,33 ± 7,53	0,001* (kw=14,356) a
	Med (IQR)	106,5 (87,5 - 122,5)	10 (10 - 10)	20 (10 - 22,5)	
	Min - maks	80 - 130	10 - 10	10 - 30	
p_Akt_korpus_luteum	A.O ± S.S	72,33 ± 18,92	10 ± 0	11,67 ± 4,08	0,001* (kw=14,864) a, b
	Med (IQR)	70 (56,75 - 85,75)	10 (10 - 10)	10 (10 - 12,5)	
	Min - maks	53 - 103	10 - 10	10 - 20	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdelikler); kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi; a: Kontrol ve PCOS arası anlamlı farklılık; b: Kontrol ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık; c: PCOS ve PCOS+OI arası anlamlı farklılık.



Şekil 4.8. Ovaryum dokularında p-AKT ekspresyonu. Prf: primordiyal folikül, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, tf: tersiyer folikül. İmmunoperoksidaze-hematoksilen X20.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda vajinal smear bulguları, kan hormon düzeyleri deneysel PCOS modeli oluşturduğumuzu göstermiştir. Ovulasyon indüksiyonunun T ve E2 düzeyini daha da arttırması ve FSH düzeyini anlamlı bir şekilde düşürmesi dikkat çekmiştir. Triplike yapılan miRNA analizlerinde miR-140,486 ve 378'in ekspresyonunun anlamlı düşmesi ve miR-451 anlamlı artışı, PI3K/AKT yolağıyla ilişkili bulunmuştur PI3K/AKT yolağını gösteren immünohistokimyasal analizler sonucu ovulasyon indüksiyonunun bu yolağın aktifleşmesini sağlayarak granüloza hücre apoptozisini engellemiştir.

PCOS hiperandrojenizm, sıklıkla insülin direnci, obezite ve kronik inflamasyonun eşlik ettiği morfolojik değişiklikler ile karakterizedir (Sang ve ark., 2013). Li ve ark. (2017)'lerinin PCOS'lu hastalarda yaptığı çalışmada çoğu hastanın obez olduğu saptanmıştır (T. Li ve ark., 2017). Sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde vücut ağırlıkları PCOS olmayan gruptakilere oranla PCOS'lu sıçanlarda daha yüksek olup bu durum PCOS'un neden olduğu metabolik bozukluktan kaynaklanıyor olabileceği bulunmuştur (Teng ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda 25 gün letrozol verilen PCOS ve PCOS+OI gruplarında istatikselsel olarak anlamlı bir fark olmasada ağırlık artışının olması diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

Yapılan bazı çalışmalarda PCOS hastalarında Testosteron ve FSH düzeylerinin arttığı, E2 düzeyinin ise dramatik olarak azaldığı bulunmuştur (D. Li ve ark., 2016) ve Letrozol ile PCOS oluşturulan başka bir çalışmada yine aynı sonuçlar elde edilmiştir (Zhou ve ark., 2023). Letrozol ile deneysel PCOS modeli oluşturulan sıçanlarda kontrol gruplarına göre FSH seviyesi düşük olduğu görülmüştür (Yang ve ark., 2018). Yapılan başka bir çalışmada da Testosteron seviyesi yüksek düzeyde iken FSH seviyeleri PCOS grubunda sağlıklı sıçanlara kıyasla daha düşük bulunmuş (Xie ve ark., 2021). Bununla birlikte farklı bir çalışmada ise FSH ve E2 düzeyleri PCOS sıçanlarında daha düşük olduğu bulunmuş (Teng ve ark., 2019). Yu J ve ark. (2014) da sıçanlara 21 gün DHEA

vererek oluşturdukları PCOS model grubunda kontrol grubuna göre serum E2 düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (Yu ve ark., 2014). Yine DHEA ile PCOS oluşturulmuş başka bir çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PCOS'lu sıçanlarda serum FSH seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüş fakat Testosteronun ise serum seviyelerinde önemli artış olduğu belirtilmiş (Y. Zhou ve ark., 2019). Bu çalışma ile paralel olarak Letrozol ile oluşturduğumuz PCOS ve PCOS+OI grubunda kan E2 ve Testosteron düzeyleri yüksek saptanırken FSH düzeyi kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır. Literatür göz önüne alındığında bu sıçanlarda PCOS'u başarı ile oluşturduğumuz kan örnekleri ile ispatlanmıştır. E2 yüksekliği PCOS grubunda, gelişen çpk sayıda kistik folikül sayesinde FSH salınımını çok baskılamıştır, PCOS+OI grubunda kontrol grubuna göre yüksek olan E2 düzeyi, FSH salınımını PCOS grubundaki kadar çok düşmemiştir. Buda bize indüksiyonunun olumlu yönde folikül gelişimi olduğunu göstermiştir.

Son yıllardaki, miRNA'ların endokrin ve metabolik hastalıklar da dahil olmak üzere insan hastalıklarında rol oynayan önemli gen düzenleyicileri olduğunu öne sürmektedir. Bazı miRNA'ların glukoz homeostazisinin modüle edilmesinde kritik roller oynadığı bulunmuştur ve bu miRNA'ların anormal ekspresyonu, sıklıkla metabolik hastalıkların gelişiminde rol oynayan insülin direncine yol açabilir. Birkaç miRNA'nın (yani miR-93 ve miR-320) PCOS patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Y. Yang ve ark., 2018).

Yapılan bir çalışmada insülin direnci olan PCOS'lu sıçanların ovaryum dokularındaki miR-33b-5p ekspresyonu yüksek saptanmıştır. Bir diğer çalışmada da miR-33b ekspresyon seviyesi kontrollere kıyasla PCOS'lu hastaların granüloza hücrelerinde yüksek ekspresyonu bulunmuştur (Y. Li ve ark., 2019; Han ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda bu çalışmanın aksine genin ekspresyonu PCOS grubunda kontrol grubuna göre daha düşük ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Yapılan bir insan çalışmasında PCOS'lu hastalarda miR-140 ekspresyonu yüksek gözlenmiştir. Bu çalışmada miR-140 kaynaklı Ras süper ailesine ait olan RAB2A'nın inhibisyonu p-AKT'de artışa katkıda bulunmuş p-AKT'nin ifadesi RAB2A'nın yıkılmasıyla önemli ölçüde geri kazanılmıştır. Bu da granüloza hücrelerinde apoptozu engellemektedir (Xiong ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda ise bu çalışmaya ters olarak miR-140 ekspresyonu PCOS gruplarına göre PCOS+OI gruplarında oldukça fazla düşüş görülmüştür.

PCOS'lu hastaların foliküler sıvı örnekleri, kontrol grubunda gözlenene kıyasla miR-320 ve miR-132 ekspresyonunda önemli ölçüde azalma göstermiştir (Sang ve ark., 2013). MiR-320a çeşitli tümörlerin baskılayıcı genidir ve anormal ekspresyonu çoğunlukla malign tümörlerle ilişkilidir (Y. Zhang & Xu, 2021). MiR-320a'nın kadın üreme sistemindeki ekspresyon seviyesi oositlerin gelişimi ile yakından ilişkilidir ve ekspresyon seviyesinin normal olarak korunması oositlerin gelişimi için gerekli bir koşuldur ve daha olgun oositleri olan hastaların foliküler sıvısındaki miR-320a seviyesi daha yüksektir. miR-320, ovaryum gelişimi sırasında ovaryum granüloza hücre çoğalmasını ve östrojen salgılanmasını inhibe eder ve androjenlerin ve progesteronun salgılanmasını destekler (C. ling Zhang ve ark., 2017). PCOS hastalarının foliküler sıvısındaki miR-320 ekspresyon düzeyi normal kadınlarınkinden önemli ölçüde daha yüksekti. FSH miR-320a ekspresyonunu down regüle etmiştir (Sang ve ark., 2013; Scalici ve ark., 2016). Yapılan başka bir çalışmada, olgun oositlerin daha yüksek düzeyde miR-320a ile ilişkili olduğunu bildirdi (Scalici ve ark., 2016). Ancak miR-320a, PCOS-IR hastalarının serum ve FF'sinde sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha düşük seviyelerde eksprese edildi (Sang ve ark., 2013). Benzer şekilde, miRNA-320'nin serum seviyesi de diyabetik popülasyonda ve adipositlerde azalmıştır ve çalışmalar miR-320a'nın insülin PI3K sinyal yolu yoluyla insülin duyarlılığını azaltabileceğini öne sürmüştür; bu nedenle miRNA-320 IR'nin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. PCOS hastalarının FF'sindeki düşük miRNA-320 ekspresyon seviyelerinin RAB5B gen ekspresyonunu etkileyebileceğini varsayabiliriz. miR-320 ayrıca IRS ekspresyonunu azaltabilir ve IR'ye yol açabilecek hücre dışı düzenlenmiş protein kinaz (ERK1/2) yolunun fosforilasyonunu inhibe edebilir. Bazı çalışmalar farklı miRNA ekspresyon sonuçları bulmuştur. Araştırma, FF'de miRNA-320'nin yukarı regülasyonunun, PCOS'lu kadınlarda bulunan hiperandrojenemiye, FF'ye estradiol salınımının inhibisyonuna neden olan E2F1/SF-1 proteinlerinin aşağı regülasyonu yoluyla potansiyel olarak açıkladığını bildirmiştir. Ek olarak miR-320 *in vivo* testosteron sekresyonunu artırır. Bu sonuçlar, yüksek miR-320 düzeylerinin PCOS hastalarında hiperandrojeneminin kısmi nedeni olabileceğini göstermektedir. Yapılan miR-320'nin, E2 salınımının ve hücre çoğalmasının negatif bir düzenleyicisi ve *in vivo* ve *in vitro* E2F1 ve SF-1 ekspresyonunu inhibe ederek GC'lerde progesteronun pozitif bir düzenleyicisi olarak işlev gördüğünü gösterdi (Yin ve ark., 2014). miR-320'nin aşırı ekspresyonu östradiol salınımının artmasına neden olmuştur. miR-320, artan serum testosteron düzeyi ile pozitif olarak ilişkilidir (Abdalla ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda PCOS hastalarında T, E2

ekspresyonu artması ve miR-320a ekspresyonunun yüksekliği önceki çalışmalarla korelasyon göstermiştir. PCOS+OI gruplarında miR-320a ekspresyonunun daha düşük bulunması indüksiyonun hormonlar ile birlikte miR-320a üzerinden etkili olduğu bize düşündürdü.

Çalışmalar miR-378a'nın enerji ve glukoz homeostazisinin önemli bir düzenleyicisi olduğunu ve metabolik bozuklukların iyileştirilmesinde potansiyel bir hedef olduğunu göstermiştir (Sun ve ark., 2022). Hiperandrojenik PCOS hastalarının serumunda artan miR-378a-5p PI3 kinazın katalitik alt birimini hedef alarak hepatik insülin direncine neden olur (Anja E. Sørensen ve ark., 2019). Yapılan bir çalışmada miR-378'in düşük ekspresyonunun FSH salınımı ile ilişkili olduğu FSH'in düşük ekspresyonu foliküler farklılaşmaya aracılık ettiği saptanmıştır (Toms & Guelph, 2014). miR-378-3p'nin önemli düzeyde up regülasyonu, ovaryumdaki primordiyal foliküllerin yoğunluğunu artırır. Oksidatif strese yanıt olarak artan otofaji seviyesini indükler ve gelişen foliküllerdeki apoptotik olayları geciktirir. Yapılan bir çalışmada rekombinant folikül uyarıcı hormon (rFSH) ile tedavi edilenler için insan menopozal gonadotropini (hMG) ile tedavi edilen hastalardan alınan havuzlanmış numunelerde FF miR-202-5p'nin önemli ölçüde daha düşük bolluk seviyesi ve daha yüksek FF miR-378-3p bolluk seviyeleri rapor edildi. Verilerimiz, miR-378-3p ekspresyonunun önemli ölçüde yukarı doğru düzenlendiğini gördük (Khan ve ark., 2021). miR-378'in aşırı ekspresyonu, aromataz enzimini aşağı regüle eder ve dolayısıyla GC'lerde östrojen sentezini azaltır (Abdalla et al., 2020).

Yapılan bir çalışmada korpus luteum bakımının orta ve geç aşamalarında korpus luteumda yüksek seviyelerde miR-378 ve IFNGR1 mRNA'yı, ancak gerileyen korpus luteumda çok daha düşük miR-378 seviyelerini doğruladı (McGinnis ve ark., 2015). Bu çalışma ile paralel olarak bizim çalışmamızda PCOS grubunda istatistiksel olarak anlamlı miR-378 ekspresyonunun düşüklüğü saptandı. PCOS+OI grubunda yüksek FSH ile birlikte miR-378 ekspresyonunun oldukça düşük olması bu genin granüloza hücrelerindeki hormon reseptörlerini etkilediği görüldü.

miR-451a'nın PI3K/AKT/mTOR yolağının birden fazla unsurunu hedef alarak bir tümör baskılayıcı olarak hareket eden hücre döngüsünün kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir (Díaz ve ark., 2020). miR-451a yukarı regülasyonunun, PCOS'ta anormal folikül gelişiminin altında yatan neden olabilecek GC proliferasyonunu inhibe edebileceğini gösterdi (T. Yang ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda ise miR-451a

ekspresyonu diğer çalışmalarla uyumludur. Fakat PCOS+OI grubunda istatistiksel olarak anlamlı 11 kat artış saptanmıştır.

Metforminin PCOS patogenezindeki etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada PCOS'un PI3K/AKT yolağı hedef genleri, miRNA486-5p ve miRNA483-5p ile ilişkisini incelemek için yapılmıştır. PCOS grubunda miRNA486-5p ve miRNA483-5p'de anlamlı bir azalma vardı; miRNA486-5p ile PI3K arasında anlamlı negatif korelasyon ve miRNA483-5p ile ERK arasında anlamlı negatif korelasyon vardı. Metformin tedavisi, incelenen miRNA'da önemli bir artışa, PI3K/AKT hedef genlerinde anlamlı bir düşüğe neden olduğu bulundu (Omar ve ark., 2023). Yapılan bir diğer çalışmada PCOS dokularında MicroRNA-486-5p ekspresyonu normal dokulara göre anlamlı derecede düşüktü (Han ve ark., 2019). Bizim çalışmamız PCOS grubunda istatistiksel anlamlı miR-486-5p ekspresyonu düşük saptanırken PCOS+OI grubunda bu azalma 7 kat olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlıydı.

Letrozol ile PCOS oluşturulan bir sıçan çalışmasında çok ince granüloza hücreleri içeren ve oosit içermeyen çok sayıda subkapsüler foliküler kist saptandı. SeNP'ler ve MET ile tedavi kalın granüloza hücrelerine ve normal foliküllere sahip daha küçük kistler görüldü (Rabah ve ark., 2023). Bizim çalışmamızda PCOS'da ovaryum dokusunda kistik foliküller belirgindi. Gelişim sürecindeki foliküllerin bir çoğunda dejenerasyon izlendi. Ovulasyon indüksiyonu PCOS grubundan farklı olarak granüloza hücrelerinin görüntüleri kontrol grubuna benzemektedir. Primordiyal, primer ve atretik folikül sayısı ovulasyon indüksiyonunda daha az olmasına rağmen sekonder ve tersiyer folikül sayısı PCOS grubuna göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

PCOS'lu hastalarda, Villavicencio ve arkadaşları, endometriyal epitel hücrelerinde, hücre döngüsünün kontrolden çıkmasına neden olan, endometriyal epitelyal atipik hiperplazi ve hatta endometriyal karsinom ile sonuçlanan down stream hedef proteini Akt'nin aşırı fosforilasyonunu buldu (Villavicencio ve ark., 2009).

Son yıllarda PCOS hastalarında IR'yi iyileştirmek için PI3K sinyal yolunun etki mekanizması ile ilgili çalışmalar giderek rapor edilmektedir. Melatonin, insülin reseptör substratı 1 (IRS-1) ve glikoz taşıyıcı protein 4'ün (GLUT4) ekspresyonunu önemli ölçüde artırdı, PCOS hastalarında glikoz alımını iyileştirdi, p-PI3K ve p-Akt seviyelerini artırdı ve PI3K/Akt sinyal yolu aracılığıyla insan ovaryum granüloza hücrelerinde (GC'ler) ve palmitik asit (PA) ile indüklenen hücrelerde IR'yi azaltmıştır (Kumariya ve ark., 2021).

Gong ve ark. yaptığı çalışmada bir grup PCOS-GH grubu olarak kontrollü over stimülasyonu (COS) sırasında GH (growth hormone) tedavisi aldı; diğer grup PCOS-C grubu olarak GH tedavisi almadı. PCOS-GH grubunun GC'lerinde FOXO1'in mRNA ve protein seviyeleri PCOS-C grubundakilerden anlamlı derecede düşüktü ($P < 0,05$); pPI3K/PI3K, p-Akt/Akt ve p-FOXO1'in protein seviyeleri PCOS-C grubundakilerden anlamlı derecede yüksekti ($P < 0,05$). IVF uygulanan PCOS'lu hastaların GC'lerinde OS, mitokondriyal disfonksiyon, apoptoz ve aşağı regüle PI3K/Akt sinyalinin varlığını göstermiştir (Gong ve ark., 2020).

DHEA ile PCOS oluşturulan bir sıçan çalışmasında p-Akt, PI3K ve p-mTOR ifade düzeylerinin tümü önemli ölçüde azalmıştır (Xie ve ark., 2021).

PCOS'un önemli bir özelliği, ovaryum foliküllerinin baskın foliküllere dönüşmemesi ve çok sayıda küçük folikül oluşturmamasıdır. PI3K-Akt sinyal yolu, ovaryum folikülü gelişiminde de rol oynar. Li ve arkadaşları, insan ovaryum dokusunu kullandılar ve Western blot ile bölünmüş kaspaz 3'ün azaldığını ve çoğalan hücre nükleer antijeninin (PCNA) arttığını buldular. Mevcut veriler, PI3K-Akt sinyal yolunun esas olarak ovaryum GC'sini etkilediğini doğrulamaktadır. Birçok bilim adamı, memeli hücrelerini kullanarak, PI3K-Akt sinyal yolunun ovaryum kistlerinin oluşumu ile ilgili olduğunu buldu. Li ve arkadaşları, PI3K katalitik alt biriminin p110d izoformunun, ovaryum GC'lerinde hem FSH hem de E2 ile uyarılan foliküler büyüme için PI3K yolunun önemli bir bileşeni olduğunu buldu. PI3K-Akt sinyal yolunun diğer aşağı akış molekülleri foliküler gelişim ile ilgiliydi. Adhikari ve arkadaşları, PTEN'in foliküler aktivasyonu inhibe ettiğini belirtti. Ayrıca rapamisin kompleksi 1 (mTORC1) sinyal yolunun Tsc memeli hedefinin ve PTEN-PI3K sinyal yolunun ilkel foliküllerin uyku halini ve aktivasyonunu düzenlediğini buldular. Sun ve arkadaşları, PI3K sinyal yolunun ovaryum korteksi üzerinde etkili olduğunu gösterdi. mTOR ve PI3K stimülasyonu kullanıldığında foliküller gelişti. Ayrıca ikisi birlikte kullanıldığında folikül gelişiminin etkisi arttı. Qu ve arkadaşları, PCOS'lu hastaların GC'lerini kullandı. AQP-9 haberci RNA (mRNA) seviyelerinin GC'lerde önemli ölçüde daha düşük olduğunu ve toplam testosteron ve seks hormonu bağlayıcı globulin seviyeleri ve serbest androjen indeksi ile ilişkili olduğunu gösterdiler. AQP-9'un inhibisyonu, PI3K-Akt sinyal yolu yoluyla hiperandrojenizme neden oldu. Fukuda ve arkadaşları, PI3K-Akt sinyal yolunun androjen üretimi ile ilişkili olduğunu gösterdi. LH ile uyarılan CYP17A1 mRNA ekspresyonundan sonra, sığır TC'sindeki androjen, PI3K-Akt sinyal yolunu aktive etti. Ayrıca, hem PI3K-Akt hem de MAPK sinyal yollarının

androjen üretimini etkilediğini bulmuşlar ve PI3K-Akt sinyal yolunun mekanizmasının PCOS'un patofizyolojisi olduğuna inanmışlardır. (T. Li ve ark., 2017)

Otofaji, granüloza hücrelerinin apoptozunu ve/veya otofajik hücre ölümünü indükleyerek foliküler atreziye katkıda bulunur. MAPK8'in aktivasyonu, apoptotik protein BCL2'nin fosforilasyonu ile otofajiyi tetikler. Fosforile edilmiş BCL2, otofaji proteini BECN1'den ayrılır ve otofajiyi destekler. FSH hormonu, PI3K-AKT-MTOR yolu aktivasyonu ve mitofaji yoluyla otofajiyi inhibe ederek oksidatif stres hasarını önler (Kumariya ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda PCOS grubunda yapılan immünohistokimyasal çalışmada PI3K/AKT yolağının foliküllerdeki ekspresyonu diğer gruplara göre düşüş göstermiştir. PCOS+OI grubunda PI3K/AKT ekspresyonunun artması, bu indüksiyonunun granüloza hücre proliferasyonunu ve apoptozisi inhibe ederek olumlu yönde etkilediğini düşündürdü.

6. SONUÇ

Ovulasyon indüksiyonu, PCOS deneysel sıçan modelinde miR-140, 378 ve 486 ekspresyonunu azaltıp, miR-451 ekspresyonunu arttırarak, PI3K/AKT sinyal yolağını aktive etmiştir. Bu yolağın aktivasyonu granüloza hücre apoptozisini ve otofajik hücre ölümünü inhibe etmiş olup foliküler atreziyi önlemeye yardımcı olmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Abdalla, M., Deshmukh, H., Atkin, S. L., & Sathyapalan, T. (2020). miRNAs as a novel clinical biomarker and therapeutic targets in polycystic ovary syndrome (PCOS): A review. *Life Sciences*, 259. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118174>
- Beringer, M., & Rodnina, M. V. (2007). The Ribosomal Peptidyl Transferase. *Molecular Cell*, 26(3), 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.015>
- Boyd, S. D. (2008). Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory Investigation*, 88(6), 569–578. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.32>
- Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P., & Pasquinelli, A. E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(10), 1586–1594. <https://doi.org/10.1261/RNA.7122604>
- Brakta, S., Lizneva, D., Mykhalchenko, K., Imam, A., Walker, W., Diamond, M. P., & Azziz, R. (2017). Perspectives on Polycystic Ovary Syndrome: Is Polycystic Ovary Syndrome Research Underfunded? *J Clin Endocrinol Metab*, 102(12), 4421–4427. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01415>
- Bu, X., Zhang, J., Tian, F., Wang, X., Wu, L., & Tian, W. (2018). Value of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging Combined with miR-18a Level in Predicting Radiosensitivity of Cervical Cancer. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 7271. <https://doi.org/10.12659/MSM.910990>
- Çakir, E., Topaloğlu, O., Çolak Bozkurt, N., Karbek Bayraktar, B., Güngüneş, A., Sayki Arslan, M., Öztürk Ünsal, I., Tural, E., Uçan, B., & Delibaşı, T. (2014). Insulin-like growth factor 1, liver enzymes, and insulin resistance in patients with PCOS and hirsutism. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 44(5), 781–786. <https://doi.org/10.3906/SAG-1303-80>
- Caldwell, A. S. L., Middleton, L. J., Jimenez, M., Desai, R., McMahan, A. C., Allan, C. M., Handelsman, D. J., & Walters, K. A. (2014). Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology*, 155(8), 3146–3159. <https://doi.org/10.1210/EN.2014-1196>
- Chugh, R. M., Park, H. soo, El Andaloussi, A., Elsharoud, A., Esfandyari, S., Ulin, M., Bakir, L., Aboalsoud, A., Ali, M., Ashour, D., Igboeli, P., Ismail, N., McAllister, J., & Al-Hendy, A. (2021). Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10.

Stem Cell Research and Therapy, 12(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02472-w>

- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Cortez, M. A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K., & Calin, G. A. (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 8(8), 467–477. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2011.76>
- Díaz, M., Bassols, J., López-Bermejo, A., De Zegher, F., & Ibáñez, L. (2020). Low Circulating Levels of miR-451a in Girls with Polycystic Ovary Syndrome: Different Effects of Randomized Treatments. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 105(3). <https://doi.org/10.1210/CLINEM/DGZ204>
- Ekizceli, G., İnan, S., Öktem, G., Onur, E., Özbilgin, K., Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, C., ve Embriyoloji Anabilim Dalı, H., Üniversitesi Tıp Fakültesi, U., Üniversitesi Tıp Fakültesi, E., & Biyokimya Anabilim Dalı, T. (2015). Sıçanlarda Östrus Döngüsü ile İlişkili Ovaryum ve Uterusların Histolojik Değerlendirmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 41(2), 65–72. <https://dergipark.org.tr/pub/uutfd/issue/35303/391872>
- Flynt, A. S., & Lai, E. C. (2008). Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature Reviews. Genetics*, 9(11), 831–842. <https://doi.org/10.1038/NRG2455>
- Garolla, A., Pizzol, D., Carosso, A. R., Borini, A., Ubaldi, F. M., Calogero, A. E., Ferlin, A., Lanzone, A., Tomei, F., Engl, B., Rienzi, L., De Santis, L., Coticchio, G., Smith, L., Cannarella, R., Anastasi, A., Menegazzo, M., Stuppia, L., Corsini, C., & Foresta, C. (2021). Practical Clinical and Diagnostic Pathway for the Investigation of the Infertile Couple. *Frontiers in Endocrinology*, 11(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.591837>
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (n.d.). *The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies*. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- Gong, Y., Luo, S., Fan, P., Zhu, H., Li, Y., & Huang, W. (n.d.). Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00677-x>
- Han, X. M., Tian, P. Y., & Zhang, J. L. (2019). Han, X. M., Tian, P. Y., & Zhang, J. L. (2019). MicroRNA-486-5p inhibits ovarian granulosa cell proliferation and participates in the development of PCOS via targeting MST4. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(17), 7217–7223. http://www.eurpub.com/doi/10.26355/EURREV_201909_18823
- Hino, C., Ueda, J., Funakoshi, H., & Matsumoto, S. (2020). Defined oocyte collection time is critical for reproducible in vitro fertilization in rats of different strains. *Theriogenology*, 144, 146–151.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.006>

- Kamalidehghan, B., Habibi, M., Afjeh, S. S., Shoai, M., Alidoost, S., Ghale, R. A., Eshghifar, N., & Pouresmaeili, F. (2020). The Importance of Small Non-Coding RNAs in Human Reproduction: A Review Article. *The Application of Clinical Genetics*, *13*, 1–11. <https://doi.org/10.2147/TACG.S207491>
- Khan, H. L., Bhatti, S., Abbas, S., Kaloglu, C., Isa, A. M., Younas, H., Ziders, R., Khan, Y. L., Hassan, Z., Turhan, B. O., Yildiz, A., Aydin, H. H., & Kalyan, E. Y. (2021). Extracellular microRNAs: key players to explore the outcomes of in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-021-00754-9>
- Kumariya, S., Ubba, V., Jha, R. K., & Gayen, J. R. (2021). Autophagy in ovary and polycystic ovary syndrome: role, dispute and future perspective. *Autophagy*, *17*(10), 2706. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1938914>
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., ... Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, *129*(7), 1401–1414. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.04.040>
- Li, D., Li, C., Xu, Y., Xu, D., Li, H., Gao, L., Chen, S., Fu, L., Xu, X., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, J., Ming, H., & Zheng, L. (2016). Differential Expression of microRNAs in the Ovaries from Letrozole-Induced Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *DNA and Cell Biology*, *35*(4), 177–183. <https://doi.org/10.1089/dna.2015.3145>
- Li, S. Y., Song, Z., Song, M. J., Qin, J. W., Zhao, M. L., & Yang, Z. M. (2016). Impaired receptivity and decidualization in DHEA-induced PCOS mice. *Scientific Reports*, *6*(November), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep38134>
- Li, T., Mo, H., Chen, W., Li, L., Xiao, Y., Zhang, J., Li, X., & Lu, Y. (2017). Role of the PI3K-Akt Signaling Pathway in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reproductive Sciences*, *24*(5), 646–655. <https://doi.org/10.1177/1933719116667606>
- Li, Y., Xiang, Y., Song, Y., Wan, L., Yu, G., & Tan, L. (2019). Dysregulated miR-142, -33b and -423 in granulosa cells target TGFBR1 and SMAD7: a possible role in polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction*, *25*(10), 638–646. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAZ014>
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., & Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, *433*(7027), 769–773. <https://doi.org/10.1038/NATURE03315>
- Lujan, M. E., Chizen, D. R., & Pierson, R. A. (2008). Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome: Pitfalls and Controversies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada : JOGC*, *30*(8), 671. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)32915-2](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)32915-2)
- Luo, Y., Cui, C., Han, X., Wang, Q., & Zhang, C. (2021). The role of miRNAs in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *38*(2), 289–304. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02019-7>

- Ma, M., Guo, L., Liu, X., Zheng, Y., Gu, C., & Li, B. (2022). Genetic correlation between female infertility and mental health and lifestyle factors: A linkage disequilibrium score regression study. *Health Science Reports*, 5(5), 1–7. <https://doi.org/10.1002/hsr2.797>
- Macdonald, J. K., Pyle, W. G., Reitz, C. J., & Howlett, S. E. (2014). *Cardiac contraction, calcium transients, and myofilament calcium sensitivity fluctuate with the estrous cycle in young adult female mice*. January. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00730.2013>
- Makker, A., Goel, M. M., Das, V., & Agarwal, A. (2012). PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: An update. *Gynecological Endocrinology*, 28(3), 175–181. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.583955>
- McGinnis, L. K., Luense, L. J., & Christenson, L. K. (2015). MicroRNA in Ovarian Biology and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A022962>
- Naji, M., Aleyasin, A., Nekoonam, S., Arefian, E., Mahdian, R., & Amidi, F. (2017). Differential Expression of miR-93 and miR-21 in Granulosa Cells and Follicular Fluid of Polycystic Ovary Syndrome Associating with Different Phenotypes. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-13250-1>
- Omar, H. S., Ibrahim, O. A., sayed, M. G., Faruk, E. M., Fouad, H., & safwat, M. (2023). Non-coding RNA genes modulate PI3K/AKT signaling pathway in polycystic ovary syndrome. *Molecular Biology Reports*, 50(10), 8361–8372. <https://doi.org/10.1007/S11033-023-08604-0>
- Pisarska, M. D., Chan, J. L., Lawrenson, K., Gonzalez, T. L., & Wang, E. T. (2019). *Genetics and Epigenetics of Infertility and Treatments on Outcomes*. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01869>
- Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., MacDonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., & Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 432(7014), 226–230. <https://doi.org/10.1038/NATURE03076>
- Rabah, H. M., Mohamed, D. A., Mariah, R. A., Abd El-Khalik, S. R., Khattab, H. A., AbuHashish, N. A., Abdelsattar, A. M., Raslan, M. A., Farghal, E. E., & Eltokhy, A. K. (2023). Novel insights into the synergistic effects of selenium nanoparticles and metformin treatment of letrozole - induced polycystic ovarian syndrome: targeting PI3K/Akt signalling pathway, redox status and mitochondrial dysfunction in ovarian tissue. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 28(1). <https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2160569>
- Sang, Q., Yao, Z., Wang, H., Feng, R., Wang, H., Zhao, X., Xing, Q., Jin, L., He, L., Wu, L., & Wang, L. (2013). Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(7), 3068–3079. <https://doi.org/10.1210/JC.2013-1715>
- Scalici, E., Traver, S., Mullet, T., Molinari, N., Ferrières, A., Brunet, C., Belloc, S., & Hamamah, S. (2016). Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to

- explore in vitro fertilization process. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP24976>
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1186/GB-2004-5-3-R13>
- Sirmans, S. M., & Pate, K. A. (2013). Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Epidemiology*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37559>
- Sørensen, Anja E., Udesen, P. B., Maciag, G., Geiger, J., Saliani, N., Januszewski, A. S., Jiang, G., Ma, R. C., Hardikar, A. A., Wissing, M. L. M., Englund, A. L. M., & Dalgaard, L. T. (2019). Hyperandrogenism and Metabolic Syndrome Are Associated With Changes in Serum-Derived microRNAs in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Medicine*, 6. <https://doi.org/10.3389/FMED.2019.00242>
- Sørensen, Anja Elaine, Wissing, M. L., Salö, S., Englund, A. L. M., & Dalgaard, L. T. (2014). MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes*, 5(3), 684–708. <https://doi.org/10.3390/GENES5030684>
- Sun, Z., Wang, Y., Wei, T., & Liu, L. (2022). Identification of key genes and miRNAs related to polycystic ovary syndrome by comprehensive analysis of microarray. *BMC Medical Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12920-022-01384-9>
- Tanbo, T., Mellembakken, J., Bjercke, S., Ring, E., Åbyholm, T., & Fedorcsak, P. (2018). Ovulation induction in polycystic ovary syndrome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 97(10), 1162–1167. <https://doi.org/10.1111/aogs.13395>
- Teng, Y. L., Lin, S. Y., Yang, H. Y., Meng, L. H., Yu, R., & Zeng, L. C. (2019). Effect of microRNA-409 on the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(5), 1874–1881. https://doi.org/10.26355/eurev_201903_17222
- Toft, G., Guldbrandsen, K., & Olsen, J. (2014). Moderate alcohol intake and menstrual cycle characteristics. 29(2), 351–358. <https://doi.org/10.1093/humrep/det417>
- Toms, D. D., & Guelph, C. (2014). *Involvement of GDNF and microRNA-378 in the regulation of porcine follicle maturation*. <http://hdl.handle.net/10214/8305>
- Villavicencio, A., Goyeneche, A., Telleria, C., Bacallao, K., Gabler, F., Fuentes, A., & Vega, M. (2009). Involvement of Akt, Ras and cell cycle regulators in the potential development of endometrial hyperplasia in women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecologic Oncology*, 115(1), 102–107. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2009.06.033>
- Westwood, F. R. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375–384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- Xie, F., Zhang, J., Zhai, M., Liu, Y., Hu, H., Yu, Z., Zhang, J., Lin, S., Liang, D., & Cao, Y. (2021). Melatonin ameliorates ovarian dysfunction by regulating autophagy in PCOS via the PI3K-Akt pathway. *Reproduction*, 162(1), 73–82. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0643>

- Xiong, Z., Li, B., Wang, W., Zeng, X., Li, B., Jian, S., & Wang, L. (2020). MiR-140 targets RAP2A to enable the proliferation of insulin-treated ovarian granulosa cells. *Journal of Ovarian Research*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/S13048-020-0611-4>
- Yang, H., Kim, H. J., Pyun, B.-J., & Lee, H. W. (2018). Licorice ethanol extract improves symptoms of polycystic ovary syndrome in Letrozole-induced female rats. *Integrative Medicine Research*, *7*(3), 264–270. <https://doi.org/10.1016/J.IMR.2018.05.003>
- Yang, T., Wang, L., Zhang, Y., Zheng, J., & Liu, L. (2021). MicroRNA-451a plays a role in polycystic ovary syndrome by regulating ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *21*(6). <https://doi.org/10.3892/ETM.2021.10015>
- Yang, Y., Jiang, H., Xiao, L., & Yang, X. (2018). MicroRNA-33b-5p is overexpressed and inhibits GLUT4 by targeting HMGA2 in polycystic ovarian syndrome: An in vivo and in vitro study. *Oncology Reports*, *39*(6), 3073–3085. <https://doi.org/10.3892/OR.2018.6375>
- Yazarı Doç Hulusi Bülent Zeyneloolu, K., Doç Mesut Öktem Yazıma adresi Baakent Üniversitesi, Y., & Hastalıkları ve, K. (n.d.). *POLLKKSTTK OVER SENDROMUNDA OVULASYON NNDÜKSSYONU*.
- Yığıt, A. A. (n.d.). *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Derleme / Review Dışı Ratlarda Üreme Fizyolojisi. 1*, 27–29.
- Yin, M., Wang, X., Yao, G., Lü, M., Liang, M., Sun, Y., & Sun, F. (2014). *Transactivation of MicroRNA-320 by MicroRNA-383 Regulates Granulosa Cell Functions by Targeting E2F1 and SF-1 Proteins* *. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546044>
- Yu, J., Zhai, D., Hao, L., Zhang, D., Bai, L., Cai, Z., & Yu, C. (2014). Cryptotanshinone Reverses Reproductive and Metabolic Disturbances in PCOS Model Rats via Regulating the Expression of CYP17 and AR. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/670743>
- Zhang, C. ling, Wang, H., Yan, C. you, Gao, X. feng, & Ling, X. juan. (2017). Deregulation of RUNX2 by miR-320a deficiency impairs steroidogenesis in cumulus granulosa cells from polycystic ovary syndrome (PCOS) patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *482*(4), 1469–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.059>
- Zhang, Y., & Xu, L. (2021). Preliminary study of Yulin mixture affecting the miR-320/SF-1/Cyp19a1 on mouse polycystic ovary syndrome model. *Gynecological Endocrinology*, *37*(6), 546–553. <https://doi.org/10.1080/09513590.2020.1843623>
- Zhou, Y., Lv, L., Liu, Q., & Song, J. (2019). Total flavonoids extracted from *Nervilia Fordii* function in polycystic ovary syndrome through IL-6 mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. *Bioscience Reports*, *39*(1), 20181380. <https://doi.org/10.1042/BSR20181380>
- Zhou, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, J., Yi, G., Wan, B., Li, Y., Lu, H., Tan, C., & Lu, W. (2023). Follicular Fluid-Derived Small Extracellular Vesicles Alleviate DHEA-Induced Granulosa Cell Apoptosis by Delivering LINC00092. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *30*(10), 3092–3102.

<https://doi.org/10.1007/S43032-023-01251-7>

EKLER

Ek 1. Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 05.09.2022-E.251585



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-251585
Konu : Başvurumuz hk.

Sayın Doç. Dr. Nazlı ÇİL

İlgi : 29/08/2022 tarihli dilekçeniz. 172.16.70.110
2457
5.09.2022

Ovulasyon İndüksiyonunun, Polikistik Over Sendromu oluşturulan sıçanlardaki, Pı3K/Akt Sinyal Yolağına ve miRNA Ekspresyonuna Etkisi* (PAUHADYEK-2022/30) konulu çalışmanızda istenilen değişiklik talebiniz 01.09.2022 tarih ve 2022/07 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup, Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 24 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim

Prof. Dr. Gülçin METE
Başkan

