



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

**MELATONİN POLİKİSTİK OVER SENDROMUNA
BAĞLI İNFERTİLİTEDE YENİ BİR UMUT OLABİLİR
Mİ? DENEYSEL BİR ÇALIŞMA**

GÖKÇE NUR YÜCEL

HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2018



**MELATONİN POLİKİSTİK OVER SENDROMUNA BAĞLI
İNFERTİLİTEDE YENİ BİR UMUT OLABİLİR Mİ? DENEYSEL BİR
ÇALIŞMA**

Gökçe Nur YÜCEL

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

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2018

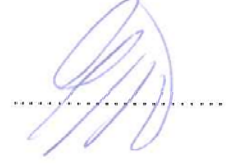
Gökçe Nur YÜCEL tarafından hazırlanan “ Melatonin Polikistik Over Sendromuna Bağlı İnfertilitede Yeni Bir Umut Olabilir Mi? Deneysel bir Çalışma” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji ABD, Gazi Üniversitesi

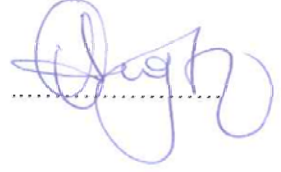
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

Histoloji ve Embriyoloji ABD, Gazi Üniversitesi

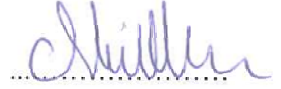
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Doç. Dr. Ayten TÜRKKANI

Histoloji ve Embriyoloji ABD, TOBB ETÜ

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Sayınma Tarihi: 24/07/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gökçe Nur YÜCEL

04.01/2018

MELATONİN POLİKİSTİK OVER SENDROMUNA BAĞLI İNFERTİLİTEDE YENİ BİR UMUT OLABİLİR Mİ? DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

(Yüksek Lisans Tezi)

Gökçe Nur YÜCEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2018

ÖZET

Polikistik over sendromu (PKOS) %6-8 prevalansı ile üreme periyodundaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur. Prevalansına rağmen etiyolojik koşulları tam olarak anlaşılmamıştır. Melatoninin PCOS patofizyolojisinde önemli bir rol aldığı önerilmiştir. Epifiz bezinden salgılanan temel hormon olan melatonin, memelilerde sirkadiyen ritimi, uyku ve üreme değişimlerini düzenlemektedir ve farklı dokularda oksidatif stres ve hücre ölümlerine karşı koruyucu bir ajan olarak tanımlanmıştır. Sirkadiyen ritimi kontrol etmesinin yanı sıra melatonin, reaktif oksijen ve nitrojenleri nötralize eder ve immün sistemi sistemi aktive eder. Bu nedenle, melatonin ovaryum fonksiyonuna direk etki eder. Ovaryumda melatonin etkisine, Melatonin 1 reseptörü aracılık eder. Çalışmalarda, PKOS'un patofizyolojisi ve etiyoloji üzerinde MT reseptör genlerinin önemli bir rolü olduğu önerilmiştir. GDF 9 ve BMP 15 içeren farklı büyüme faktörleri PKOS'un olası etki mekanizmalarını etkilemektedirler. Çalışmamızın amacı, ekzojen melatoninin MT1 reseptörü ve GDF 9, BMP 15 parakrin sinyal molekülleri üzerine etkisinin ratlardaki PKOS modelinde belirlemektir. Letrozol, non-aromataz enzim inhibitörüdür. Aromataz, PKOS indüksiyonunda östrojen sentezleyen enzimdir. Çalışmamızda letrozol ratlarda PKOS'u indüklemek için kullanıldı. Deneyde 6-8 haftalık 32 dişi *Sprague Dawley* rat türü, eşit 4 gruba ayrıldı (n=8). 1. Grup: Sham kontrol (%1 CMC/gün/ 3 hafta), 2. Grup: Melatonin uygulanan grup (2mg/kg/gün/3 hafta,%1 CMC/gün/ 3 hafta), 3. Grup: Deneysel PKOS grubu (1mg/kg/gün/3 hafta Letrozol), 4.Grup: Deneysel PKOS+ melatonin (1mg/kg/gün/3 hafta Letrozol + 2mg/kg/gün/3 hafta melatonin). Süre bitiminde alınan ovaryum dokuları % 10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildi, rutin ışık mikroskopik takip prosedüründen sonra, parafin bloklar oluşturuldu. Parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler için Hematoksilen Eozin boyama uygulandı. Eksojen melatoninin MT1 reseptörüne, GDF 9 ve BMP 15 parakrin sinyal moleküllerine etkisini incelemek için de immunohistokimya protokolü uygulandı. Preparatlar, Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, mikroskop altında değerlendirildi ve sisteme bağlı Leica Q Vin 3 programında resimlendirildi. Son olarak, eksojen melatoninin, GDF 9, BMP 15 ve MT1, üzerine etkisini incelemek için, RT-PCR ve western blot metodu uygulandı. Sonuç olarak melatoninin PKOS'ta GDF 9 yolağı üzerinde daha etkili olabileceği kanısına varılmıştır.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : PKOS, MT1, Melatonin, GDF 9, BMP 15

Sayfa Adedi : 115

Danışman : Prof. Dr.Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

IS MELATONIN POSSIBLY THE NEW HOPE IN PCOS-RELATED INFERTILITY?

AN EXPERIMENTAL STUDY

(M. Sc. Thesis)

Gökçe Nur YÜCEL

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2018

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women of reproductive age with a 6-8 % prevalence. Despite its prevalence, the etiology of PCOS is still poorly understood. It has been suggested that the hormone melatonin might play an important role in the pathophysiology of PCOS. Melatonin, the principal hormone of the pineal gland, regulates mammalian circadian rhythms, sleep, and reproductive cycles and it has been described as a protective agent against cell death and oxidative stress in different tissues. In addition to controlling circadian rhythms, melatonin neutralizes reactive oxygen and nitrogen, and activates the immune system. Thus, melatonin has a direct effect on ovarian function. The function of melatonin in ovary is mainly mediated by melatonin receptor 1. Studies suggest that MT1 genes play an important role in the etiology and pathophysiology of PCOS. Different growth factors including GDF 9 and BMP 15 are associated with PCOS. The purpose of our study is to determine the effects of exogenous melatonin on MT1 receptor and ovarian paracrine signal molecules GDF 9 and BMP 15 expressions in rat PCOS model. Letrozole is a non-steroidal aromatase inhibitor. Aromatase is an enzyme that synthesizes estrogen which induces PCOS. In our study Letrozole was used to induce PCOS in the rats. Thirty-two 6-8 week old female *Sprague Dawley* rats were randomly divided into 4 equal groups (n=8). Group 1: Sham control group (1% CMC/day for 3 weeks), group 2: melatonin-injected group (2mg/kg/day melatonin, 1% CMC/day for 3 weeks for 3 weeks), group 3: experimental PCOS group (1mg/kg/day letrozole for 3 weeks), group 4: experimental PCOS + melatonin-injected group (1mg/kg/day letrozole for 3 weeks + 2mg/kg/day melatonin for 3 weeks). Ovaries were removed and fixed in 10 % neutral buffered formalin for 72 hours. After routine light microscopic processing, tissues were embedded into paraffin blocks. 4-5 micron thick sections cut from the paraffin blocks. These sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Immunohistochemistry protocol was applied to investigate the effect of exogenous melatonin on MT1 receptor and GDF 9 and BMP 15 paracrine signal molecules. Preparations were evaluated with light microscope supported by Leica DCM 4000 (Germany) computer and photographed by Leica Q Vin 3 program connected to computer system. Finally, to examine the influence of exogenous melatonin on GDF 9, BMP 15 and MT1 receptor molecules, RT-PCR and western blot method used. As a result, it is concluded that melatonin may be more effective on GDF 9 pathway in PCOS.

Science Code : 1033

Key Words : PCOS, MT1, Melatonin, GDF9, BMP15

Page Number : 115

Advisor : Prof.Dr Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na yüksek lisans öğrenimim süresince hoşgörüsü, bilgisi ve desteği ile her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkürler. Anabilim dalımızda görev yapan saygı değer hocalarım Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na ve Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a, ve tez çalışmam süresince benden yardımını esirgemeyen başta Arş. Gör. Dr. Cemile Merve SEYMEN olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Teknisyen Recep ORHAN 'a, çalışmalarım sırasında bilgilerini ve desteğini asla esirgemeyen Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a ve Bilim Uzmanı Farmakolog Zübeyir ELMAZOĞLU'na, kıymetli eşim Gökberk YÜCEL ile eğitim öğretim hayatım süresince desteklerini her zaman hissettiren annem Gülsüm ARIK ile babam Ahmet ARIK , kardeşlerim İsmail ile Fatma ARIK'a ve 01/2017-13 BAP proje koduyla tez çalışmamı destekleyen üniversitemiz BAP birimine yürekten teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kD	Kilodalton
mg/kg	Miligram / kilogram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mMol/L	Milimol / litre
ng/ml	Nanogram / mililitre
rpm	Bir dakidaki dönüş
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ovaryum Gelişimi	5
2.2. Ovaryum Anatomisi	6
2.3. Ovaryum Histolojisi	7
2.4. Ovaryum Folikülleri ve Foliküler Gelişim.....	8
2.4.1. Primordial folikül.....	8
2.4.2. Primer folikül	8
2.4.3. Sekonder folikül	10
2.4.4. Graff folikülü	10
2.5. Ovulasyon.....	11
2.6. Luteal Faz	12
2.7. Folikülogenezis Fizyolojisi	13
2.7.1. Gdf9	14
2.7.2. Bmp15	15
2.7.3. Ovaryan steroidler	16

	Sayfa
2.8. Melatonin	17
2.8.1. Melatonin reseptörleri	18
2.8.2. Melatonin ve dişi üreme sistemi	18
2.8.3. Melatonin ve ovulasyon	19
2.9. Pkos Tarihi, Fizyolojisi ve Etiyolojisi	20
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Deney Hayvanları ve Uygulama	25
3.1.1. Letrozol hazırlanması ve uygulama biçimi	25
3.1.2. Melatonin	26
3.2. Deneyin Sonlandırılması	26
3.3. Histolojik Yöntem	26
3.3.1. Hematoksilen – eozin boyama	26
3.3.2. Folikül sayımı	27
3.3.3. İmmunohistokimyasal inceleme	28
3.3.4. H-skor analizi	29
3.4. Real-Time PCR	29
3.4.1. Rat ovaryum dokusundan total RNA saflaştırılması	29
3.4.2. Dokudan RNA izolasyonu	29
3.4.3. Revers transkriptaz PCR (Rt-PCR) yöntemi	30
3.4.4. Kantitatif real time PCR yöntemi	31
3.4.5. Ters transkriptaz PCR (RT-PCR) programı	31
3.4.6. Gen ifadenmesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi	32
3.4.7. BMP15, GDF9 ve MT1 genleri için Real-Time PCR tepkime karışımı ..	32
3.4.8. LightCycler® 480 deney programı	32
3.4.9. İstatistiksel analiz yöntemleri	33
3.5. Western Blot Yöntemi	34

Sayfa

3.5.1. Ovaryum doku örneklerinden total protein ekstraksiyonu.....	34
4. BULGULAR	37
4.1. Histolojik Bulgular	37
4.1.1. Vaginal smear bulguları	37
4.1.2. Hematoksilen – eozin bulguları	39
4.1.3. Folikül sayımı bulguları	56
4.1.4. İmmünohistokimyasal boyama bulguları.....	60
4.1.5. H Score bulguları	66
4.2. Real Time PCR Bulguları.....	72
4.3. Western Blot Bulguları.....	76
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	95
EKLER.....	111
EK-1. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Toplantı Katılım Listesi	112
EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası	113
EK-3. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı.....	114
ÖZGEÇMİŞ	115

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. 1990 NIH , Polikistik Over Sendromu Teşhis Kriterleri	21
Çizelge 2.2. 2003 Yılı Revize Edilmiş Polikistik Over Sendromu Kriterleri.....	21
Çizelge 2.3. 2006 Androgen Excess Society PKOS Kriterleri	21
Çizelge 3.1. Deney grupları ve uygulama sürelerini belirten tablo	25
Çizelge 3.2. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları	31
Çizelge 3.3. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	31
Çizelge 3.4. Spesifik Primer Dizileri ve UPL Prob Numaraları	32
Çizelge 3. 5. Real-time PCR tepkime karışımı	32
Çizelge 3.6. MT1, GDF9 ve BMP15 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı	33
Çizelge 4.1. Ratlarda siklus bölüm ve vajinal smear morfolojik özelliklerini içeren tablo	37
Çizelge 4.2. Sham grubuna ait döngü tablosu.....	38
Çizelge 4.3. Melatonin grubuna ait döngü tablosu	38
Çizelge 4.4. PKOS grubuna ait döngü tablosu	39
Çizelge 4.5. pkos+Melatonin grubuna ait döngü tablosu	39
Çizelge 4.6. Primordial folikül.....	57
Çizelge 4.7.Unilaminar folikül	58
Çizelge 4.8. Multilaminar folikül.....	59
Çizelge 4.9. Sekonder folikül.....	59
Çizelge 4.10. Tersiyer folikül	60
Çizelge 4.11. MT1 granüloza hücreleri H score değerleri.....	66
Çizelge 4.12. MT1 teka hücreleri H score değerleri.....	67
Çizelge 4.13. GDF9 Granüloza hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu	68

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.14. GDF9 Teka hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu	69
Çizelge 4.15. BMP15 Granüloza hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu	70
Çizelge 4.16. BMP15 Teka hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Şematik olarak bir ekran üzerine yerleştirilmiş tarafsız sayım çerçevesi görülüyor.....	27
Şekil 4.1. Primordial folikül.....	57
Şekil 4.2. Unilaminar folikül	58
Şekil 4.3. Multilaminar folikül.....	58
Şekil 4.4. Sekonder folikül.....	59
Şekil 4.5. Tersiyer folikül	60
Şekil 4.6. MT1 granüloza hücreleri H score değerleri; Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PKOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubu.....	66
Şekil 4.7. MT1 teka hücreleri H score değerleri; Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PKOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubu.....	67
Şekil 4.8. GDF9 granüloza hücrelerinde tutulum, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu.....	68
Şekil 4.9. GDF9 teka hücrelerinde tutulum , Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu	69
Şekil 4.10. BMP15 Granüloza hücrelerinde tutulum, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu.....	70
Şekil 4.11. BMP15 Teka hücrelerinde tutulum, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu.....	71
Şekil 4.12. Rat ovaryum dokusunda MT1 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik.	73
Şekil 4.13. Rat ovaryum dokusunda GDF9 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik.	74

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Rat ovaryum dokusunda BMP15 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik.	75
Şekil 4.15. Rat ovaryum dokusunda GDF9 ve BMP15 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik.....	76
Şekil 4.16. GDF 9 ve BMP 15 western blot analizi sonuçları	77

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. A; proöstro, B;östro, C;metaöstro, D;Diöstro	38
Resim 4.2. Sham kontrol grubu; (F): kortekte çeşitli gelişim evresindeki foliküller, (M): vaskülerize medulla normal yapıları ile izleniyor.....	41
Resim 4.3. Sham kontrol grubu; Normal yapıda primordiyal foliküller (P), multilaminar primer foliküller (MP) ve zona pellusida (→) izleniyor	42
Resim 4.4. Sham kontrol grubu; (SF): sekonder folikül, (→): zona pellusida, (*): oluşmaya başlamış antrum, (♠): teka interna ve eksterna normal yapıları ile görülüyor	43
Resim 4.5. Sham kontrol grubu; (GF): Graff folikülü, (G): granüloza hücre katmanı, (*): antrum, (♠): teka interna ve eksterna normal yapıları ile görülüyor	44
Resim 4.6. Melatonin grubu; (F): kortekte çeşitli gelişim evresindeki foliküller, (M): vaskülerize medulla, (◆): korteks ve medullada vasküler dilatasyon izleniyor.....	45
Resim 4.7. Melatonin grubu; (P): primordiyal folikül, (MP): multilaminar primer folikül, (→): zona pellusida, (◆): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem izleniyor.....	46
Resim 4.8. Melatonin grubu; (SF): sekonder folikül, (→): zona pellusida, (*): oluşmaya başlamış antrum, (◆): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem, (♠): teka interna ve eksterna görülüyor	47
Resim 4.9. Melatonin grubu; (GF): Graff folikülü, (G): granüloza hücre katmanı, (◆): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem, (*): antrum, (♠): teka interna ve eksterna izleniyor	48
Resim 4.10. PKOS grubu; (KF): kortekte çok sayıda kistik yapı sergileyen foliküller, (M): vaskülerize medulla, (◆): korteks ve medullada vasküler dilatasyon (❖): hilar hücre hiperplazisi görülüyor	49
Resim 4.11. PKOS grubu; (A): primordiyal foliküller (P), (B): Multilaminar primer folikülde (MP) zona pellusidanın düzensiz olduğu (→), minimal ekstrasellüler ödemin varlığı (◆) ve yer yer folikül sınırının ayırd edilemediği (◀) izleniyor	50
Resim 4.12. PKOS grubu; (SF): sekonder folikül, (→): çoğu alanda silinmiş zona pellusida, (*): oluşmaya başlamış antrum, (◆): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem, (♠): ince teka interna ve eksterna, (◀): folikül sınırının yer yer kaybolduğu izleniyor	51

Resim	Sayfa
Resim 4.13. PKOS grubu; (GF): Graff folikülü, (G): oldukça ince granüloza hücre katmanı, (★): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem (*): antrum, (♠): teka interna ve eksterna	52
Resim 4.14. PKOS + melatonin grubu; (KF): kortekste kistik yapı sergileyen foliküller, (M): vaskülerize medulla, (♣): Medullada yaygın ekstrasellüler ödem	53
Resim 4.15. PKOS + melatonin grubu; (P): primordiyal folikül, (MP): Multilaminar primer folikül, (→) düzensiz zona pellusida, (★): minimal ekstrasellüler ödem izleniyor	54
Resim 4.16. PKOS + melatonin grubu; (SF): sekonder folikül, (→): zona pellusida, (★): minimal ekstrasellüler ödem, (*): oluşmaya başlamış antrum, (♠): teka interna ve eksterna normal yapıları ile görülüyor	55
Resim 4.17. PKOS + melatonin grubu; Graff folikülleri (GF), antrum (*), granüloza hücre katmanı (G) ile teka interna ve eksterna (♠) normal histolojik yapıda izleniyor	56
Resim 4.18. MT1 immünboyaması. (A): Sham kontrol, (B) Melatonin, (C): PKOS, (D): PKOS + melatonin grubu. P: primordiyal folikül, UP: unilaminar primer folikül, MP: Multilaminar primer folikül, SF: sekonder folikül, GF: Graff folikülü, ♠: teka interna ve teka eksterna	62
Resim 4.19. GDF 9 immünboyaması. (A): Sham kontrol, (B) Melatonin, (C): PKOS, (D): PKOS + melatonin grubu. P: primordiyal folikül, UP: unilaminar primer folikül, MP: Multilaminar primer folikül, SF: sekonder folikül, GF: Graff folikülü, o: teka interna ve teka eksterna.....	64
Resim 4.20. BMP 15 immünboyaması. (A): Sham kontrol, (B) Melatonin, (C): PKOS, (D): PKOS + melatonin grubu. P: primordiyal folikül, UP: unilaminar primer folikül, MP: Multilaminar primer folikül, SF: sekonder folikül, GF: Graff folikülü, o: teka interna ve teka eksterna.....	65

1. GİRİŞ

Ovaryan siklus; ovaryumlarda folikül gelişimi, dominant folikülün seçilmesi ve ovulasyon aşamalarını içeren, puberte ile başlayıp her ay ritmik olarak menopoza kadar devam eden süreçtir. Bu mekanizmanın temelini oluşturan oosit maturasyonu ve granüloza hücre çoğalması oosit, granüloza hücreleri ve ovaryan stromal hücreler arasındaki sinyal molekülleri ile koordine edilir. Yapılan çalışmalarda, primordiyal folikülden antral folikül oluşumunda, ovaryumlarda lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu faktörler arasında, TGF- β (Transforming Growth Factor- β), aktivin, inhibin, AMH (Anti Mullerian Hormone), GDF 9 (Growth Differentiation Factor-9) ve BMP (Bone Morphogenetic Protein)'ler sayılabilir. Oositten salınan GDF 9 ve BMP 15, folikülogenezisde etkin role sahiptir. GDF 9 primer folikül aşamasında folikülden seçici olarak eksprese edilmekte olup; oosit, granüloza hücreleri ve teka hücrelerini içeren tüm foliküler katmanların farklılaşmasını uyarmaktadır. GDF 9 nakavt farelerde, primer folikül aşamasında folikül gelişiminin duraksadığı; folikülerin anormal yapıda granüloza hücrelerinden oluştuğu ve folikül çevresinde teka hücre farklılaşmasında bozulma, teka hücrelerinde LH reseptör ekspresyonunda eksiklik olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, oositten salınan GDF 9'un oosit ve granüloza hücre fonksiyonunun yanı sıra teka hücre farklılaşması ve fonksiyonu için de gerekli olduğu düşünülmektedir. İn vitro koşullarda, GDF 9'un preantral folikül büyümesini uyardığı, gelişen foliküllerin antral foliküle geçişinde etkili olduğu, granüloza hücre apoptozu ve foliküler atrezinin baskılanmasında rol aldığı ve bu sayede foliküler yaşamı desteklediği gösterilmiştir.

BMP 15'in ise normal folikülogenezis ve ovulasyonda önemli rol oynadığı, granüloza hücre çoğalmasını uyardığı ve somatik hücreler için mitojenik olduğu gösterilmiştir. Oosit tarafından eksprese edilen BMP 15, folikül gelişimi süresince artan bir ekspresyon paterni göstermektedir. Rekombinant insan BMP 15'i kullanılan in vitro çalışmalar; BMP 15'in, FSH'dan bağımsız olarak farklılaşmamış granüloza hücre çoğalmasını uyardığını göstermiştir. BMP 15 kumulus hücre apoptozunun düzenlenmesine katılmaktadır. Bununla ilişkili olarak, BMP 15'in ovulasyona kadar etkin kumulus hücre popülasyonunun korunmasını sağlayarak, fonksiyonel KOK (Kumulus-oosit kompleksi) devamlılığında rol aldığı ileri sürülmüştür. BMP 15'in oosit maturasyonu ve fertilizasyon oranlarının belirlenmesinde iyi bir belirteç olabileceği de düşünülmektedir. Bu molekül ayrıca dominant

folikül seçimini etkilemekte, folikül büyümesini, dejenerasyonu ve atretik folikül oluşumunu da düzenlemektedir.

İn vitro olarak GDF 9 veya BMP 15 ile birlikte kumulus oosit kompleks inkübasyonunun, oosit maturasyonunu önemli ölçüde uyardığı ifade edilmiştir. PKOS'da ovaryan hiperandrojenizm ve değişmiş intraovaryan parakrin sinyalizasyon folikül büyümesini bozabilir. Foliküler gelişimin duraksamasına bağlı olarak, ovaryum periferinde küçük antral foliküllerin birikiminin eşlik ettiği polikistik morfoloji gözlenmektedir. Ayrıca PKOS'lu kadınlarda; folikülogenez süresince intrafoliküler mikroçevrede oluşan değişiklikler, endokrin-parakrin faktör değişikliği, metabolik disfonksiyon ile ilişkili olarak bozulmuş oosit maturasyonu, düşük fertilizasyon oranları ve embriyonik gelişim yetersizliği gözlenmektedir. Sağlıklı folikülogenezisde gerekli olduğu bilinen büyüme faktörlerinden GDF 9 ve BMP 15'in anormal ekspresyonlarının PKOS patogeneziyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. PKOS nedeniyle oluşan oksidatif stresi azaltmak adına antioksidan destek tedavileri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan sık kullanılanlar arasında Tamoxsifen, Metformin, Klomifen Sitrat sayılabilir

Melatoninin; pineal bezden salınan, canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olup uyku, yaşlanma, sirkadiyen ritim, duygu durumu, cinsel olgunlaşma, üreme, kanser ve termoregülasyon gibi birçok yaşamsal olayda etkisi olduğu bildirilmiştir. Melatonin lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır. İnsanda beyinin çeşitli bölgelerinde, bağırsak, ovaryumlar, kan damarları ve karaciğerde, melatonin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. MT1 ve MT2 olmak üzere iki melatonin reseptörü tanımlanmıştır. Melatonin, üreme fonksiyonu ile ilişkisini MT1 reseptörü aracılığı ile sağladığı bildirilmiştir. Melatonin, ovaryum tarafından salgılanan estradiol sentezini baskılamaktadır. Yapılan literatür taramalarında, klinikte birçok semptomun yanında infertilitenin de eşlik edebildiği PKOS'da melatoninin antioksidan aktivitesi ve antidepresan etkisiyle bireylerin yaşam kalitesini artırdığı gözlenmiş ancak folikülogenezisde protektif etkisi belirlenmemiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, deneysel PKOS modelinde protektif uygulanan melatoninin, ovaryum dokusunda etkisinin histopatolojik olarak incelenmesi, melatoninin reseptör düzeyinde ovaryumda kullanılabilirliğinin saptanması ve folikülogenezisde etkin sinyal molekülleri olan GDF 9 ile BMP 15 dağılımına etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmada ovaryum dokusunun PKOS'taki patofizyolojisi hematoxilen-eosin ile ışık mikroskop düzeyinde incelendi. PKOS patofizyolojisiyle ilişkili olduğu düşünülen MT1, GDF 9 ve BMP 15 için ise immünohistokimya ve western blot yöntemiyle protein düzeyinde, RT-PCR yöntemiyle ise gen düzeyinde ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Gelişimi

Genital sistem intermediate (ara) mezodermden farklanır. Dorsal vücut duvarı boyunca tümsek oluşturan ara mezoderm, ürogenital kabarıklığı oluşturur. [1]. Gonadlar ilk olarak ürogenital kabarıklığın medyalindeki kölom epitelinin proliferasyonu ve mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş bir çift genital sırt halinde ortaya çıkarlar. Primordiyal germ hücreleri (PGH) ise embriyonik gelişimin 2. haftasında epiblasttan köken alarak primitif çizgi boyunca göç eder ve 3. haftada vitellus kesesinin allantoise komşu duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. 4. haftada son bağırsağın dorsal mezenteriy boyunca göç ederek 5. haftada primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada genital sırtları işgal ederler [2]. Dolayısıyla cinsiyet fertilizasyon ile belirlenmiş olsa da, gelişimin 6. haftasına değin gonadların seksüel karakteri dişi ya da erkeğe ait morfolojik özelliklere sahip değildir. Bu haftadan itibaren PGH'nin genital sırtları işgal etmesi ile embriyo seksüel fenotip açısından değişmeye başlar [1].

Primordial germ hücrelerinin genital sırtlara ulaşmasıyla birlikte kölom epiteli proliferasyon olarak altındaki mezoderm içine doğru gömülür ve primitif cinsiyet kordonları olarak isimlendirilen, yüzey epiteli ile bağlantılı düzensiz hücre kümelerini oluşturur. Bu evre gonadların farklanmamış evresi olarak adlandırılır [2]. XX cinsiyet kromozomuna sahip embriyonlarda, primitif cinsiyet kordonları yerlerini vasküler stroma olan ovaryan medüllaya bırakır [3]. Bu embriyonlarda kölom epiteli proliferasyon olarak 7. haftada kortikal kordonlar olarak adlandırılan ikinci nesil hücre kordonlarını oluşturur. Aynı zamanda PGH de oogonyumlara farklanır. Seri biçimde mitoz bölünmeler geçirerek çoğalan oogonyumlar 3. ayın sonunda kortikal kordon kaynaklı yassı epitel hücreleriyle çevrelenerek kümeler oluşturur. Oogonyumların bir kısmı mitoz bölünme geçirerek çoğalırken, bir kısmı 1. mayoz bölünmeye girer ve profazın diploten evresinde bölünmeleri bloke olur. Primer oositlerin bu evrede beklemesi, foliküler hücreler tarafından salınan oocyte maturation inhibitör (OMI) ile sağlamaktadır [2]. Sonuç olarak oogonyumlar yassı folikül hücreleriyle çevrelenmiş, primer oosit içeren primordiyal foliküllere dönüşürler [1, 2]. Ovaryumlar gestasyonun 15-18 haftalarında, yassı folikül hücreleriyle çevrelenmiş 6-7 milyon primordiyal folikül havuzuna sahiptir [4, 5]. Doğumda, bu sayı yalnızca 1-2 milyon arasındayken, menarja kadar 300.000 – 400.000'e düşmektedir. Menopoza kadar ovulasyon ile bu foliküllerden 1000 den

daha azı atılmaktadır [5, 6]. Menarjdan menopoza kadar her ay 15-20 folikül gelişmeye başlar ancak sadece 1 folikül dominant folikül olarak gelişimini tamamlayarak ovule olur, diğerleri ise folikülogenezin herhangi bir basamağında atretik folikül haline gelir [2]. Yapılan çalışmalarda 30'lu yaşlara kadar başlangıçtaki over rezervinin ancak % 12'si korunurken, 40'lı yaşlarda bu rakam % 3'lere kadar inmektedir [5]. Doğumda tüm foliküller mayoz-I'in diploten evresinde duraklamış primer oosit içeren primordiyal foliküllerden oluşmaktadır. Folikülogenez sürecine giren primer oositlerden dominant olanı mayoz bölünmeye devam eder ve ovulasyondan hemen önce mayoz-I'i tamamlayarak bir sekonder oosit ve perivitellin aralıkta yerleşim gösteren 1. polar cismi oluşturur, sekonder oosit mayoz-II'nin metafaz evresinde iken, artan östrojene bağlı oluşan LH piki ile ovulasyon gerçekleşir ve mayoz-II ancak fertilizasyon olur ise tamamlanır. Fertilizasyon olmaması durumunda 24 saat sonrasında dejenere olur [1, 2].

2.2. Ovaryum Anatomisi

Ovaryum küçük, oval şekilli 3-5 cm uzunluğunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında 5-6 gr ağırlığında seksüel hormonları üretmekle sorumlu bir çift organdır. Cavitas pelviste uterusun her iki tarafında intrapelvik ve intraabdominal yerleşimli, broad ligamentin arkasında, rektumun önünde, fossa ovaricada bulunan bir çift organdır [7]. Fossa ovarica arteria iliaca eksterna ve arteria iliaca interna arasında bulunurken, anteriordan ligamentum uteri, anterio-süperiordan arteria iliaca eksterna, posteriordan ise üreterler ve arteria iliaca interna ile sınırlı olup peritonla döşelidir [8, 9]. Facies medialis ve facies lateralis isimli çift yüzü ile ekstremitas uterina ovarii ve ekstremitas tubaria ovarii isimi çift ucu, margo mesovaricus ovarii ve posteriorunda margo liber isimli iki kenarı olan bir organdır [8-10]. Facias medialis yüzü pelvise bakar; colon sigmoideum ve intestinum tenue ile komşu ve infundibulum tuba uterinaeyi örter. Facias lateralis yüzü fossa ovaricayı örten parietal peritona oturur [8, 9]. Ekstremitas uterina ovarii alt uçtur ve fibröz ligament olan elastik ve düz kas lifleri içeren ligamentum ovarii proprii ile ovaryumun alt ucunu fundus uterinin yan köşesine bağlar. Ekstremitas tubaria ovarii üst uçtur, ovaryumu üst ucundan tuba uterinaya bağlar ve fimriae tubae ve ligamentum suspensorium ovarii isimli ovaryuma ait ven, arter ve sinirlerin olduğu periton kısmı bulunur, tubae uterinaenin infundibulumuna komşudur [8, 11]. Margo mesovaricus ovarii isimli ön kenarında hilum ovarii bulunur ve ligamentum latum uterinum (Broad ligament) bir kısmı olan mesovariuma bağlanır. Bu bağlanma bölgesine Farre-Waldayer White line adı verilir [8, 9, 11].

Ovaryumda arterial dolaşımında arteria ovaricalar, aorta abdominalisten çıkıp ligamentum ovarii suspensoriumda ilerleyerek mesovariuma gelir ve ramus ovaricusla anastomoz yaparak hilum ovariden ovaryuma girerek medullar korteks sınırında dallara ayrılıp folikülleri besler [8, 11, 12]. Ovaryumun venöz dolaşımında, venler hilum ovariden çıkar ve plexus mesentericus caudalisten köken alan plexus ovaricusta venöz ağ oluşturur. Bu plexustan ayrılan venlerin bir kısmı plexus uterovaginalise diğerleri ise ligamentum ovarii suspensorium içindeki vena ovaricaya açılır [8, 11, 12]. Sol vena ovarica vena renalis, sağ vena ovarica ise vena cava inferiora drene olur [8].

Ovaryum sinirleri ise plexus hypogastricusdan, inferior arteria ovaricanın çevresindeki plexus ovaricustan gelir. Parasempatik sinirler 10. kafa çifti nervus vagustan, sempatik sinirleri ise 10. ve 11. sempatik ganglionlardan ayrılan preganglionik ipliklerden oluşup ganglion aorticorenalede sonlanan sinir olan nervus splanchnicus minörden ve bir grubunda torakal medullar spinalisten kaynaklanır [9, 13].

2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum, oogenez ve steroidogenez ile ekzokrin ve endokrin fonksiyona sahip bir çift badem şeklinde olan organdır [14]. Ovaryumlar mikroskopik olarak dıştan germinal epitel adı verilen, biçimi tek katlı kübikden, tek katlı yassı epitele değişen bir epitel örtü ile çevrilidir ve mezovaryumu kaplayan mezotel ile devamlılık gösterir [14]. Germinal epitelin hemen altında fibröz bağ dokudan tunica albuginea yer almaktadır [15]. Tunica albugineanın iç kısmında organ korteks ve medulla olmak üzere iki bölgeye ayrılmıştır. Korteks; tunica albugineanın hemen altında bulunan ve gelişiminin çeşitli evrelerindeki ovaryan folikülleri içeren bölgedir. Puberteden önce bu bölgede yalnızca primordiyal foliküller bulunurken, puberteden sonra primer, sekonder ve Graaf folikülleri de görülmeye başlar. Seksüel olgunlukla birlikte korpus luteum, korpus albicans ve gelişiminin çeşitli evrelerinde atreziye uğrayan atretik foliküllerde yine bu bölgede görünmektedir. Medulla; organın merkezindeki yoğun vaskülerizasyona sahip gevşek bağ dokusudur; kan damarları, lenf damarları fibroblastlar, östrojen salgılayan intersitisyel hücreler ile androjen salgılayan hilus hücrelerini içerir [12, 13].

2.4. Ovaryum Folikülleri ve Foliküler Gelişim

Puberteyle birlikte dişi gonadlar primordiyal folikül havuzuna sahiptir. Her siklusta havuzdan seçilen 15-20 primordiyal folikül, Graff (preovulatar-olgun) foliküle kadar olan süreçte çeşitli büyüme evrelerinden geçmektedirler; bunlar; primordiyal folikül, primer ve sekonder folikül ile Graff folikülüdür. [10, 15].

2.4.1. Primordiyal folikül

Foliküler gelişimin ilk evresidir [10, 14] ve tunika albugineanın hemen altında yer alırlar. Fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkarlar. Bu evrede foliküller tek katlı yassı folikül epitel hücreleriyle çevrilidir. Yaklaşık 25-30 µm çapında olan bu foliküller, veziküler çekirdekli, bir veya daha fazla çekirdekçik içeren primer oositlere sahiptir [14]. Bu evredeki oosit gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır [10] ve oosit mayoz-I'in profaz evresindeki diploten döneminde duraksamaktadır [10, 15]. Oositi tek tabaka halinde yassı folikül hücreleri çevrelemektedir. Ooplazmada çok sayıda mitokondriyon, granüllü endoplazmik retikulum (GER) Golgi cisimciği ve RNA dan oluşan Balbiani cisimciğinin yanısıra [16] annulate lamella (annular lamel) adı verilen nükleer zara paralel endoplazmik retikulum ile iç içe geçmiş lamel yapısı gözlenir [17]. Bu lamellerdeki her tabaka por yapıları içermektedir.

2.4.2. Primer folikül

Büyümekte olan folikülün ilk evresidir. Büyük bir çekirdeğe sahip olan primer oosit bu evrede yaklaşık olarak 100-150 µm çapına ulaşır. Primer oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri kübik şekil alırken stromada da değişiklikler meydana gelmektedir. Folikül hücrelerinin oosit çevresinde oluşturduğu katman sayısına göre primer foliküller unilaminar primer folikül ve multilaminar primer folikül olmak üzere iki grupta incelenir [10] .

Unilaminar primer folikül

Bu evrede yassı folikül epitel hücreleri tek katlı kübik hal alır [10]. Oositin büyümesiyle birlikte folikül hücreleriyle oosit arasında, kuvvetli PAS (Periyodik asit Schiff) (+) boyanan, zona pellusida adı verilen kalın glikoprotein bir kılıf oluşmaya başlar. Zona pellusida oogenezis, fertilizasyon ve preimplantasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır [18].

Zona pellusida hizasında oosit ve folikül epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan mikroviluslar, oosit ile granüloza hücreleri arasındaki perivitellin aralığa uzanırlar ancak burada sitoplazmik devamlılık söz konusu değildir ve oosit ile folikül epitel hücreleri gap junctionlarla tutunurlar böylece folikül hücreleri oosite besinsel destek sağlamaktadırlar [14]. Oosit beslenmesi folikül epiteli kalınlaştıkça zorlaştığından bu bağlantı önem arz etmektedir. Zona pellusida, ZP₁, ZP₂ ve ZP₃ ve ZP₄, olarak isimlendirilen 4 adet iodosülfonik asit proteinden meydana gelir [18]. Bu proteinler nondenatüre şartlarda homodimer oluşturmurlar [19]. ZP₂ ve ZP₁ / ZP₄, ZP₃ ile bağ oluşturmaktadırlar [19]. ZP₁ ve ZP₄ benzer özelliklere sahip glikoproteinler iken, ZP₃ potansiyel sperm bağlayıcı bölgeye sahiptir, ayrıca akrozom reaksiyonunu da indüklemekle görevlidir [20]. ZP₂ sekonder spermatozoa bağlanma reseptörü olarak işlev görürken, ZP₁ ise homodimerik filament çapraz bağlayıcı olarak görev yapar. Aynı zamanda ZP₄ ile birlikte akrozom reaksiyonunda da işleve sahiptir [21, 22].

Multilaminar primer folikül

Bu gelişim evresinde, folikül epitel hücreleri mitoz bölünme ile katman sayısını arttırmış ve çok sıralı hale gelmiştir. Artık folikül epitel hücreleri çok katmanlı yapısı nedeniyle stratum granülozum katmanını olarak isimlendirilirken foliküler hücrelerde granüloza hücreleri olarak adlandırılır. [14]. Granüloza hücrelerinin arasında yoğun olarak gap junction türü bağlantı birimleri bulunur [14]. Bu bağlantı birimleri makromoleküllerin taşınmasında önem arz etmektedir. Folikül epitel hücrelerinde bu değişiklikler meydana gelirken bağ dokuda da bir takım değişiklikler olmaktadır; stroma, granüloza hücrelerinin dış sınırında bir bazal membran ile folikülden belirgin olarak ayrılır [15]. Camsı membran olarak da adlandırılan bazal membran epitel hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkilemekte ve lipoproteinler gibi büyük moleküler ağırlıklı proteinlerin foliküler antruma girişini engellemektedir [23]. Oosit gelişmeye devam ederken granuloza hücreleriyle birlikte stroma ve bazal membranda da bir takım değişiklikler meydana gelir. Bu evrede granüloza hücreleri FSH reseptör ekspresyonuna başlar [24]. Bağ doku hücreleri bazal membrana komşu alanda değişime uğrayarak teka folikülü adı verilen bir katman oluşturur [25]. Teka folikülü steroid üreten hücrelerin özelliklerine uygun olarak yoğun miktarda düz endoplazmik retikuluma sahiptir.

2.4.3. Sekonder folikül (antral folikül)

Stratum granülozumun 6-12 katmanlı bir hal alarak primer oositin yaklaşık 200-250 µm çapta olduğu, folikülün ve oositin gelişmek için FSH (follicular stimulating hormone), EGF (epidermal growth factor) ve IGF (insulin-like growth-factor) gibi faktörlere ihtiyaç duyduğu foliküler gelişim evresidir. [10, 14, 15]. Granüloza hücreleri arasında Call-exner cisimciği adı verilen, PAS (+), proteoglikanlardan zengin, eozinofilik, yapı gözlenir. Call-exner cisimciği oositin olgunlaşma belirteci olarak kullanılırken, granüloza hücre kökenli tümör tanısında da oldukça etkindir [10, 14, 26]. Granüloza hücre sayısındaki artışa bağlı olarak FSH reseptör sayısında artmaktadır ve her bir granüloza hücresi yaklaşık 1500 FSH reseptörü içermektedir [27]. Granüloza hücreleri arasında antrum adı verilen, proteinler, steroidler, FSH, LH, büyüme hormonu (BH), insan koryonik gonadotropin (hCG), progesteron, östradiol, ROS (reaktif oksijen türleri), enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar, vitamin E, katalaz, melatonin, transforming büyüme faktörü alfa (TGF-α), aminoasitler, antikoagulantlar, hiyaluran bakımından zengin ve elektrolitler içeren foliküler sıvı birikmektedir [10, 28]. Folikülogenezisin bu evresinde teka folikülü gelişiminin ilerlemesi ile teka interna olarak isimlendirilen ve bazal membrana komşu bir iç katman ile teka eksterna olarak isimlendirilen ve fibromüsküler yapıda, kan damarlarından zengin bir dış katman olmak üzere ikiye ayrılır [14, 15] . Teka internada kan damarları, fibroblastlar, kollajen lifler ve LH reseptörleri yer alırken, teka eksternada, kollajen liflerin yanı sıra düz kas hücreleri bulunur [14]. Teka interna tabakasında bulunan teka hücrelerinde LH reseptörlerine bağlanan LH'nin indüktif etkisi ile östrojen öncülü olan androjenler (androstenedion) üretilir. Granüloza hücreleri sahip oldukları FSH reseptörlerine FSH'nin bağlanması ile androstenedion sitoplazmasına alır ve aromataz enzimi üreterek östrojene dönüştürür. Teka interna ve granüloza hücre birlikteliği ile oluşturulan östrojen tüm vücuda dağılır [14]. Teka eksterna ise kan damarlarından zengin yapısıyla teka internanın beslenmesini sağlamaktadır [29].

2.4.4. Graff folikülü (Tersiyer folikül)

Olgunlaşmaya devam eden folikülün boyutundan dolayı ovaryum yüzeyinde stigma adı verilen avasküler bir kabartının olduğu evredir [10]. Bu evrede yaklaşık 10 mm ya da daha büyük çapta olan folikül ovule olacaktır [29]. Antrum sıvıyla dolmaya devam ederken iç basıncın artmasıyla, primer oosit merkezden perifer doğru çekilir ve granüloza hücrelerinin

mitototik aktivitesi azalır. Oositle stratum granülozum arasındaki hücre tabakası kum yığını şeklini alır ve kumulus ooforus olarak adlandırılır. Oositin çevresini saran hücre katmanı ise korona radiatayı oluşturur. Korona radiatadaki hücrelerin mikrovilusları oosite doğru uzanarak oosit mikroviluslarıyla oluklu bağlantılar oluşturmaktadır. Folikülogenezisin devamlılığı için gerekli olan faktörler arasında, sitokinler, EGF, IGF gibi büyüme faktörleri ve Ca^{2+} (Kalsiyum) gibi moleküler ile FSH sayılabilir [15]. Bu evrede folikül FSH bağımlı değildir. Ovulatuar anjiyogenez LH tarafından başlatılmaktadır [30]. Büyüyen folikülden salgılanan östrojen miktarının artmasıyla hipofiz bezinin LH salgısı uyarılır ve LH piki ile granüloza hücrelerinden prostoglandinlerin ve anjiyogenik faktörlerin üretimi başlar [31, 32]. Foliküler vaskülaritede ki önemli değişiklikler; büyük mikrovasküler perfüzyon, teka internada artmış kapiller densite ve gelişmiş kılcal geçirgenlik olarak sıralanır [33, 34]. Bu evrede granüloza hücreleri arasındaki boşluk artmaya devam ederek oositle kumulus hücreleri arasındaki bağlantının gevşemesiyle folikül ovulasyona hazırlanmaktadır [10]. Bu periyotta aynı zamanda teka tabakaları daha belirgin hale gelir ve teka interna hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları ortaya çıkar [10]. Ovule folikülde anjiyogenezis sonucunda stromal damarların bir dalı granüloza hücrelerine doğru büyür [35]. Prostoglandin E_2 (PGE_2) veya vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGFA)'nın inhibisyonu sonucunda folikülde, foliküler anjiyogenezis ve ovulasyon engellenir [36, 37]. PGE_2 ve VEGFA, aktivitelerini G-protein ilişkili reseptörler aracılığıyla gösterirler [36].

2.5. Ovulasyon

Sekonder oositin atılması olarakta ifade edilen ovulasyon hormonal ve enzimatik değişikliklerin kontrolü altındadır ve dominant folikülün seçilimini takiben, LH'nin pik yapmasından 10-12 sa sonra başlamaktadır [38]. LH salınımı, Graaf folikülü tarafından sentezlenen östradiol sentezinin artmasıyla, ovulasyondan yaklaşık 34-36 saat önce başlamaktadır [39]. LH salgılanması granüloza hücrelerini luteinizasyon için uyarırken, midcycle FSH salınımından sorumlu progesteron sentezini de stimüle eder ve primer oositin mayoz-I bölünmesinin tamamlanması sağlanır. Mayoz-I sonunda sekonder oosit ve 1. polar cisim oluşur [39, 40]. İkinci mayoz bölünme ise lokal mayoz uyarıcı faktörler tarafından başlatılarak, metafaz-II evresinde bloke edilir. Fertilizasyon olması durumunda matur ovum ve ikinci polar cisim oluşmaktadır [15]. LH'nin ani yükselmesi ile ovaryumda kollojenazların, plazmin gibi prostoglandinlerin ve proteolitik enzimlerin aktivitesi artar [40]. Mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, proteolitik enzimler ve

prostaglandinler foliküler duvardaki yapılanmayı bozarak oosit-kumulus kompleksinin serbest hale gelmesini sağlar [41, 42]. Prostaglandinler aynı zamanda ovaryumdaki düz kas hücrelerini stimüle ederek oositin salınmasında da rol alır [41]. Ovulasyondan hemen önce foliküler sıvıda 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), prostoglandin E ve F miktarlarıda pik yapar [43, 44]. Prostaglandinler proteolitik enzimleri stimüle ederken, HETE, anjiyogenez ve hiperemiye stimüle eder [45]. İndosin gibi prostoglandin sentez inhibitörü verilen hastalarda, foliküler ruptürün durduğu gözlenmiştir [46]. Östradiol seviyeleri ise LH'ın pik yapmasının hemen ardından düşer [40]. Bu durumun olası nedenleri arasında, LH reseptör downregülasyonu ve progesteron tarafından östradiol sentezinin direk inhibisyonu gösterilebilir [40]. Progesteron aynı zamanda midcycle FSH artmasını stimüle etmektedir. Bu evrede artmış FSH, plasminojen aktivatörünü stimüle etmekte ve granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin artmasını sağlamaktadır [40]. Ayrıca oosit kumulus kompleksiyle stratum granulosum arasındaki glukozaminaglikan birikimi ve foliküler sıvıdaki artmış iç basınç da ovulasyonu etkileyen faktörler arasındadır [14]. Bahsi geçen tüm faktörlerin etkisiyle sekonder oosit ve korona radiata hücreleri, bir miktar kumulus hücresi ile birlikte stigma adı verilen avaskülerize bölgeden atılır ve tuba uterina fimbrialarına tutunarak tuba uterinanın ampulla bölgesine alınır [10]. Bu olay ovulasyon olarak adlandırılır.

2.6. Luteal Faz

Ovulasyondan hemen sonra granüloza ve teka hücrelerinden salınan anjiyogenik faktörlerin etkisiyle bazal lamina gevşer ve kapillerler granüloza hücrelerine doğru invaze olur [47]. İmplantasyon olaylandığında, vaskülarizasyon ile serum östradiol ve progesteron seviyeleri de pik yapar [40]. Teka internadaki kapillerlerin kanlanarak foliküler lümene dolmasıyla korpus hemorajikum oluşur [10]. Bu sürecin devamında luteinizasyon adı verilen bir olayla granüloza ve teka interna hücreleri farklılaşarak, yaklaşık 30 µm çapında olan luteal granüloza hücreleri ve 15 µm çapında olan luteal teka hücrelerine dönüşür [10]. Bu hücreler lutein olarak isimlendirilen sarı renkli bir pigment salgırlar ve bu nedenle oluşan yapı sarı cisim anlamında korpus luteum olarak adlandırılır. Korpus luteum progesteron salgılamakla sorumludur. Korpus luteum hücrelerinin, boyutları büyür, ayrıca steroid salgılayan hücre özellikleri olarak sitoplazmada lipit damlacıkları, granülsüz endoplazmik retikulum ve tübüler kristal mitokondiyon görülür. Korpus luteum devamlılığı ise LH salınımına bağlıdır [10, 14, 15]. Foliküler faz süresince FSH miktarında azalma luteal fazın kısılmasına ve

korpus luteumda küçülmeye neden olur ve korpus luteumun ömrü ise foliküler veya luteal faz süresince sürekli uygulanan LH ile ilişkili olarak kısalır [48]. Korpus luteumun işlevi ovulasyondan sonraki 9-11. günlerde azalır. [49]. LH'nin reseptör down-regülasyonu luteal fazın sonlanmasında rol oynadığı ve matriks metalloproteinazların da bu süreçte görev aldığı bildirilmektedir [40, 50]. Korpus luteum; üreme hormonları gibi çok sayıda hormon salgılamasının yanı sıra blastokist implantasyonu ve gebeliğin devamında da çok önemli bir göreve sahiptir, bu nedenle gebelik durumunda 4. aya kadar varlığını arttırarak korur [51]. Eğer gebelik söz konusu değilse östradiol ve prostoglandinlerin etkisiyle korpus luteum luteolizise uğrayarak korpus albikansa dönüşür [7, 11, 12, 41].

2.7. Folikülogenezis Fizyolojisi

Ovaryan foliküllerinin büyüme ve olgunlaşma süreçlerinde çeşitli protein, hormon ve farklılaşma faktörlerine gereksinim vardır [52]. Foliküler gelişimle ilişkili olan sinyaller büyüyen oositin kendisi ve çevresindeki somatik hücrelerden, gonadotropinler ve büyüme faktörleri olarak salınır [53]. Dominant folikülün seçildiği bu mekanizmada korpus luteum dışı üreme sisteminde temel role sahiptir. Dominant folikülün seçiminde FSH ve folikülün otokrin ve parakrin etkileşimleri ile sentezlediği büyüme faktörleri (BF) de bu mekanizmaya katkı sağlamaktadır [54]. İnsan ovaryum fizyolojisinde folikülogenezis uzun bir süreci kapsar [55]. Plazmada FSH'ta artma luteal faz ve erken foliküler faz süresince devam eder [54]. FSH yokluğunda ovulasyonun inhibe olduğu bildirilmiştir [56]. Eşik seviyedeki FSH salgısı östradiol üretimine neden olur [56]. Granüloza hücreleri FSH reseptörlerine sahiptir ve FSH bu sayede ovaryumda aktif fizyolojik rol alır [54]. Yapılan birçok çalışma FSH reseptör sinyal kaskadının dominant folikülün seçiminde, büyümesinde, farklılaşmasında, foliküler sıvının birikmesinde, hücre proliferasyonunda, östradiol sentezinde ve LH reseptör ekspresyonunda etkin olduğunu göstermiştir [57-59]. Granüloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonu ovulasyonun indüklenmesi ve luteinizasyon için gereklidir [60]. Dominant folikül preovulatuvar evreye gelinceye değin granüloza hücrelerinde LH reseptör ekspresyonu yoktur [61]. FSH dominant folikül gelişiminde asıl role sahip olsada, LH/hCG sinyal yolağı da önemli bir göreve sahiptir [62]. Fizyolojik olarak, teka interna hücrelerindeki değişiklikler, LH bağımlı sinyal yolağında östradiol sentezi için önemlidir [62]. Özellikle teka hücrelerindeki LH reseptör aktivasyonu yüksek miktarda androstenedion üretimine neden olur [54]. LH'a cevabın en önemli noktası, P540 (Cytochromes P450) aromatazla östradiol metabolizmasının gerçekleştiği hücre grubu olan granüloza hücrelerine

aromataz substratı sağlamasıdır [54]. Bu noktada dominant folikül ve korpus luteumda LH/hCG' nin işlevsel olarak üç önemli aktivitesi bulunmaktadır; bunlardan ilki, LH/hCG'nin ovulasyon ve korpus luteum formasyonundan sorumlu olmasıdır, ikinci olarak LH erken ve midluteal faz süresince korpus luteumdan progesteron ve östradiol üretimi için gereklidir, son olarak hCG, korpus luteumun gebelik korpus luteumuna dönüşmesi için zorunludur [54].

Folikülogenezisde gonodotropinlerin etkisinin yanında, son yıllarda oosit ve granüloza hücrelerinden salınan BF'lerinin de bu süreçte oldukça etkin olduklarına dair çalışmalar yapılmaktadır [63]. Günümüzde tanımlanan büyüme faktörleri arasında, growth differentiation factor-9 (GDF 9) [64], bone morphogenetic protein-15 (BMP 15/GDF 9B) [65] bone morphogenetic protein-6 (BMP 6) [66], transforming growth factor- β (TGF β) [67], ve fibroblast growth factor-8 (FGF 8) [68] sayılabilir.

Bu faktörlerden özellikle GDF 9 ve BMP 15 sağlıklı folikülogenezis ve özellikle olgunlaşan folikül evresinde dişi fertilitesi için son derece önemli yere sahiptir [54]. Yapılan bir çalışmada GDF 9 nakavt farelerde folikülogenezisin preantral evrede duraksadığı ve sonuç olarak Graaff folikül oluşumu, ovulasyon ve gebeliğin olaylanamadığı bildirilmiştir [69]. Başka bir çalışmada benzer durumun fenotip X-bağımlı işlev kaybı mutasyonuna sahip homozigot koyunlarda BMP 15 için de söz konusu olduğu ifade edilmiştir [70]. GDF 9 ve BMP 15'in kumulus hücre işlevinin düzenlenmesi, metabolizma, proliferasyon, apoptoz ve luteinizasyondaki aktivitelerinin yanı sıra, anormal ekspresyonlarının infertiliteyle ilişkili olduğu ifade edilmiştir [71].

2.7.1. Gdf9

GDF 9 primer folikül evresinde ekspresse edilmekte ve oosit, granüloza ve teka hücrelerini içeren tüm foliküller yapının farklılanmasını indüklemektedir [72]. GDF 9 hasarlı farelerde yapılan bir çalışmada faktörün, özellikle gonadotropin bağımsız evrede granüloza hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği anlaşılmıştır [73]. İn vitro çalışmalarda GDF 9'un rat preantrantral foliküllerinde büyümeyi indüklediği ifade edilmiştir [74]. Bu durum GDF 9'un foliküler hücrelerdeki FSH reseptör ekspresyonunu stimüle etmesiyle ilişkilendirilmiştir [75]. GDF 9 aynı zamanda ovulasyondan hemen önceki foliküler büyüme evresinde de önemli role sahiptir; LH salınımından hemen önce, kumulus hücreleri glikoliz

ve kolesterol biyosentezi gibi metabolik kaskadlarda GDF 9 aktivitesine gereksinim duyar [76]. GDF 9 antral evreye geçişte ise granüloza hücrelerinin apoptozunu ve foliküler atreziyi baskılayarak foliküllerin hayatta kalmasına katkı sağlar [77]. Tüm bunların yanı sıra GDF 9, preovulatuvar evredeki gen ekspresyonunu da düzenlemektedir [75]. GDF 9, farede preovulatuvar foliküllerde FSH ile indüklenen steroidogenezi inhibe etmekte ve FSH varlığında kumulus hücre bölünmesini desteklemektedir [78].

2.7.2. Bmp15

BMP 15'in ise GDF 9'a benzer şekilde foliküler büyüme ve gelişimi indüklediği bilinmektedir [79]. Rekombinant insan BMP 15 geni kullanılarak yapılan çalışmalarda, BMP 15'in farklılaşmamış rat granüloza hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir [79]. Ancak BMP 15, aynı zamanda rat granüloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunu baskılayarak FSH aktivitesini, aynı şekilde granüloza hücrelerindeki FSH ile indüklenen StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) olan; Cyp11A1 (Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme), 3 β -hidroksiteroid dehidrogenaz, LH reseptör inhibin/aktivini inhibe etmektedir [80]. BMP 15 granüloza hücrelerindeki kit ligand (KL) ekspresyonunu stimüle etmektedir [81]. Ancak ilginç şekilde kit ligand (KL)'da oositteki BMP 15 ekspresyonunu inhibe etmektedir. Buradan yola çıkarak kit ligand ve BMP 15'in oosit ve granüloza hücrelerinde negatif geribeslemeyle etki gösterdiği ifade edilmektedir. Bu iki molekül arasındaki mekanizma granüloza hücrelerinde proliferasyonun indüklenmesini sağlamaktadır [81].

BMP 15 aktivitesi follistatin tarafından düzenlenmektedir. Follistatin dominant folikül tarafından yüksek düzeyde sentezlenirken, atretik foliküller tarafından çok düşük miktarda sentezlenmektedir. Sonuç olarak BMP 15'in granüloza hücrelerinde mitozu indüklediği belirlenmiştir [80]. BMP 15 FSH reseptör inhibisyonunu indüklediğinde follistatin granüloza hücrelerinin FSH'a cevabının devamlılığını sağlamaktadır [75]. BMP 15'in kumulus hücrelerine etkisine dair değişik veriler mevcuttur. Bir çalışmada kumulus hücre apoptozunda indüklediği bildirilirken [75], yapılan bir diğer çalışmada, kumulus hücreleri tarafından salgılanan EGF (epidermal growth factorler) sentezini artırarak kumulus hücre proliferasyonunu stimüle ettiği vurgulanmıştır [82].

2.7.3. Ovaryan steroidler

Ovaryan fonksiyonun düzenlenmesinde foliküler hücrelerince sentezlenen seks steroidlerinin temel role sahip olduğu bilinmektedir. Bu steroidler sistemik dolaşımla ovaryan mikroçevresine ulaştıklarında foliküler gelişimin sürekliliği için gerekli olan parakrin faktörler olarak görev yaparlar [83]. Ovaryumdaki seks steroidlerin rolüyle ilgili yapılan çok sayıda çalışma östrojen ve progesteronun direkt aktivitesiyle ilişkili olsa da, yapılan çalışmalar androjen hormonların da önemine dikkat çekmektedir [84]. Folikülogenezisin düzenlenmesinde rol alan testosteron, androstenedione ve dihidrotestesteron bu androjen hormonlardan olup ovaryan foliküllerin büyüme ve gelişimlerini indüklemektedir [85]. Androjenler özellikle folikülogenezisin başlangıcında rol almaktadırlar [86]. Özellikle son yıllarda etiyojisi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, üreme periyodundaki dişilerde % 10-15 oranında görülen polikistik over sendromu, artmış ovaryan androjen üretimi ve kronik anovulasyon ile karakterizedir. Ovaryum mikroçevresinde androjen sentezinin artması foliküler gelişim üzerinde negatif etki göstermektedir [52].

Androjenler olan androstenedion, testosteron ve dihidrotestesteron kolestrolde sentezlenmektedirler. Progesteron ve östrojen gibi hormonlarla birlikte seks steroid kaskadında görev yapmaktadırlar [87]. İki hücre-iki hormon modeli (teka ve granuloza) foliküler hücrelerin ve gonadotropinlerinin (FSH ve LH) ovaryumdaki steroid sentezi ve salınımını tanımlamaktadır [52]. Bu modele göre, teka hücrelerinde LH stimülasyonu ile androstenedion, 17- β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimiyle testosteroon dönüşmekte ve granuloza hücrelerine taşınarak FSH stimülasyonu ile aromatazlar sayesinde östrodiol dönüşürmektedir [88]. Testosteronun granuloza hücrelerinde östradiol dönüşmesi, androjenlerin ovaryan foliküllerin farklılaşmasındaki indirekt aktivitesi olarak ifade edilmektedir [52]. Östrojenlerin ovaryumdaki aktiviteleri ve ilgili mekanizma anlaşılmış olsada, androjenlerin folikülogenezisin devamlılığındaki direkt etki mekanizması hakkında çok az şey bililmektedir. Androjenler hücrel aktivitelerini ligand spesifik androjen reseptör (AR) aracılığıyla yapmaktadır [52]. Bu reseptörler aracılığıyla, transkripsiyon faktörü olarak da görev yapmaktadır [89]. Transkripsiyon faktörlerinin üretiminden sorumlu genler arasında insülin-benzeri-büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve aromataz enzimi sayılabilir [90, 91]. Androjen hormonların foliküler gelişimdeki direkt aktiviteleri foliküler hücrelerin AR'lerinin transkripsiyonel aktivitesiyle ilişkilidir [52]. Yüksek doz androjene prenatal ve

postnatal periyod boyunca etkin kalmak, reproduktif döngüdeki düzensizlikler ve PKOS (polikistik over sendromu) ile ilgilidir [92]. Literatürde androjenlerin erken folikülogenezisteki etkilerinin in vivo androjen reseptör uygulamaları yapılarak incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Xue ve arkadaşları çalışmalarında rodentlere 90 gün boyunca subkutan uygulanan ($83 \mu\text{g/kg}$ denek weight/day) dihidrotestesteron sonucunda preantral foliküllerin gelişiminde artış gözlemiş [93], Cardenas ve arkadaşları yaptıkları domuz çalışmasında intramuskuler olarak, bir östros döngüsünden gelecek östros döngüsüne değin uygulanan dihidrotestesteron ($60 \mu\text{g/kg}$) etkisi ile preovulatar foliküllerde FSH reseptör mRNA ekspresyonunda artış belirlemişlerdir [94]. Ancak insanlarda, PKOS gibi yan etkilerden dolayı, androjenlerin etkisinin in vivo olarak değerlendirildiği çalışmalar sınırlıdır. Yapılan in vitro çalışmalarda ise androjen hormonlarının gelişimin erken evresindeki foliküllerin büyümesini desteklediği, ancak yüksek doz androjenin bu süreci olumsuz etkilediği belirtilmektedir [52, 95].

2.8. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)

Geceleri pineal bezden salınan, küçük, lipofilik indolamin hormon olan melatonin ilk olarak sıgır epifiz bezinden izole edilmiş ve [96] kurbağa melanositlerinin rengini açan bir ajan olarak ifade edilmiştir [97]. Melatonin, sirkadiyen ritimde önemli bir fonksiyona sahiptir [98] ve amfipilik bir molekül olması dolayısıyla morfolojik bariyerleri kolaylıkla geçebilmenin yanı sıra reaktif oksijen türleri (ROS)'nin neden olduğu oksidatif strese karşı da hücrelerin koruyucusu olarak işlev görmektedir [99]. Melatonin ve metabolitlerinin antioksidant moleküler yapısı, direkt ve indirekt antioksidan aktivitesiyle ilişkilidir [100]. Bu bağlamda; ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) uzaklaştırılması direkt aktivite olarak nitelendirilirken, indirekt aktivitesi antioksidatif enzim aktivasyonunu ve pro-oksidatif enzim inhibisyonunu içermektedir [101].

İnsanlarda melatoninin sirkadiyen döngüdeki ilk aktivitesi postnatal dönemin 9. haftasında gözlenirken, melatonin salınımının maksimum düzeylere ulaştığı dönem 3.-5. yıllar olarak ifade edilmektedir [102]. Sirkadiyen döngüdeki değişiklikler, anterobazal hipotalamustaki küçük bilateral nöron grubu olan SCN kökenlidir [98]. Otonom sinir sistemiyle uyarılamayan dokulara sinyaller, ikinci bir sinyal iletim mekanizması olan melatoninin vasıtasıyla, kan yoluyla iletilmektedir [102]. Söz konusu organlarda gelen sinyali alan ve cevap oluşturacak olan membran bağımlı reseptör sistemi melatonin reseptör-1 (MT1) ve

melatonin reseptör-2 (MT2) olarak ifade edilmiştir [103]. Melatonin bu reseptör sistemiyle aktivaston göstermesinin yanısıra serbest oksijen radikalleri üzerinden de hücrelere etki etmektedir [102, 103].

2.8.1. Melatonin reseptörleri

Melatonin membran reseptörleri G-protein ilişkili reseptör aile üyesidir ve nükleer bölgede de melatonin bağlanması için bu reseptörlerin varlığı tanımlanmıştır [104]. Memelilerde iki tip melatonin reseptör varlığı tespit edilmiştir bunlar MT1 ve MT2. Bu reseptörler melatoninin döngüsünden etkilenen bütün hücrelerde bulunmaktadır. Dişi üreme sistemin major organları olan ovaryum, uterus ve plasenta da bu gruba dahildir. MT1 reseptör; hücre proliferasyonu, major vazokonstrüksiyon ve üreme fizyolojisinde görev almaktadır [105]. Rat ovaryumlarında granüloza hücrelerinde melatonin reseptörlerin varlığı belirlenmiştir [106]. Yapılan çalışmalarla MT1'in susturulması sonucunda cAMP seviyelerinde azalma ve bağlantılı olarak hücresel apoptozda artış olduğu belirlenmiştir [106].

2.8.2. Melatonin ve dişi üreme sistemi

Melatonin sentezleyen organ listesinde dişi üreme sistemindeki temel organlardan olan ovaryum da bulunmaktadır [102]. Eş zamanlı yapılan ölçümlerde ovaryumda sentezlenen melatonin miktarının serumdaki melatoninden fazla olduğu ve bu miktarın folikül büyüklüğüyle doğru orantılı olduğu ifade edilmiştir [102]. Literatürde ovaryumun, kumulus ooforusu oluşturan granüloza hücrelerinin ve oositin de melatonin sentezlediği ifade edilmiştir [102]. Ovaryumda sentezlenen melatonin, progesteron üretimiyle ilişkilidir ve diğer ekstrapineal organlardakine benzer şekilde, ovaryumda sentezlenen melatonin de dolaşım sistemine verilmemektedir [107].

Melatonin, özellikle dişi üreme sistemi üzerindeki aktivitesini serbest oksijen radikallerinin yol açtığı hücresel hasar ile ilişkili olarak göstermektedir [108]. Ovulasyon boyunca özellikle makrofajlar, nötrofiller ve endotelial hücreler tarafından serbest oksijen radikalleri (ROS) [109] üretilmektedir. Özellikle embriyonik dönemde etkin kalınan ROS miktarına rağmen ovaryum açısından sağlıklı embriyonların doğması, folikülün oksidatif stresten ne derece korunduğunun en önemli belirtecidir. Söz konusu olan bu oksidatif stresin kumulus ooforus ve oosit tarafından sentezlenen melatoninin indirekt antioksidant aktivitesiyle

elimine edildiği ifade edilmiştir [107]. Melatoninin, oksidatif hasara etkin kalan embriyonlarda in vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi (ET) sonuçlarını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir [110]. ROS oogenezis ve ovulasyonda yardımcı olmasına karşın, aşırı sentezlenmesi oositte hasara neden olmaktadır [102, 111]. Bu bilgilerden yola çıkılarak, oositteki ROS üretim ve yıkımı arasında bir denge olduğu ve bu dengede de melatoninin kilit role sahip olduğu söylenebilir [102]. Melatoninin eş zamanlı olarak granüloza hücre luteinizasyonu ile gerçekleşen progesteron üretiminde meydana gelen ve inferlitle sonuçlanabilecek boyutlara ulaşan oksidatif hasara karşı da oositi koruduğu bilinmektedir [107]. İnsan foliküler sıvısında plazma proteinleriyle ilişkili olarak bulunan ve sistemik dolaşımdan gelen melatonin ise ovaryum üzerinde direkt aktivite göstermektedir [112, 113]. Foliküler sıvıdaki melatonin, döngüsel değişimler göstermesinin yanısıra, serumdaki seviyesinden yaklaşık 3 kat fazla bulunmaktadır [113]. Ovaryum hücrelerinde sentezlenen melatoninin foliküler sıvıya salındığı ileri sürülmektedir [114]. Bunun yanısıra IVF’te de oral yolla melatonin alan infertil kadınlarda foliküler sıvıda melatonin miktarında artış gözlenmiştir [110]. Ovulasyona girecek folikül seçimindeki temel mekanizmanın granüloza hücrelerindeki luteinleştirici hormon (LH) reseptörlerini kodlayan mRNA ekspresyon seviyesiyle ilişkili olduğu ifade edilmiştir. [115] İnsanlarda melatonin uygulamasıyla granüloza hücrelerinde LH reseptörlerinin arttığı belirlenmiştir [112]. Benzer olarak melatoninin ovulasyonda ki foliküler olgunlaşmada seks steroid hormon üretimini de etkilediği bildirilmiştir [112, 115].

2.8.3. Melatonin ve ovulasyon

Ovulasyon; steroid hormonlar, NO, prostaglandinler ve peptidleri içeren lokal faktörlerin etkisi altındadır. LH salınımı, biyokimyasal ve yapısal değişiklikleri tetiklemektedir [110]. Bu değişiklikler Graff folikülünün ruptüre olmasına neden olmaktadır. Progesteron üretimi luteinizasyon ve ovulasyon için temeldir. İnsanlarda progesteron ve östradiol konsantrasyonuna benzer şekilde melatonin konsantrasyonunun da küçük foliküllere nazaran büyük foliküllerde daha fazla olduğu bildirilmiştir [110]. İlginç şekilde foliküler progesteron ve melatonin konsantrasyonu arasında doğru orantı söz konusudur [107]. Foliküldeki yükselmiş melatonin miktarının, luteinizasyon ve sonrasında progesteron üretimiyle ilişkili olabileceği belirtilmektedir [116]. Başarılı bir ovulasyonun yükselmiş progesteron ve östrodiol seviyelerine ihtiyaç duyduğu bilinmektedir [117, 118]. Melatonin, prostaglandin ve östradiolun ovulasyondaki ilişkisi arasında net bir bilgi bulunmamakla birlikte , ratlarda

yapılan bir çalışmada, melatonin tedavisinin prostaglandin ve östradiol konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir [118].

2.9. Pkos Tarihi, Fizyolojisi ve Etiyolojisi

İnsan ovaryumlarındaki bütünsel sklerotik değişimler Chereau tarafından 1845 yılında tanımlanmış ve 1897 yılı öncesinde Avrupa’da bu değişimlere sahip ovaryumlar Gusserow, Martin, Wiedow, Zweifel gibi araştırmacılar tarafından rezekte edilmiştir [22]. Bu anormal durumla ilgili raporlar yıllar içinde ara ara devam etmiş olsa da, 1935 yılında, Stein ve Leventhal laparotomi esnasında bilateral kistik ovaryumla karakterize olan bu olguları, amonera veya oligomonera, infertil ve hirsute yedi kadın üzerinde tanımlamışlar ve söz konusu patolojilere sahip hastalara polikistik over sendromu demişlerdir [119, 120]. Başlarda polikistik ovaryumlu bireylerin mikroskobik görüntülerinin oldukça karakteristik olduğu düşünülse, normal boyutlara sahip ve çok az skleroz gösteren vakalarında olması bu patoloji için teşhisi zorlaştırmıştır [22]. Sonraları yapılan çalışmalarda rezeksiyon uygulanan hastaların % 40’ı normal boyutlarda ovaryuma sahip ve % 46 ‘sında da tunica albuginea da herhangi bir kalınlaşmanın söz konusu olmadığı dikkatleri çekmiştir [121]. Kapsüller kalınlaşmaya ek olarak genişlemiş Graaf folikülleri ve korpus luteum yokluğu ile teka luteinizasyonu ve hiperlazide sendromun karakteristik histolojik özellikleri arasında söylenirken [122] söz konusu çalışmaların aksine 45 sendromlu ve sendromsuz hasta grubunda hem ışık mikroskobik hem de elektron mikroskobik olarak yapılan çalışmalarda kapsüller kalınlaşma sırasında her iki grupta da normal seviyede fibroblazi gözleendiği ve kollajen yapısının da her iki grup içinde benzer şekilde olduğu ifade edilmiştir [122]. 1990’lara gelindiğinde ise, hiperandrojenizmle ilişkili kronik anovulasyon olarak tanımlanan sendrom, en yaygın endokrin hastalıklar arasında tanımlanmış [123] ve ironik bir şekilde sendromun teşhisi için yalnızca ovaryan morfolojik değişimlerin yeterli olmadığı vurgulanmıştır [120, 124]. Bu yıllarda araştırmacıların 175 anovuluar bireyde yaptıkları çalışmada, amonera bireylerin % 30 ‘unda ve oligomonera olan bireylerin % 70’inde ultrason görüntülerinde polikistik over sendromuna rastlanmış, bireylerin % 60’tan fazlası hirsute iken % 90 oranında serum luteinleştirici hormon (LH) seviyelerinin ve androjen seviyelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir [125, 126]. Bu yıllarda süregelen çalışmalarda , polikistik ovaryumlu kadınların klinikte teşhisinde heterojenite söz konusu olsa da sendromla ilgili hiperandrojenemi ve lüteinleştirici hormonun aşırı sentezlenmesi gibi biyokimyasal belirteçlerin olduğu ifade edilmiştir [127]. Araştırmacılar sendromun

teşhisinde yaşanan söz konusu heterojeniteye dayanarak 1990 yılında National Institutes of Health (NIH) sponsorluğunda gerçekleştirilen kongrede temel kriterleri belirlemişlerdir. (Çizelge 2.1) [128].

Çizelge 2.1. 1990 NIH , Polikistik Over Sendromu Teşhis Kriterleri

1.Kronik anovulasyon,
2.Diğer etiyolojiler elendikten sonra, hiperandrogenizmin klinik veya biyokimyasal bulguları.

Kriterler sendromun teşhisinde standart oluşturmalarının yanı sıra çok sayıda klinik çalışmada temel oluşturmuştur [129, 130]. Benzeri çalışmaların ardından sendromla ilgili, hamilelik oranları ve metabolik verilere dayanarak kriterler 2003 yılında (Çizelge 2.2) Rotterdam’da, European Society for Human Reproduction and Embryology and the American Society for Reproductive Medicine sponsorluğunda gerçekleştirilen toplantıda yeniden gözden geçirilmiştir [128] .

Çizelge 2.2. 2003 Yılı Revize Edilmiş Polikistik Over Sendromu Kriterleri

1.Oligo- veya anovulasyon
2.Hiperandrogenizmin klinik ve/veya biyokimyasal verileri
3.(Konjenital adrenal hiperplasia, androjen-sentezleyen tümörler,Cushing’s Sendromu) ve diğer etiyolojilerin elenmesinden sonra Polikistik ovaryumlar

PKOS’u teşhis etmek açısından Cushing’s sendromu gibi, benzer klinik semptomları gösteren patolojileri elimine etmek önemlidir. Bu bağlamda 2009 yılında The Androgen Excess and PCOS Society (AE-PCOS), sendromla ilişkili olan teşhis kriterlerini ve sendromun tanımını güncellemiştir (Çizelge 2.3) [131].

Çizelge 2.3. 2006 Androgen Excess Society PKOS Kriterleri

1.Hiperandrogenizm: Hirsutizm veya hiperandrogenemia
2.Ovaryan Disfonksiyon: Oligo-anovulasyon veya polikistik ovaryumlar
3.Androjen artışıyla ilişkili veya benzeri hastalıkların ekarte edilmesi

Risk popülasyonu üreme çağındaki kadınlar olan PKOS heterojen bir sendromdur ve aşağıdaki semptomlarla karakterizedir;

- a) *Menstrual ve ovulatuvar disfonksiyon*; %25-30 oranda, oligo-amenorea veya menstrual disfonksiyonla karakterize PKOS ‘lu bireyler izlenmektedir. PKOS puberteyle beraber ortaya çıkan ve sonraki yıllarda da devam eden menstrual disfonksiyona neden olmaktadır [132].

- b) *Hiperandrogenemia*; PKOS'lu kadınların yaklaşık %70 i yükselmiş T (testosteron) seviyesi göstermektedir. T içeren serum androjen seviyeleri hiperandojenik hastalıkların teşhisi için adjuvant olarak kullanılmaktadır. Bazal gonadotropin ölçümleri rutinde PKOS teşhisi için daha az kullanılmaktadır.
- c) *Hirsutizm*; Klinik olarak kadınlarda aşırı tüylenmeyle birlikte erkeğe benzer morfolojiye sahip olma olarak tanımlanmaktadır [133]. Hastalık, genellikle üreme çağındaki dişilerin %5-10 'unu etkilerken polikistik ovaryumlu kadınların % 85-90' ında görünmektedir [134] ve ovaryan veya adrenal bez kaynaklı aşırı androjen senteziyle ilişkilidir [133].
- d) *Polikistik ovaryumlar*; Sendromunda kadınların % 75- 90 oranın da polikistik ovaryumla karakterize olduğu görülmüştür. Üreme çağındaki bu morfolojik görünüme sahip kadınların % 20 'sinde PKOS bulunmaktadır.
- e) *İnsülin direnci ve hiperinsulinemia*; hastaların % 50'si ile % 70 inde bulunmaktadır. ; diabetik kadın popülasyonu hastalığın gelişmesinde risk altında iken söz konusu durum metabolik sendromlu kadınlarda tam olarak tanımlanmış değildir.

Sendromla benzer semptomlara sahip patolojilerde söz konusudur ve sendromun teşhisinde tekli bir test bulunmamaktadır. Buna dayanarak PKOS teşhisinde aşağıdaki hastalıkların göz önünde bulundurularak teşhisten önce elimine edilmesi gerekmektedir;

- a) Hypo- veya hyperthyroidism veya hyperprolactinemia; tiroid disfonksiyonu olan hastalarda, PKOS disfonksiyonunun kesinliği söz konusu olmasada, bu hastalıkların düşük prevalansı ve teşhisindeki düşük maliyetlede ilişkili olarak hastalardan PKOS taraması yaptırması istenmektedir.
- b) 21-hydroxylase-deficient NC- Congenital Adrenal Hyperplasia; ailesel otozomal bir hastalıktır ve aşırı androjen üretimiyle sonuçlanmaktadır . Bu hastalığı teşhisinde aşırı androjen sentezi olan hastalarda rutin 17-hydroxyprogesterone taramaları yapılmaktadır [135]. Ancak söz konusu enzim PKOS teşhisinde de kullanılmaktadır. Bu nedenle PKOS teşhisinde Congenital Adrenal Hyperplasia ihtimalide elimine edilmelidir.
- c) Cushing's syndrome; bu hastalığın kadınlarda görülme sıklığı erkeklerde görülme sıklığının yaklaşık 4 katıdır ve dişi bireylerde PKOS 'la benzer şekilde hiperandrogenizm, menstrual bozukluklar ve hirsutizm gibi semptomlara sahiptirler. Bu sendromda PKOS'tan şüphelenilenlerin oranı az olsada, PKOS'lu bireylerin bu sendrom açısından da taranması gerekmektedir [131, 136].

- d) Androgen-secreting neoplasms (ANS); prevalansı çok yaygın olmamakla birlikte, ANS hızla ilerleyen hiperandrojenizm kökenli bir hastalıktır. Sendromda kadınlar akne ve hirsutizm gibi semptomlar göstermektedir[137]. Sendrom dışı popülasyonda yaklaşık %5-15 arasında prevalans göstermektedir [137] ve ovaryum kökenli androjen-secreting neoplasm ise hiperandrojenik hastalarda yaklaşık 1/300 -1/1000 oranda görünmektedir [138].Hastalığı teşhis etmek için serum testosteron seviyelerine bakılmaktadır.
- e) The HAIR-AN syndrome (Hyperandrogenism-InsulineResistance-Acanthosis Nigricans); sendrom hiperandrogenism, insülin direnci ve acantosis nigricans semptomlarıyla PKOS'un alt fenotipik özelliklerinde seyretmektedir [139]. Sendromun en belirgin semptomu yükselmiş insülin seviyesiyle, insülin direncidir ve hiperandrojenizimli kadınların yaklaşık % 5'inde izlenmektedir [139]. İnsülin seviyesinin artmaya başlamasıyla, insülin insülin-like-growth faktörlerle etkileşime girerek ovaryumdaki androjenlerin aşırı üretimini indüklemektedir [139, 140]. Özetle bazı hiperandrojenik hastaların, yaklaşık % 3'ü, HAIR-AN sendromu göstermektedir ve bu hastalar artmış hiperinsülinemi ile karakterizedirler ve acantosis Nigricans ile çeşitli derecelerde ki semptomlarıda göstermektedir. PKOS teşhisinde hastalığın ekarte edilmesi önemlidir.
- f) Idiopathic hirsutism; Hirsute bireylerin yaklaşık % 5-7 arasında görülmektedir. Normal ovulasyon, normal androjen seviyeleri ve normal ovaryan morfolojisiyle karakterizedir ve sendromun en önemli belirteci artmış androjen seviyeleridir [141].
- g) Hyperandrogenic patients; PKOS teşhis edilmeden önce diğer androjenik hastalıkların ekarte edilmesi önemlidir [131].

PKOS tam olarak aydınlatılmamış mekanizmasıyla, uygulanan tedaviler açısından da heterojenite göstermektedir [142]. Bu bağlamda tedavi yöntemi açısından temel nokta sendromun infertiliteyle ilişkisidir [142]. Obezite PKOS'lu kadınlarda önemli bir etkidir ve insülin direnci gibi patolojilere zemin hazırlamaktadır. Söz konusu durumda bireylere yaşam standartlarına uygun diyet uygulanmaktadır [143]. Beden ağırlığının % 5'inin kaybedilmesi hirsutizm ve akne gibi semptomlarda da ciddi oranda azaltma sağlarken fertilitiyi artırmaktadır [144]. Sendromdaki semptomların tedavisinde diyetin yanısıra, klomifen sitrat, metformin, aromataz inhibitörler ve düşük doz gonadotropinde kullanılmaktadır [142].

PKOS'ta ovaryan hiperandrojenizm ve değişmiş intraovaryan parakrin sinyalizasyonu foliküller büyümeyi hasarlayabilir. PKOS'ta folikülogenezis süresince intrafoliküler mikroçevrede değişiklikler, anormal gonadotropin seviyeleri, endokrin-parakrin faktör değişikliği, metabolik disfonksiyon ile ilişkili olarak bozulmuş oosit maturasyonu, düşük fertilizasyon oranları, embriyonik gelişim yetersizliği ve bozulmuş aydınlık/karanlık evre siklusu gözlenmektedir [131, 145-147]. PKOS'lu dişilerde FSH eksikliğiyle ve LH'ın aşırı sentezlenmesiyle bağlantılı olarak antral folikül sayısında artış gözlenmektedir ve söz konusu durum dominant folikül seçiminde hasara neden olmaktadır [148, 149]. Artmış LH seviyeleri, FSH salınımı baskılayarak antral folikül sayısında ve oositteki apoptoz sinyallerinde artışa neden olmaktadır [150, 151]. Yapılan  alışmalar, PKOS'ta primer ve sekonder folikül sayılarının normale göre yaklaşık 2 kat fazla olduğunu gösterilmiştir [152-154]. Sendromlu kadınlarda LH'ın yanısıra artmış AMH seviyeleride oosit olgunlaşmasında duraksamalara neden olmaktadır [155]. Sağlıklı menstrual siklusta görev alan, oositte salınan büyüme faktörleri olan GDF 9 ve BMP 15 foliküler büyümenin yanı sıra foliküler büyümenin kontrolünde de rol almaktadır [148] ve folikülogenezde gerekli olduğu bilinen bu büyüme faktörlerinin anormal ekspresyonlarının PKOS patogeneziyle ilişkili olabileceği ileri s r lm ştir [153].

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Uygulama

Çalışmada 6-8 haftalık *Sprague dawley* cinsi 32 adet dişi rat kullanıldı. Ratlar ortalama $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık döngüde, ad libitum içme suyu ve standart yem ile beslendi. Ratlardan rastgele seçim yapılarak 4 deney grubu oluşturuldu (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Deney grupları ve uygulama sürelerini belirten tablo

DENEY GRUPLARI				
GRUP NO	ADI	ETKEN MADDE	DENEK SAYISI	UYGULAMA SÜRESİ
1.	Sham	% 1 CMC	n=8	21 gün
2.	Melatonin	2 mg/kg Melatonin+%1 CMC	n=8	21 gün
3.	PKOS	1 mg/kg Letrozol+% 1 CMC	n=8	21 gün
4.	PKOS+Melatonin	2 mg/kg Melatonin+1 mg/kg Letrozol+% 1 CMC	n=8	21 gün

1. gruba, diğer ajanların çözücüsü olan CMC %1'lik oranda 21 gün uygulandı ve bu grup sham kontrol olarak kullanıldı. 2.gruba; 21 gün süresince %1'lik CMC gavajla, 2mg/kg melatonin ise subkutan verildi. 3. grup deneysel PKOS oluşturulan grup olarak belirlendi ve modeli oluşturmak adına 21 gün süresince % 1'lik CMC de çözünmüş 1 mg/kg letrozol gavaj yoluyla uygulandı. 4. gruba ise 21 gün süresince, 2. ve 3. gruplara yapılan uygulamalar birlikte olacak şekilde yapıldı [156, 157]. Karanlıkta sentezlendiği bilinen endojen melatoninin etkisinden yararlanmak adına tüm ajanlar her gün saat 16.00 da verildi. Kolpositolojikal ölçümler için araştırmanın 14. gününden itibaren bir hafta süresince her gün aynı saatte olmak üzere vajinal smear örnekleri alındı, örnekler 60 derece etüvde 2 saat ısı ile tespit edildikten sonra % 5'lik Toluidin blue O ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

3.1.1. Letrozol hazırlanması ve uygulama biçimi

3. ve 4. gruplarda deneysel PKOS modeli oluşturmak için, 1 mg/kg letrozol (TCI, Ref:L0248, lot:ROGYC-EN, 1 gr Tokyo), Carboxy methyl cellulose'un (=CMC, Sigma,

lot:#SLBR1692V Germany) % 1'lik sulu çözeltisinde çözülerek 21 gün süresince gavaj yoluyla uygulandı [156, 157] .

3.1.2. Melatonin

2. ve 4. gruplardaki deneklere, 21 gün, 2 mg/kg melatonin (Sigma 250mg, lot:#SLBQ9501V Germany) uygulandı. Uygulanan melatonin 0,02 ml etanolde çözüldükten sonra PBS (Phosphate Buffer Saline) ile dilüe edilip deneklere subkutan verildi [158]. Sham grubu ile karşılaştırma yapabilmek adına, aynı gruba ait deneklere gavaj yoluyla % 1'lik CMC de uygulandı.

3.2. Deneyin Sonlandırılması

Süre bitiminde denekler 45 mg/kg, % 10'luk Alfamine (Seri no:1705176-01) ve 5 mg/kg, % 2 'lik Alfazyne (seri no:1610302-04, Hollanda) olacak şekilde yüksek doz anestezi ile feda edilerek, ovaryum dokuları alındı.

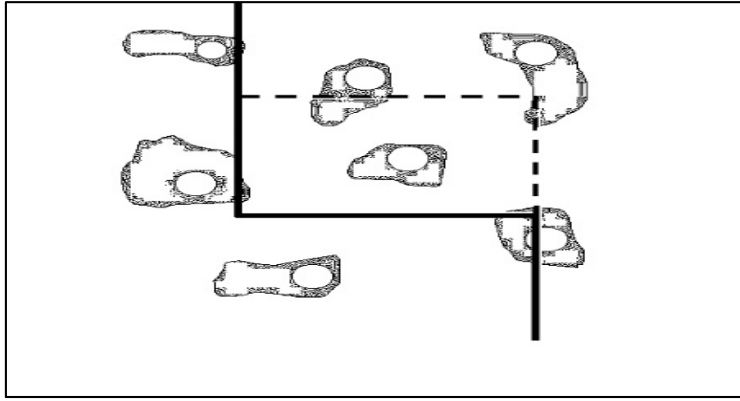
3.3. Histolojik Yöntem

3.3.1. Hematoksilen – eozin boyama

Ovaryumlarda gruplar arasında yapısal farklılıkları ışık mikroskopik düzeyde incelemek amacıyla, süre bitiminde alınan ovaryum dokuları % 10 nötral formalinde 72 saat tespit edildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinin geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler etüvde 63°C'de 2 saat deparafinize edildikten sonra % 100, % 96, % 80, % 70 % 50, azalan alkol serilerinden geçirildi. 10 dk akarsuda yıkandıktan ve alkol uzaklaştırıldıktan sonra Harris Hematoksilen solüsyonunda 10 dk tutuldu ve akar suya alındı. 10 dk akar suyun altında boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Ardından % 1'lik HCl solüsyonunda 1-2 dip yapıldıktan sonra kesitler tekrar akar suda yıkandı. Lamlar fazla su uzaklaştırıldıktan sonra 10 dk Eozin solüsyonunda bekletildi. Fazla boyayı uzaklaştırmak için 10 dk akar suda yıkandıktan sonra kurutularak % 50, % 70, % 80, % 96, % 100 artan alkol serilerinden geçirildi ve suyun kesitlerden uzaklaştırılması sağlandı. 45 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak resimlendirildi.

3.3.2. Folikül sayısı

Biyolojik materyallerdeki hücre gibi tanecik sayılarının belirlenmesi için bu taneciklerin birim hacimdeki sayısal yoğunluklarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu yöntemle hücre saymak için, ilgili materyalden histolojik kesit alınması gerekmektedir. Bu kesitlerde kesit alma doğrultusuna dik doğrultuda yerleşmiş olanlar paralel yerleşmiş olanlara göre, büyük taneciklerde küçük olanlara göre daha fazla örneklenmektedir [159]. Bu tanecik izdüşümünden yararlanılarak tanecik sayısını hesaplamak için kesitlerde ortaya çıkan tanecik izdüşümlerinin belirli bir alanla sınırlandırılması gerekmektedir. Bu amaçla tarafsız sayım çerçevesi kullanılmaktadır. Bu çerçeve bir kalın, bir düz, bir ince ve bir de kesikli kenardan oluşmaktadır. Temel olarak ince ve kesikli çizgiler dahil kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de hariç kenarlar olarak isimlendirilir.



Şekil 3.1. Şematik olarak bir ekran üzerine yerleştirilmiş tarafsız sayım çerçevesi görülüyor

Histolojik bloklarda total doku hacminin hesaplanması mümkün olmadığından hacmi belirlemek için tüm bloktan seri kesit alınır ve her bir kesitte yapıya ait izdüşüm alanı belirlenir [159, 160].

Bu çalışmada seri kesitlerden rastgele örnekleme prensibi doğrultusunda preparat seçimi yapıldı ve her preparat fotoışık mikroskopta resimlendirildi. Sonrasında powerpoint programında tarafsız sayım çerçevesi fotoğraflar üzerine yerleştirilerek dahil kenarlarda ve merkezde yerleşmiş olan foliküller sayılarak bir ovaryum dokusunda bulunan foliküller belirlendi [159].

3.3.3. İmmünohistokimyasal inceleme

İndirekt immünohistokimya yöntemi kullanılarak folikülogenezisde önemli antikorların işaretlemesi yapıldı. Bu amaçla polilizinli lamlara alınan kesitler 1 gece 37°C deparafinize edildikten sonra etüv ısısı 57°C' ye çıkarılarak 1 saat bekletildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15'er dakika ksilolde tutulduktan sonra sırasıyla % 100'lük, % 96'lık, % 80'lik ve % 70'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek rehidratasyonları sağlandı. Ardından 2 kez 5'er dakika distile suda bekletilerek alkolden kurtarıldı. Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında 1 M sitrat tamponunda (pH:6.0) (Thermo, ref: AP-9003-500, lot:MK17121, UK) 3x5 dk etkin bırakıldı ve oda ısısında 20 dk soğutulduktan sonra Pap pen ile kesitler sınırlandırıldı. Camlar % 3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılarak dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra, camlar PBS, (Thermo, ref:AP-9009-10, lot:BBI120127, UK) (pH: 7,4) ile yıkandı. Bundan sonraki aşamalara indirekt immünohistokimyasal kit (Novex Life Technologies, ref:859043, lot:1838146A, USA) ile devam edildi. Öncelikle özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla Ultra V Block uygulandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan anti-GDF 9 (1/200) (Bioss, 100 µl Rabbit Polyclonal Antibody, ref:bs-3759R, lot:980691W, USA), anti-BMP 15 (1/100) (Bioss, 100 µl Rabbit Polyclonal Antibody, ref:bs-6612R, lot: YE1214W, USA) ve anti-Melatonin Reseptör 1 (1/300) (Bioss, 100 µl Rabbit Polyclonal Antibody, ref:bs-0027R, lot:AF10201536,USA) primer antikorlarına bir gece +4°C' da etkin bırakıldı. Süre sonunda dokular 3x3 dk PBS ile yıkandıktan sonra, 10 dk biyotinli sekonder antikor uygulandı. Dokular, 3x3 PBS ile yıkanmasının ardından enzimin biyotine bağlanması amacıyla 10 dk streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı. Lamlar tekrar 3x3 PBS ile yıkandıktan sonra kromojen DAB (3,3'diaminobenzidine) (ScyTek, ref:ACB060, lot:42454, USA) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Harris'in Hematoksileni (0B52Y092, Merck, Germany) kullanıldı. Sonrasında preparatlar hızlıca azalan alkol serilerinden geçirilerek kurutuldu ve 20 dk. ksilole etkin bırakılarak parlatılmaları sağlandı. Son olarak preparatlar entellan (Merck, lot:HX378130, Germany) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak resimlendirildi. İmmünohistokimyasal tutulumlar her bir antikor ve her grup için değerlendirilerek gruplar arasında tutulum yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespiti için uygun istatistiksel veriler oluşturuldu.

3.3.4. H-skor analizi

İmmünohistokimyasal işlemlerden sonra, her bir antikor için elde edilen preparatlarda X40 büyütmede 1 merkez ve 5 perifer alanda immünpozitif hücreler, tutulum yoğunluklarına göre aşağıda belirtilen semi-kantitatif skorlama yöntemi ile sayıldı. H score'un istatistiksel analizlerinde Sigma Stat 4.0 programında One Way Repeated Measures varyans analizi ve Holm-Sidak metodu kullanılmıştır. 0,05'ten küçük P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

0: immünreaksiyon yok (%0)

+1: zayıf immünreaksiyon ($\leq$ %30)

+2: orta dereceli immünreaksiyon (%30-%60)

+3: kuvvetli immünreaksiyon ($\geq$ %60)

Elde edilen sayısal veriler $\sum Pi (i+1)$ formülü ile hesaplandı (i: boyanma yoğunluğu, Pi: boyanan hücre yüzdesi).

3.4. Real-Time PCR

3.4.1. Rat ovaryum dokusundan total RNA saflaştırılması

Deney sonunda steril bir şekilde çıkartılan ovaryum dokuları steril petri kabında steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA (Ribonükleik Asit) izolasyonuna uygun (50 mg- 100 mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNaz (Deoksiribonükleaz) ve RNaz (Ribonükleaz) free 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu. Ovaryum dokuları, analiz gününe kadar - 80°C' de saklandı. Doku örneklerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıda yazılı olan protokol ile total RNA saflaştırıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

3.4.2. Dokudan RNA izolasyonu

1,5 ml'lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle veya mortar ile homojenize edildi. Örnekler çözünmeye başladığı anda tekrar sıvı azotta donduruldu ve homojenizasyon işlemine devam edildi. Homojenizasyon işlemine 1000 µl

TRI Reagent® solüsyonu ile devam edildi. (Doku büyüklüğü arttığı oranda kullanılan TRI Reagent® miktarında arttırıldı). Örnek hacminin, homojenizasyon sırasında kullanılan TRI Reagent® hacminin % 10'nu geçmemesine dikkat edildi. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Ardından 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca (tamamen karışmaya kadar) vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı. Üst faz yeni bir steril 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Başlangıçta kullanılan TRI Reagent® miktarının yarısı kadar izopropanol eklenip vortekslendi. Örnekler 1 ya da 1,5 saat -20 °C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı. DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 µl Dnaz (µg başına 5U DNaz), 300 µl Dnaz Buffer I (200 mM Tris-HCL (pH:8,4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dakika 37 °C sıcaklığında bekletildi. Örneklerin üzerine 300 µl 25 mM EDTA eklendi ve 65 °C'de 10 dakika bekletildi. 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı. 1000 µl % 75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı. Peletin üzerine tekrar 1000 µl % 75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı. Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl Diethyl pyrocarbonate (DEPC)'li su ile sulandırıldı.

3.4.3. Revers transkriptaz PCR (Rt-PCR) yöntemi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de (NanoDrop, ND-1000, Thermoscientific, ABD) 260/280 nanometre (nm) dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak Random Hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.2' de verilmiştir. cDNA sentezi için Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) karışımı ince çeperli 0,2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA üzerlerine eklendi.

Çizelge 3.2. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hekzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

3.4.4. Kantitatif real time PCR yöntemi

İlgili genlerin ifadesinin kantitatif belirlenmesi için kantitatif Real Time PCR (qPCR) yöntemi kullanılacaktır. İlgili genlere özgü primer çiftleri kullanılarak ilgilenilen bölge LightCycler480 cihazında çoğaltıldı. Çoğaltılan PCR dizisinin özgünlüğünü belirlemek için primere özgü prob dizisi kullanıldı. Her bir 20 µL'lik reaksiyon için; 2 µL cDNA, LC480 TaqMan® Master karışımı, 2,0 mM MgCl₂, genlere özgü prob, her bir primerden 0,5 µM eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra, PCR koşulları optimize edildi. 95°C'de 10 dakikalık denatürasyon, 50°C'de 10 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 10 saniyelik zincir uzaması basamaklarını oluşturacak şekilde 45 döngüden oluşan PCR tepkimesi uygulandı. İfadelenme düzeyinin karşılaştırılması için Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA seviyeleri referans olarak alınacaktır. Sonuçlar LightCycler480 cihazında GAPDH mRNA seviyeleri ile karşılaştırılarak belirlenen genlere ait ifadenin düzeyi kantitatif olarak belirlendi.

3.4.5. Ters transkriptaz PCR (RT-PCR) programı

Otomatik ısı döngü cihazı, Çizelge 3.3'de belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lerden cDNA sentezi elde edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılmaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 3.3. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1
Soğutma	4 °C	-	1

3.4.6. Gen ifadelenmesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi

BMP15, GDF9 ve MT1 genlerinin mRNA ifadesinin kantitatif değerlendirilmesi Real-time PCR yöntemi ile LightCycler 480TM cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu ve LightCycler Probe Master karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. BMP15, GDF9 ve MT1 genlerinin ifadelene düzeylerini normalize etmek için beta aktin (Actb) mRNA düzeyi referans olarak alındı. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi Çizelge 3.4'de verilmiştir. Kullanılan problemler Roche Diagnostic'ten temin edilmiştir. Tüm cDNA örnekleri her bir gen için en az üçer kez çalışıldı.

Çizelge 3.4. Spesifik Primer Dizileri ve UPL Prob Numaraları

Gen adı	Forward Primer	Reverse Primer	UPL Prob Numarası
Actb	5'- CCCGCGAGTACAACCTTCT -3'	5'- CGTCATCCATGGCGAACT -3'	17
Bmp-15	5'- GCAATGAGGCTTCTCAGAGGT -3'	5'- AGTTGATGGCGGTAGACCA -3'	21
Gdf-9	5'- ATACCGTCCGGCTCTTCAG -3'	5'- TTAAATAGCAGGTCCACCATTG -3'	3
Mtnr1a	5'- ACTATCGTGGTGGACATCCTG -3'	5'- TGCCACAGCTAAACTCACCA -3'	62

3.4.7. BMP15, GDF9 ve MT1 genleri için Real-Time PCR tepkime karışımı

BMP15, GDF9 ve MT1 genlerine uygun verilen primer ve problemler kullanılarak Real-time PCR tepkimesi, LightCycler® 480 cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3. 5. Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	3,7 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1,2 µL
Primer F (10 pmol/µl)	2,5 pmol	0,5 µL
Primer R (10 pmol/µl)	2,5 pmol	0,5 µL
UPL prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0,1 µL
UPL Probe Master karışımı (10x)	1x	2,5 µL
cDNA	-	1,5 µL

3.4.8. LightCycler® 480 deney programı

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96'lık plate'lere dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi. 96'lık plate 3000 rpm'de 20 sn santrifüj edildi. 96'lık plate cihaza

yerleştirildikten sonra Çizelge 3.6’da belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. BMP15, GDF9, MT1 genleri için aynı program kullanıldı. Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait BMP15, GDF9, MT1 ve Actb genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. BMP15, GDF9 ve MT1 gen ifade düzeyleri Actb ifade düzeyine göre normalize edildi.

Çizelge 3.6. MT1, GDF9 ve BMP15 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

3.4.9. İstatistiksel analiz yöntemleri

BMP15, GDF9 ve MT1 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “Relative Expression Software Tool (REST; Qiagen, 2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı [161]. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. 0.05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

3.5. Western Blot Yöntemi

3.5.1. Ovaryum doku örneklerinden total protein ekstraksiyonu

Deney gruplarının ovaryum doku örnekleri serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra protein izolasyonunun yapılacağı güne kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. MT1 reseptörü, GDF 9, BMP 15, protein düzeyleri Western Blot (WB) yöntemiyle belirlendi. 100 mg doku örneği alınarak, buz üzerinde steril bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra proteaz ve fosfataz inhibitörleri ile desteklenmiş RIPA tamponu kullanılarak pipetaj yardımıyla parçalanan hücrelerden protein izolasyonu yapıldı. Elde edilen total protein miktarı BCA Protein Assay kiti kullanılarak ölçüldü. Kit protokolüne uygun olarak 25 μg ile 2000 μg konsantrasyon arasında değişen 7 adet Bovine Serum Albumin (BSA) dilüsyonları oluşturuldu. Kit içerisinde bulunan A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak elde edilen karışım standart protein dilüsyonlarına eklendi ve 30 dk 37°C 'de inkübe edildi. Süre sonunda proteinlerin konsantrasyonları SpectraMax M3 (Molecular Devices, ABD) cihazında 562 nm dalga boyunda ölçülerek standart eğri hazırlandı ve bu eğri yardımıyla protein miktarları belirlendi. Housekeeping olarak beta-aktin (ACTB) proteini kullanıldı. Proteinlerin ayrımı için ilk olarak SDS-PAGE hazırlandı. Jelin dökülmesi sırasında kullanılacak olan camlar alkol ile temizlendikten sonra jel kasetine yerleştirildi sızma olup olmadığı kontrol edildi. Camlar kasete konulduktan sonra ayırma jeli için 15 ml % 12'lik akrilamid jel karışımı hazırlandı. Bu amaçla 4.9 ml dH_2O , 6 ml % 30'luk akrilamid mix, (pH:8.8) 1.5 M Tris karışımından 3.8 ml, % 10'luk SDS'den 0.15 ml eklenerek çözelti hazırlandı. Çözelti içine jel dökülmeden hemen önce % 10 APS'den 0.15 ml ve 0.006 ml TEMED eklendi. Ayırıcı jel karışımı daha önceden işaretlenmiş bölgeye kadar döküldükten sonra üstüne dH_2O eklenerek jelin üstünün düz olması sağlandı ve polimerizasyon beklendi. Jel donduktan sonra 7.5 ml yığınlama jeli hazırlandı. Bu jel için % 4'lük akrilamid jel karışımı hazırlandı. Bu amaçla 4.6125 ml dH_2O , 1.005 ml %30'luk akrilamid mix, (pH:6.8), 0.5 M Tris karışımından 1.875 ml, % 10'luk SDS'den 0.075 ml eklenerek çözelti hazırlandı. Çözelti içine jel dökülmeden hemen önce % 10' luk APS'den 0.0375 ml ve 0.0075 ml TEMED eklenerek donmuş ayırma jelinin üstüne döküldü. Taraklarda yerleştirildikten sonra yığınlama jelinde donması beklendi. Laemni bufferle hazırlanıp -20°C 'de bekleyen proteinler 95 derecede 5 dk denatüre edildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ derecede 5 dk soğuması beklendi. Donan jelden running buffer içinde taraklar çıkarıldıktan sonra kuyulara yükleme yapıldı. Proteinlerin anot-katod yürütme tamponu aracılığıyla moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı. Ayrılan proteinlere wet transfer uygulanarak daha önceden metanol ile ıslatılmış PVDF membranlara elektroforetik olarak aktarıldı. Aktarımın ardından

membranlar oda sıcaklığında 1- 1.5 saat TBST içerisinde hazırlanmış BSA ile yatay çalkalayıcı üzerinde bloke edildi. Bloking işlemi sonucunda primer antikorların uygun dilasyonları ile +4°C’de bir gece inkübe edilen membranlar, TBST ile 3 defa 5 er dakika yıkandıktan sonra HRP konjuge anti-rabbit IGG sekonder antikorları ile 1-2 saat oda sıcaklığında muamele edildi. TBST ile 3 defa yıkama işlemi yapıldıktan sonra, membran üzerine Super Signal Chemiluminisans (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, Almanya) reaktifleri 1:1 oranında karıştırılarak 5 dakika bekletildi ve floresan sinyal oluşturması sağlandı. Elde edilen floresan sinyal ile bantların, Kodak Gel Logic 2200 Carestream (ABD) görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekilerek protein bantları analiz edildi.

4. BULGULAR

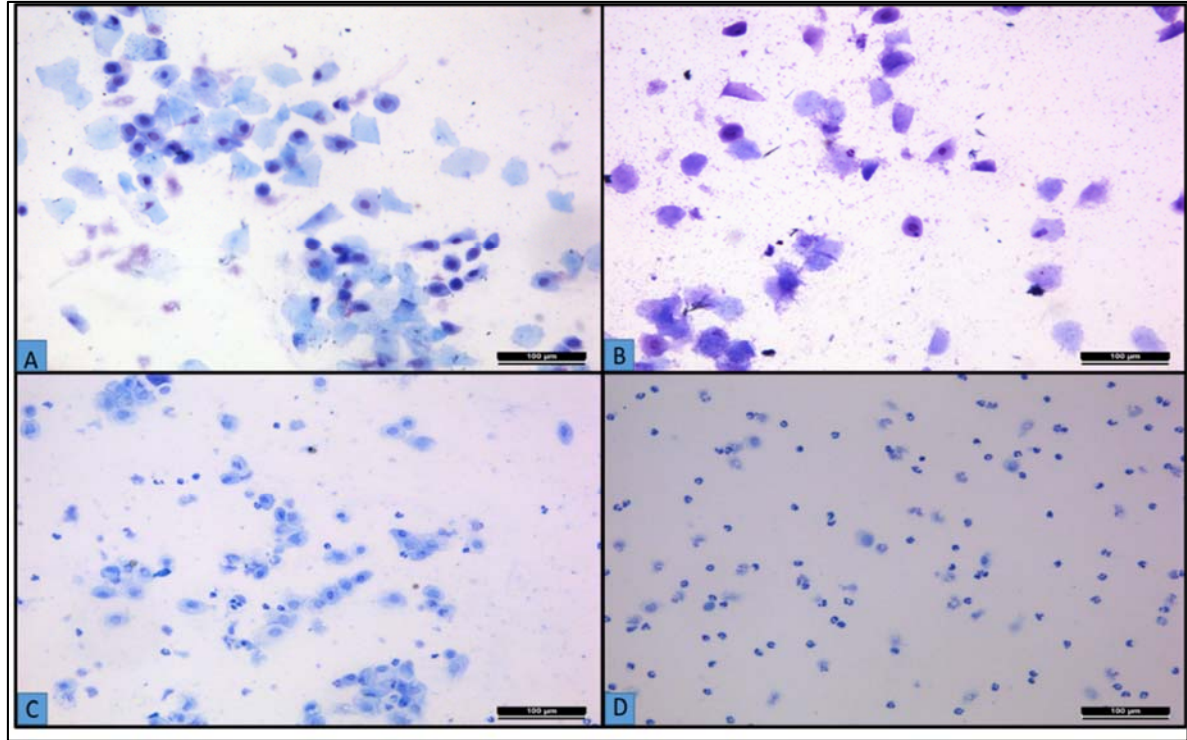
4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. Vajinal smear bulguları

PKOS patofizyolojisinin belirteçlerinden biride ratlarda bozulmuş östros döngüdür. Çalışmada deney bitimine son bir hafta kala vajinal smear örnekleri toplanmıştır. Toluidin blue ile boyanan örnekler, östros döngünün uzunluğuna karar verilmesi için ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Çizelge 4.1’de ratlarda siklus özellikleri özetlenmiştir [162]. Buna göre bizim çalışmamızda da proöstros döngü belirteci olarak küçük çekirdekli epitelyal hücreler (Resim 4.1A), östros döngü belirteci olarak çok sayıda kornifiye epitelyal hücreler (Resim 4.1B), metaöstros döngünün belirteci olarak lökositler (Resim 4.1C) ve diöstros döngü belirteci olarak da çok fazla sayıdaki lökosit (Resim 4.1D) baz alınmıştır. Vajinal smear bulguları neticesinde letrozol uygulanan gruplarda östros döngüde uzamalar olduğu belirlenmiş (Çizelge 4.2-4.5) ve bu sonuçlar PKOS patofizyolojisiyle uyumlu bulunmuştur [163].

Çizelge 4.1. Ratlarda siklus bölüm ve vajinal smear morfolojik özelliklerini içeren tablo [171]

Cycle Fazı	Saat	Vajinal Smear Morfoloji
Proöstros	12	Çekirdekli epitel hücreleri
Östros	12	75 %çekirdekli hücreler, 25%kornifiye hücreler
Metaöstros	21	Çekirdekli ve kornifiye çok sayıda lökosit
Diöstros	57	Lökositler



Resim 4.1. A; proöstro, B;östro, C;metaöstro, D;Diöstro

Çizelge 4.2. Sham grubuna ait döngü tablosu

Denek Numarası	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN	7.GÜN
1A-1	Proöstro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Östro	Metaöstro s	Diöstro
1A-2	Metaöstro	Metaöstro	Diöstro	Östro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro
1A-3	Östro	Metaöstro	Metaöstro	Diöstro	Östro	Metaöstro s	Diöstro
1A-4	Östro	Metaöstro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Östro	Metaöstro
1B-1	Metaöstro	Diöstro	Diöstro	Proöstro	Metaöstro	Diöstro	Östro
1B-2	Proöstro	Metaöstro	Diöstro	Diöstro	Proöstro	Östro	Metaöstro
1B-3	Östro	Metaöstro	Diöstro	Diöstro	Östro	Metaöstro s	Diötro
1B-4	Metaöstro	Metaöstro	Metaöstro	Diöstro	Diöstro	Prosötro	Östro

Çizelge 4.3. Melatonin grubuna ait döngü tablosu

Denek Numarası	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN	7.GÜNt
2A-1	Östro	Metaöstro	Diöstro	Diöstro	Östro	Metaöstro	Diöstro
2A-2	Proöstro	Östro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Östro	Metaöstro
2A-3	Diöstro	Diöstro	Östro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Östro
2A-4	Diöstro	Proöstro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Östro	Metaöstro
2B-1	Diöstro	Östro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Metaöstro	Metaöstro
2B-2	Östro	Östro	Metaöstro	Diöstro	Diöstro	Östro	Metaöstro
2B-3	Östro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Östro	Metaöstro	Diötro
2B-4	Proöstro	Östro	Metaöstro	Diöstro	Proöstro	Östro	Metaöstro

Çizelge 4.4. PKOS grubuna ait döngü tablosu

Dene k Numarası	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN	7.GÜN
3A-1	Proöstro	Östro	Östro	Östro	Östro	Metaöstro	Östro
3A-2	Östro	Östro	Metaöstro	Östro	Östro	Östro	Östro
3A-3	Proöstro	Östro	Östro	Östro	Östro	Östro	Östro
3A-4	Diöstro	Proöstro	Östro	Östro	Proöstro	Metaöstro	Proöstro
3B-1	Proöstro	Östro	Östro	Östro	Östro	Proöstro	Östro
3B-2	Östro	Östro	Östro	Proöstro	Östro	Östro	Östro
3B-3	Östro	Östro	Östro	Östro	Östro	Proöstro	Östro
3B-4	Proöstro	Östro	Östro	Östro	Proöstro	Östro	Östro

Çizelge 4.5. pkos+Melatonin grubuna ait döngü tablosu

Denek Numarası	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	7.Gün4
4A-1	Proöstro	Östro	Östro	Östro	Metaöstro	Metaöstro	Östro
4A-2	Östro	Östro	Östro	Metaöstro	Östro	Östro	Östro
4A-3	Proöstro	Östro	Östro	Östro	Östro	Metaöstro	Östro
4A-4	Diöstro	Proöstro	Östro	Östro	Metaöstro	Proöstro	Östro
4B-1	Proöstro	Östro	Östro	Metaöstro	Östro	Proöstro	Östro
4B-2	Proöstro	Östro	Östro	Metaöstro	Östro	Östro	Östro
4B-3	Metaöstro	Östro	Östro	Proöstro	Östro	Östro	Östro
4B-4	Proöstro	Östro	Östro	Östro	Proöstro	Östro	Östro

4.1.2. Hematoksilen – eozin bulguları

Sham grubu hematoksilen – eozin boyamalarında, ovaryumun küçük büyültmeli incelemelerinde kortekste gelişiminin çeşitli evrelerindeki foliküller olağan yapılarıyla gözlemlendi. Medulla bol vaskülarize bağ dokuyla karakterizeydi (Resim 4.2). Büyük büyültmeli incelemelerde primordiyal foliküllerin merkezde yerleşmiş oosit ve çevresindeki yassı folikül hücreleriyle normal yapıda olduğu izlendi. Multilaminar primer folikülde zona pellusidanın oluştuğu, granüloza hücrelerinin çok sıralı bir hal aldığı belirgindi (Resim 4.3). Sekonder foliküllerde ise teka interna ve eksternanın şekillendiği, antrumun oluşmaya başladığı izlendi (Resim 4.4). Aynı gruba ait Graaf foliküllerinde folikül duvarı çok sayılı granüloza katmanı, teka interna ve teka eksterna ile normal yapılarıyla izlendi (Resim 4.5).

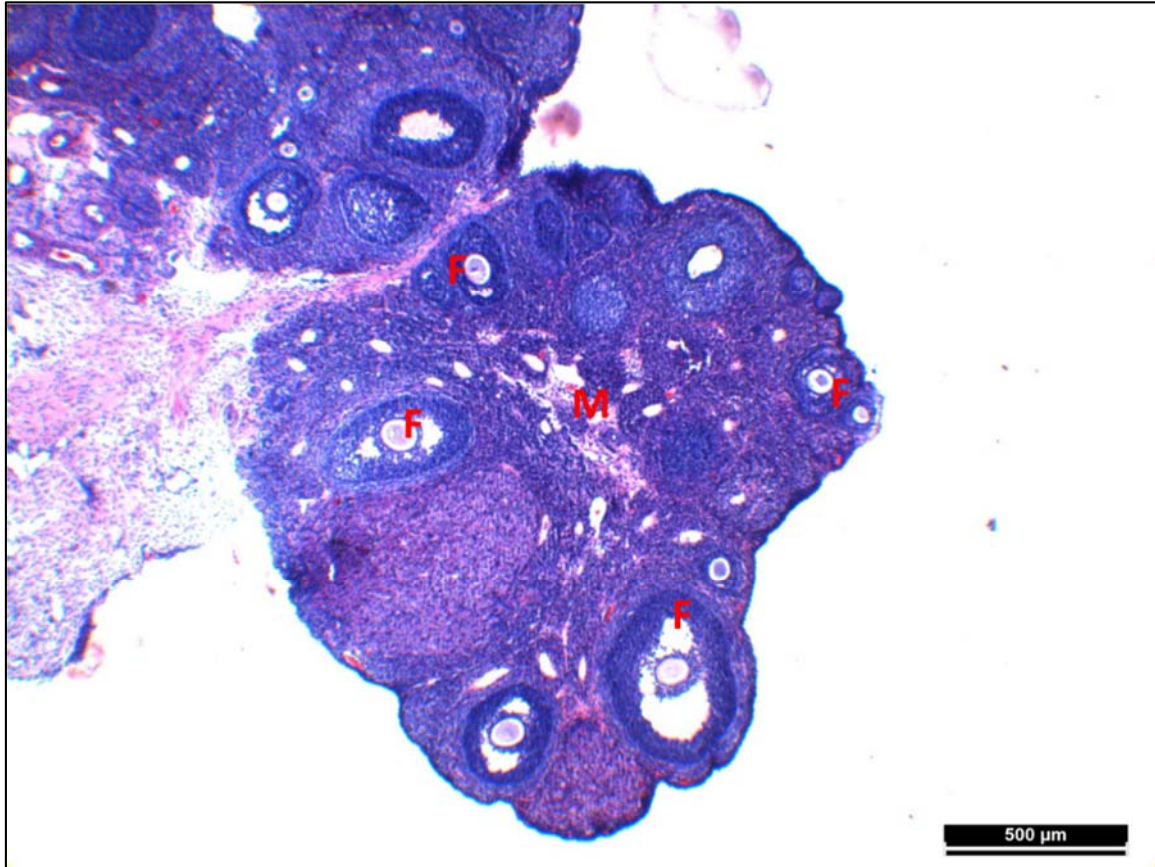
Melatonin grubunda, küçük büyültmeli incelemelerde, ovaryum korteksinde gelişim evrelerindeki çok sayıdaki folikül dikkati çekti. Medulla vaskülarize bağ dokusu yapısındaydı (Resim 4.6). Kontrol grubundan ayrıcalı olarak bu grupta gerek medulla

gerekse kortekste vasküler dilatasyon oldukça belirgindi. Büyük büyütme incelemelerde, primordiyal folikül sayısının kontrol grubuna karşın göreceli olarak azaldığı dikkati çekti. Yapılan istatistiksel değerlendirmede sayısal azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Çizelge 4.1). Multilaminar primer folikülde zona pellusidanın ve granüloza hücre katmanının kontrol grubuna benzer olduğu ancak kontrol grubundan ayrıcalı olarak granüloza katmanında minimal ekstraselüler ödemin varlığı dikkati çekti (Resim 4.7). Sekonder foliküllerde oluşan antrum belirgin teka interna ve eksterna normal yapıda izlenirken ve primer folikülde görülmeye başlayan minimal ekstraselüler ödemin devam ettiği ilgiyi çekti (Resim 4.8). Graaf folikülünde, granüloza hücre katmanı, teka interna ve teka eksterna belirgin olarak izlenirken minimal ekstraselüler ödemin hala devam dikkati çekti (Resim 4.9).

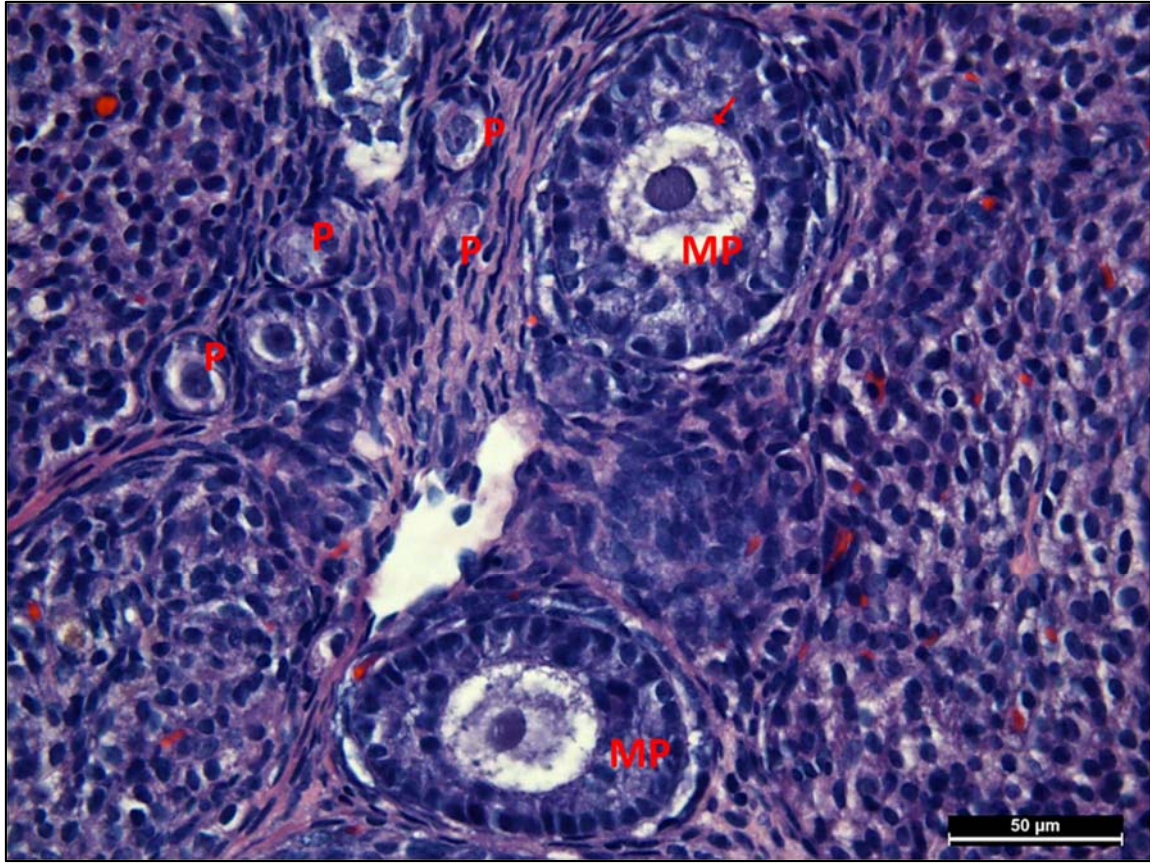
PKOS grubunda, diğer gruplardan ayrıcalı olarak kortekste kistik yapılar şeklinde gözlenen çok sayıda folikül dikkati çekti. Antral folikül sayısındaki artış istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Çizelge 4.5.). Medullada ise vasküler dilatasyon oldukça yaygındı. Hilar hücresi olduğu düşünülen hücrelerin diğer gruplara karşın hiperplaziye uğrayarak gruplar oluşturdukları dikkati çekti (Resim 4.10). Büyük büyütme incelemelerde primordiyal foliküllerin normal yapıda olduğu izlenirken diğer gruplara karşın sayıca az olduğu dikkati çekti (Resim 4.11A). Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Çizelge 4.1.). Multilaminar primer folikülde zona pellusidanın olduğu ancak diğer gruplara karşın düzensiz organizasyon gösterdiği dikkati çekti. Granüloza hücre katmanında minimal ekstraselüler ödemin olduğu ve folikül sınırlarının yer yer ayırt edilemediği dikkati çekti (Resim 4.11B). Sekonder folikülde antrumun oluşmaya başladığı, granüloza hücre katmanında ekstraselüler ödemin sürdüğü izlenirken, zona pellusidanın çoğu alanda silindiği dikkati çekti. Granüloza hücreleri arasında diğer gruplardan farklı olarak apoptotik hücreler dikkati çekti. Yer yer folikül sınırı belirgin değildi. Teka katmanının diğer gruplara karşın göreceli ince olduğu gözlemlendi (Resim 4.12). Graaf foliküllerinde, folikül duvarını oluşturan granüloza hücre katmanının diğer gruplara karşın oldukça ince olduğu izlendi. Granüloza hücrelerindeki minimal ekstraselüler ödem bu grupta belirgindi (Resim 4.13).

PKOS+melatonin grubunda, kortekste kistik folikül sayısının PKOS grubuna karşın göreceli olarak azaldığı ancak halen çok sayıda olduğu gözlemlendi. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.5). Medulladaki hücre kompozisyonu ve damar yapıları kontrol grubuna benzerdi. Ancak bu grupta diğer gruplardan ayrıcalı olarak medullada yaygın

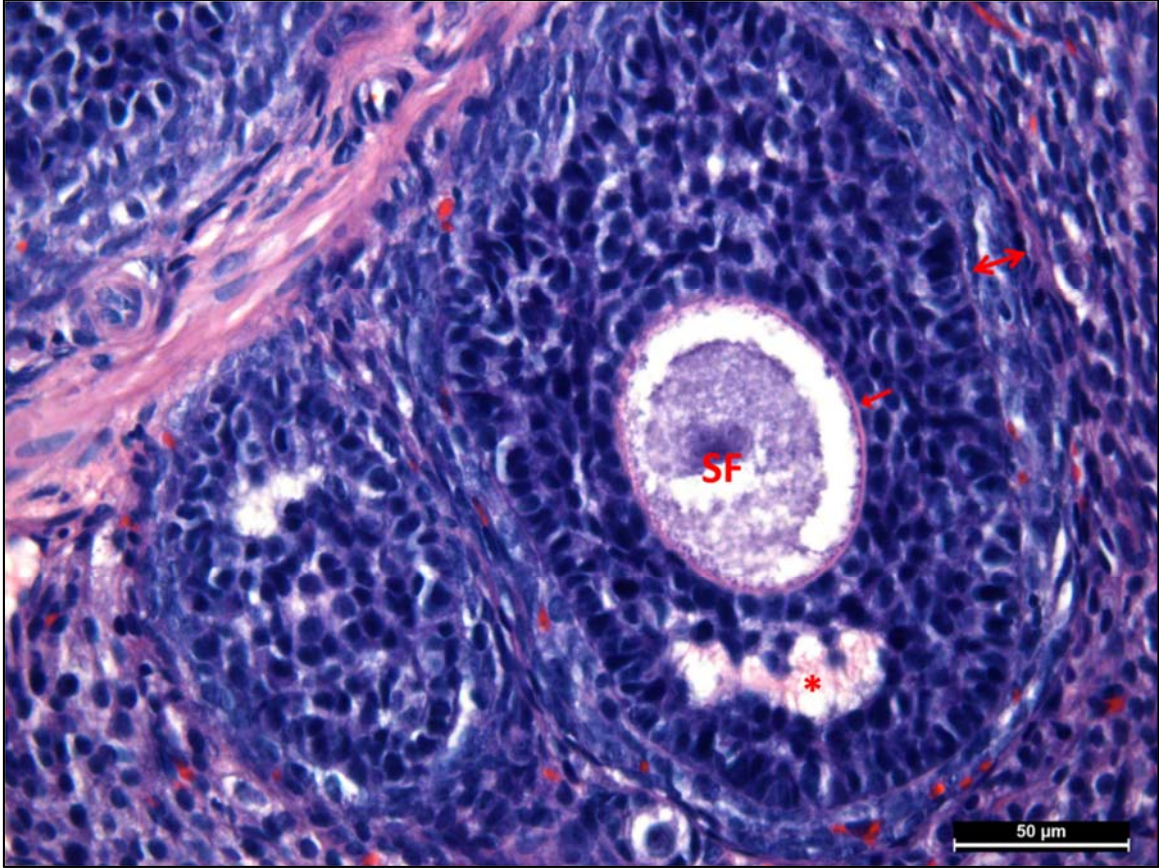
ekstrasellüler ödem dikkati çekti (Resim 4.14). Büyük büyütme incelemlerde primordiyal foliküller normal yapılarıyla ayırt edilirken PKOS grubuna karşın sayıca arttıkları ancak kontrol grubundaki sayıya ulaşamadıkları izlendi . Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.1). Multilaminar primer folikülde granüloza hücreleri arasındaki ödem bu grupta belirgindi. Zona pellusida PKOS grubuna benzer şekilde düzensiz organizasyon sergilemekteydi (Resim 4.15). Sekonder foliküllerde yapılan değerlendirmede yer yer apoptotik hücre görülmekle birlikte, granüloza hücre katmanını kontrole yakın özellikteydi. Ancak minimal ödem bu foliküllerde de izlendi. Antrumun oluşmaya başladığı, korona radiatanın şekillendiği, zona pellusidanın olağan yapısını kazandığı izlendi. Teka interna ve teka eksterna normal yapılarıyla ayırt edildi (Resim 4.16). Graaf foliküllerinde granüloza hücre katmanının kontrole yakın görünümde olduğu, teka interna ve teka eksternanın normal histolojik yapı sergilediği dikkati çekti (Resim 4.17).



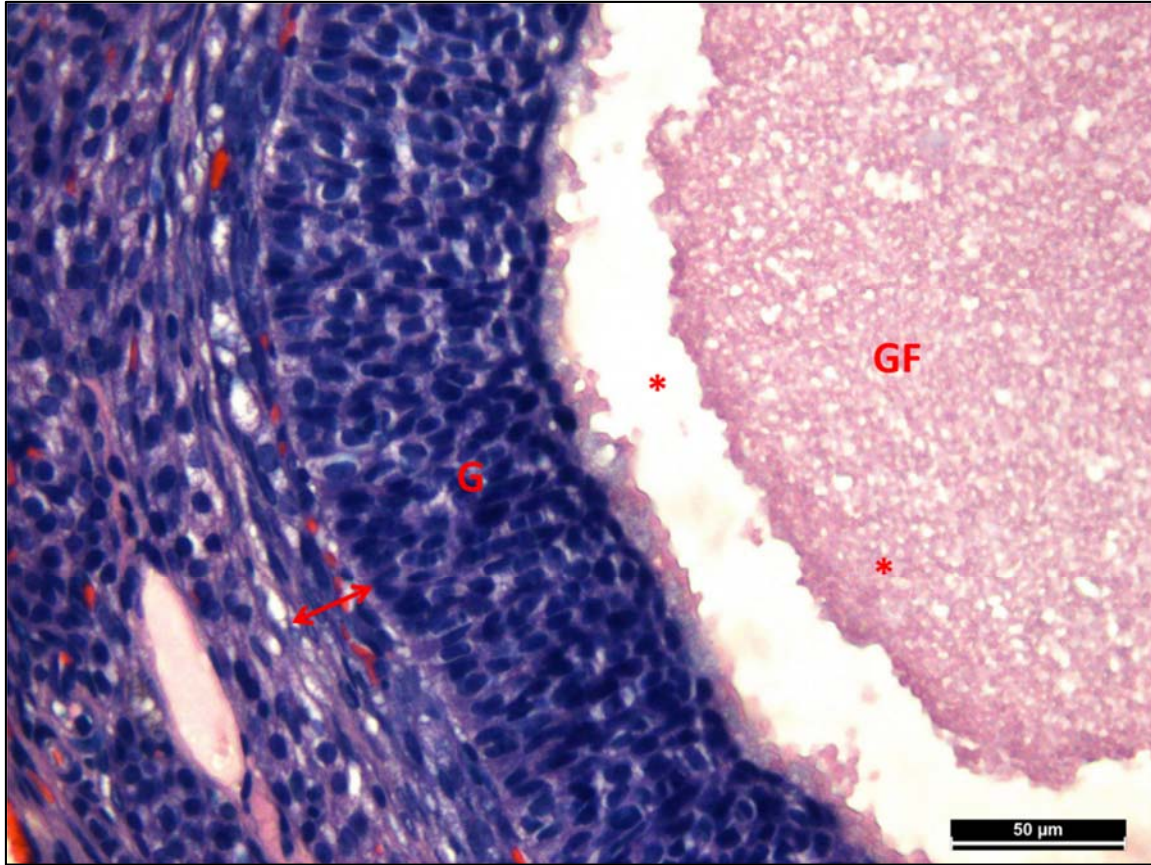
Resim 4.2. Sham kontrol grubu; (F): kortekste çeşitli gelişim evresindeki foliküller, (M): vaskülerize medulla normal yapıları ile izleniyor (H-E X100)



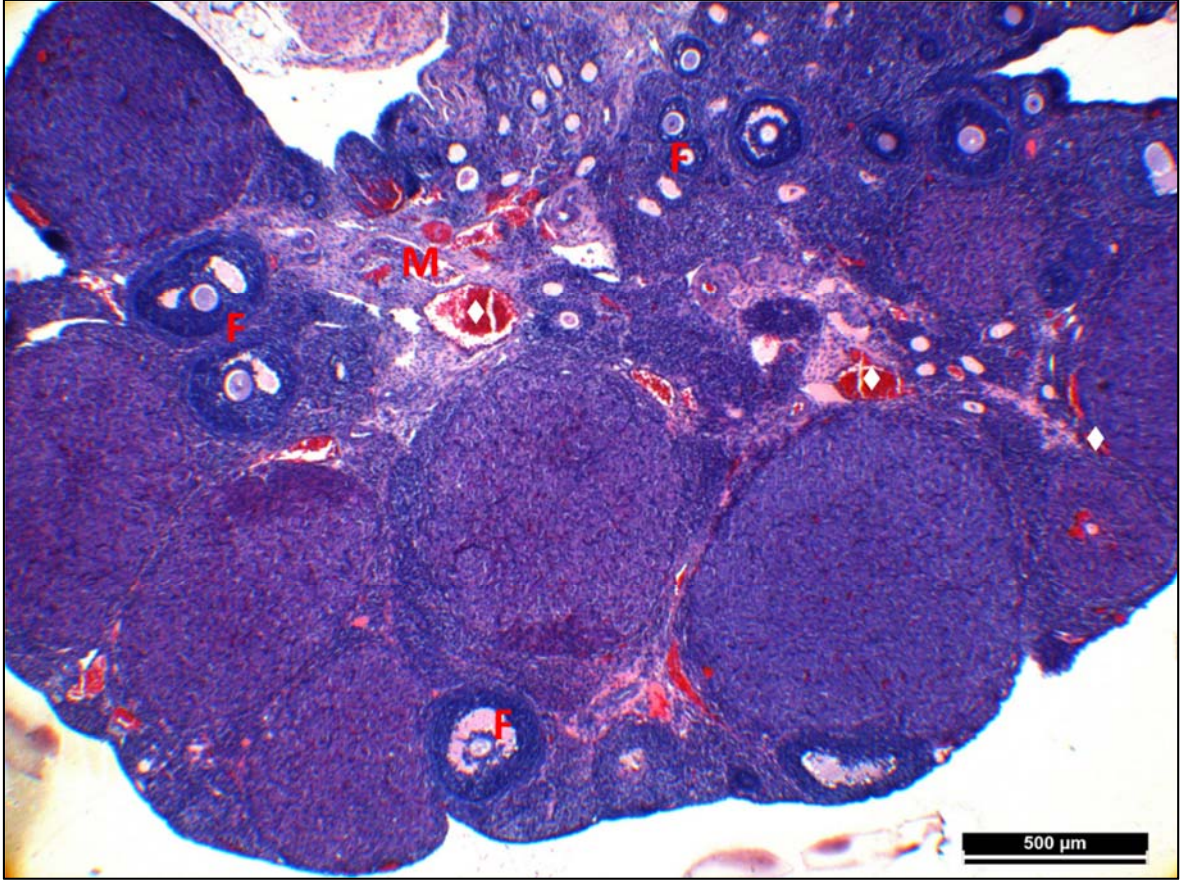
Resim 4.3. Sham kontrol grubu; Normal yapıda primordiyal foliküller (P), multilaminar primer foliküller (MP) ve zona pellusida (→) izleniyor (H-E X400)



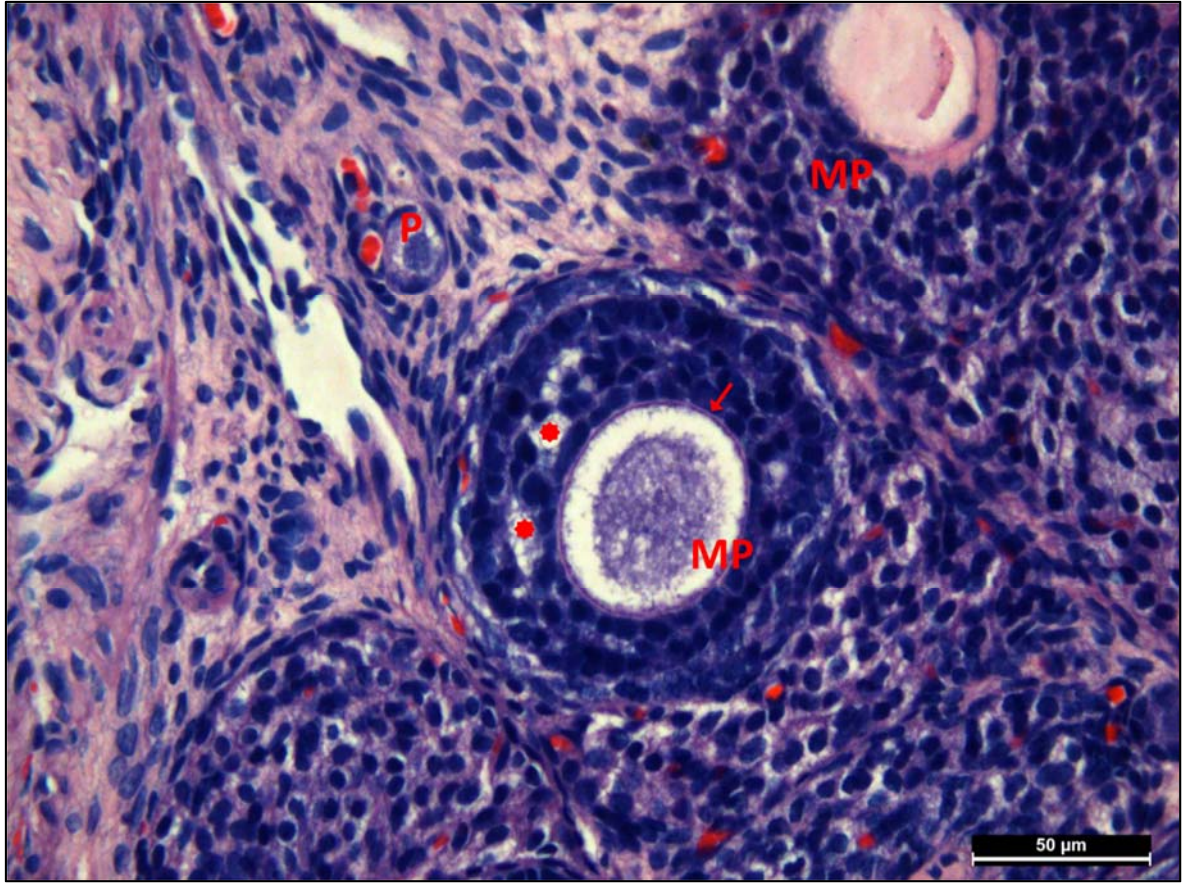
Resim 4.4. Sham kontrol grubu; (SF): sekonder folikül, (→): zona pellusida, (*): oluşmaya başlamış antrum, (Φ): teka interna ve eksterna normal yapıları ile görülüyor (H-E X400)



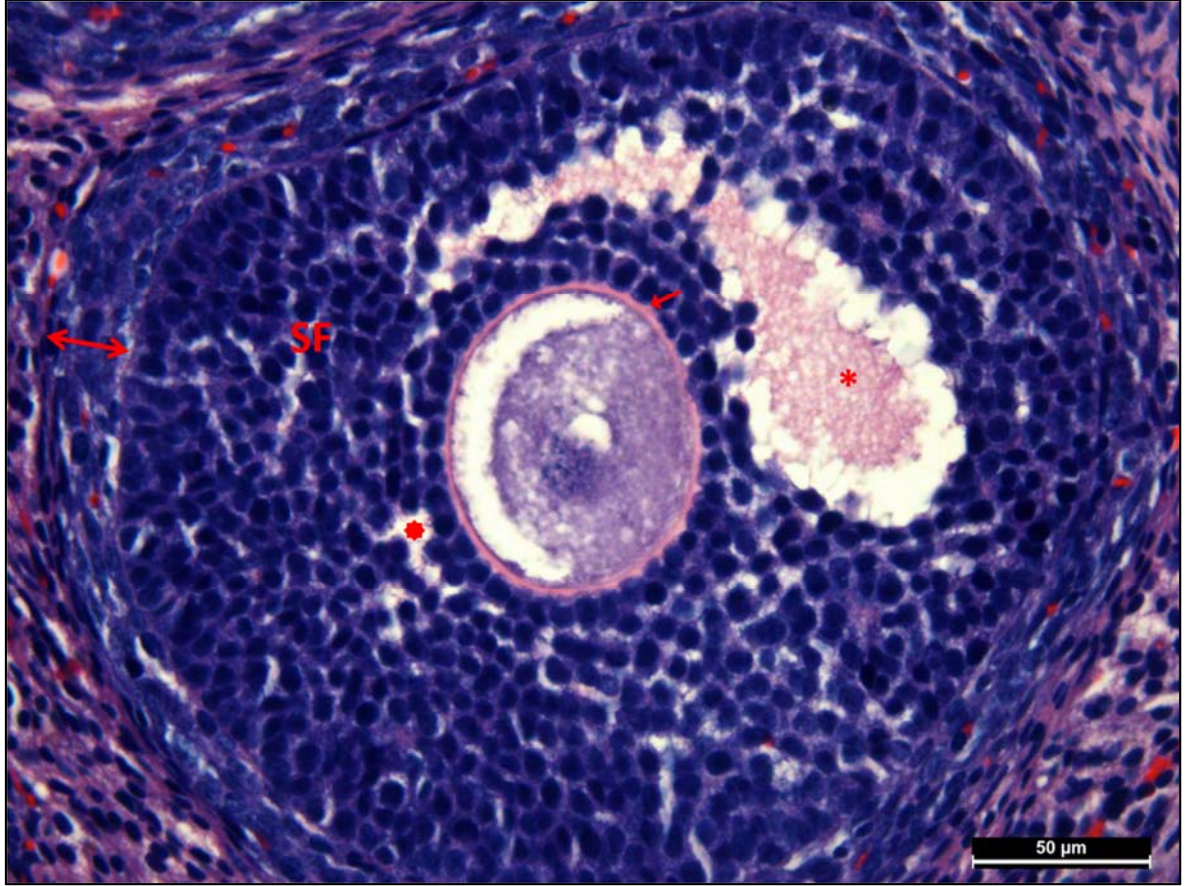
Resim 4.5. Sham kontrol grubu; (GF): Graff folikülü, (G): granüloza hücre katmanı, (*): antrum, (Φ): teka interna ve eksterna normal yapıları ile görülüyor (H-E X400)



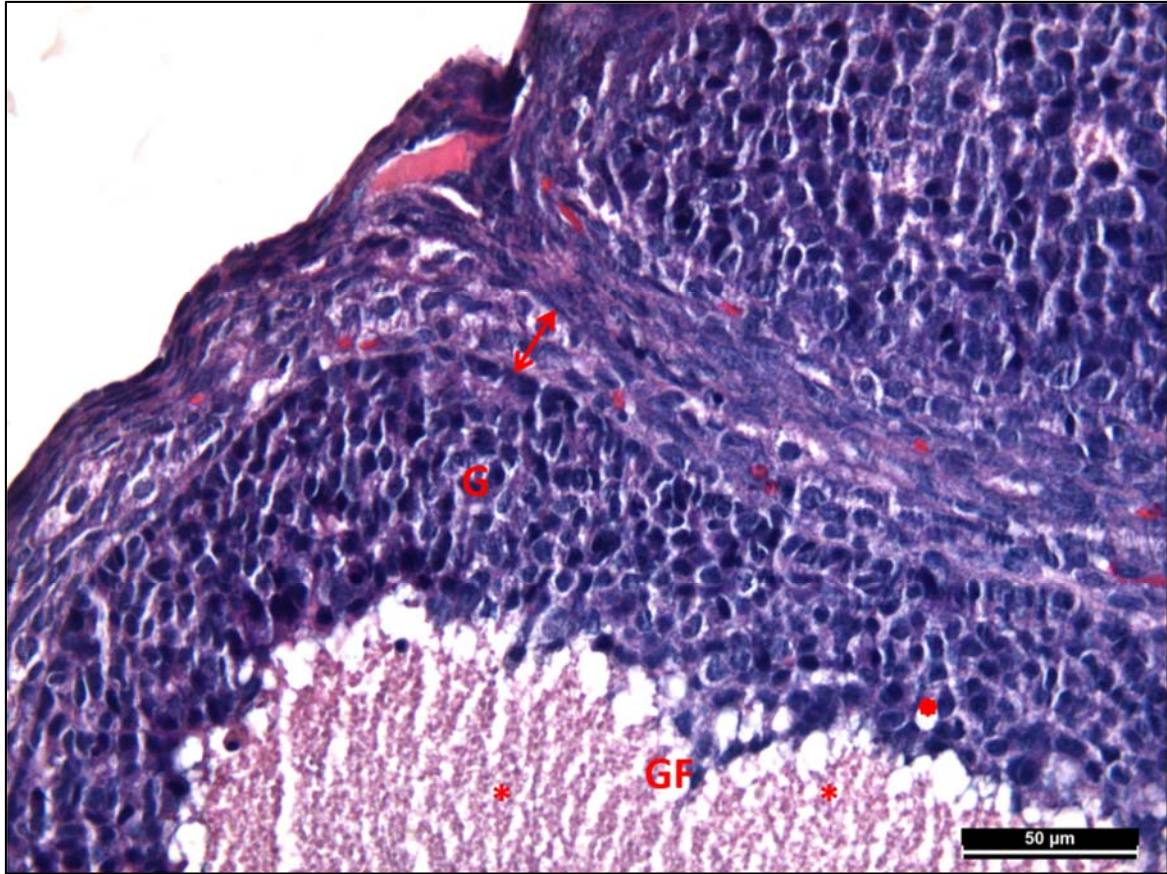
Resim 4.6. Melatonin grubu; (F): kortekste çeşitli gelişim evresindeki foliküller, (M): vaskülerize medulla, (♦): korteks ve medullada vasküler dilatasyon izleniyor (H-E X100)



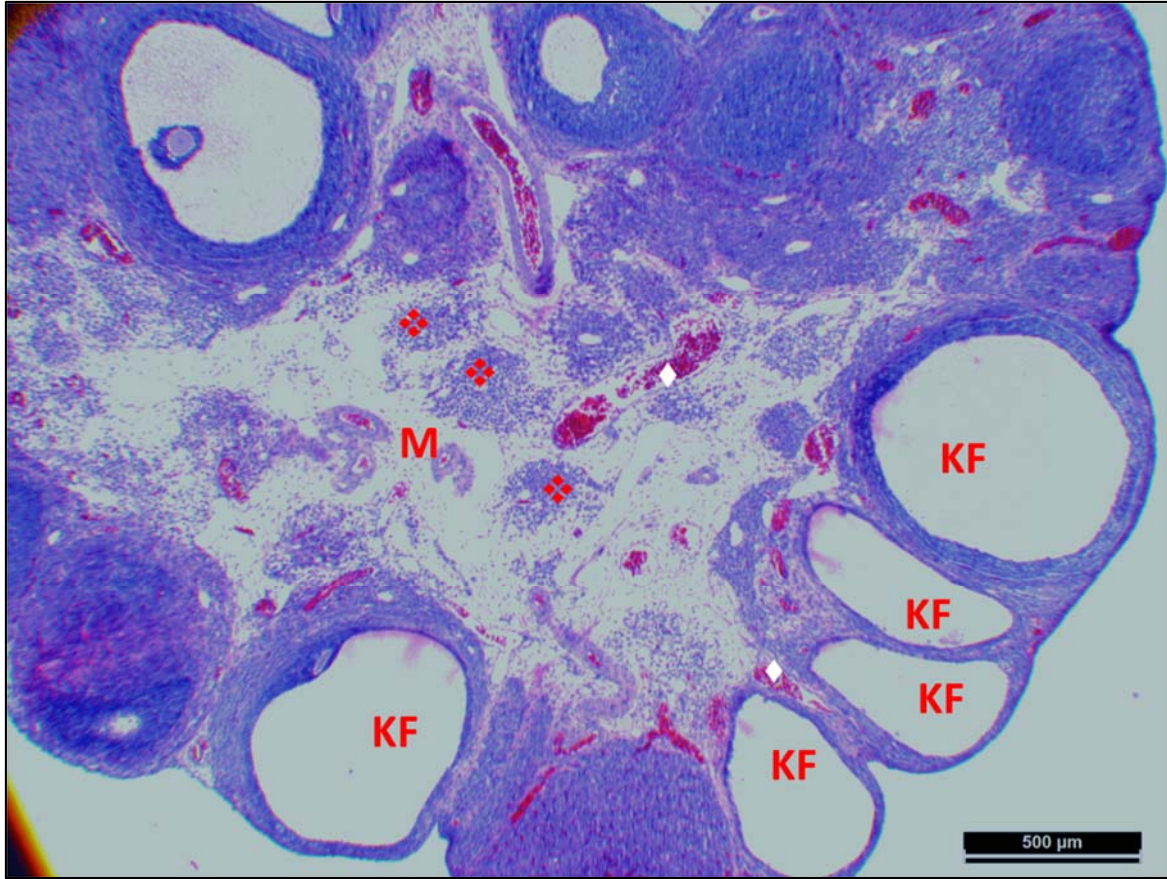
Resim 4.7. Melatonin grubu; (P): primordiyal folikül, (MP): multilaminar primer folikül, (→): zona pellusida, (★): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem izleniyor (H-E X400)



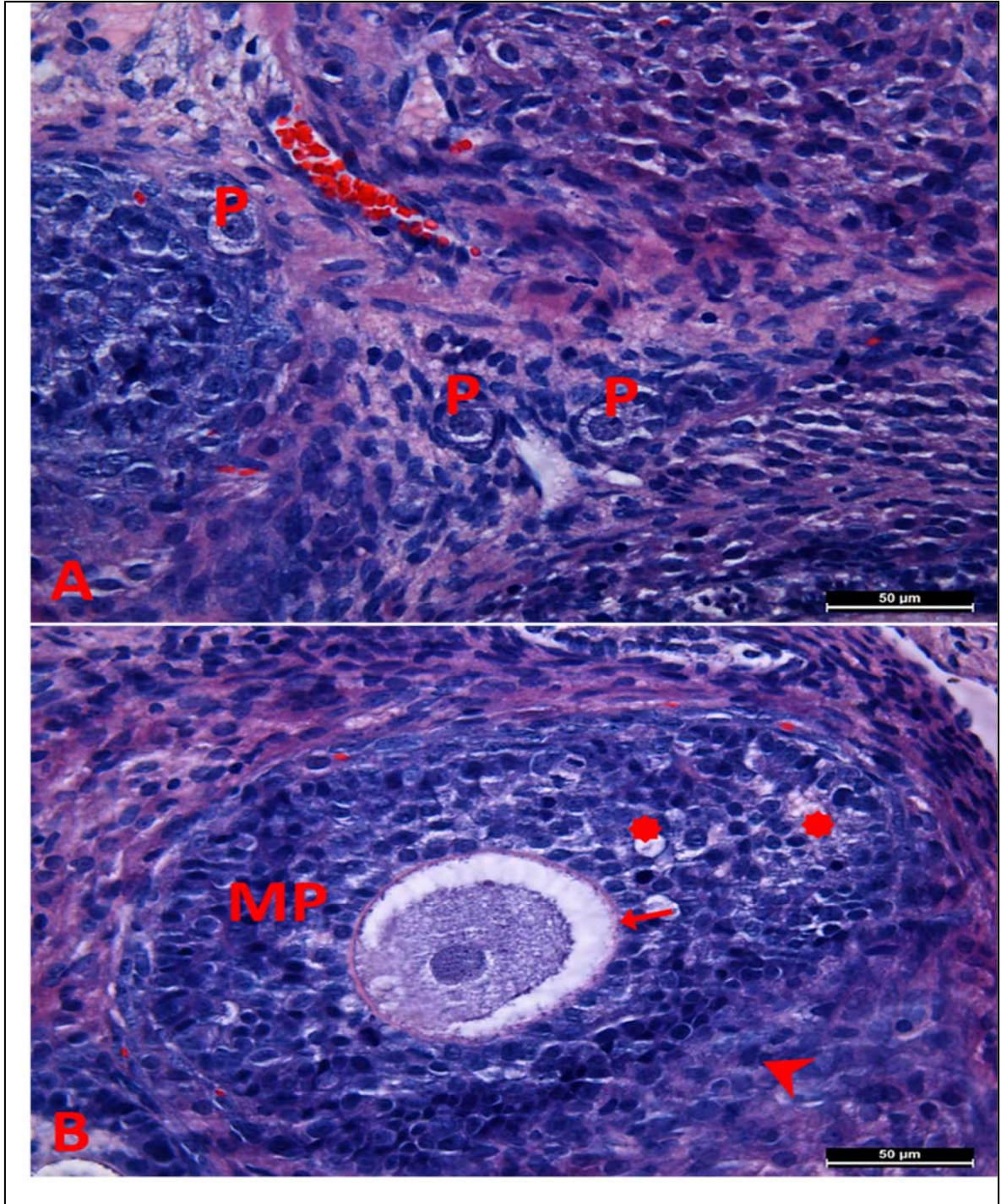
Resim 4.8. Melatonin grubu; (SF): sekonder folikül, (→): zona pellusida, (*): oluşmaya başlamış antrum, (•): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem, (⇓): teka interna ve eksterna görülüyor (H-E X400)



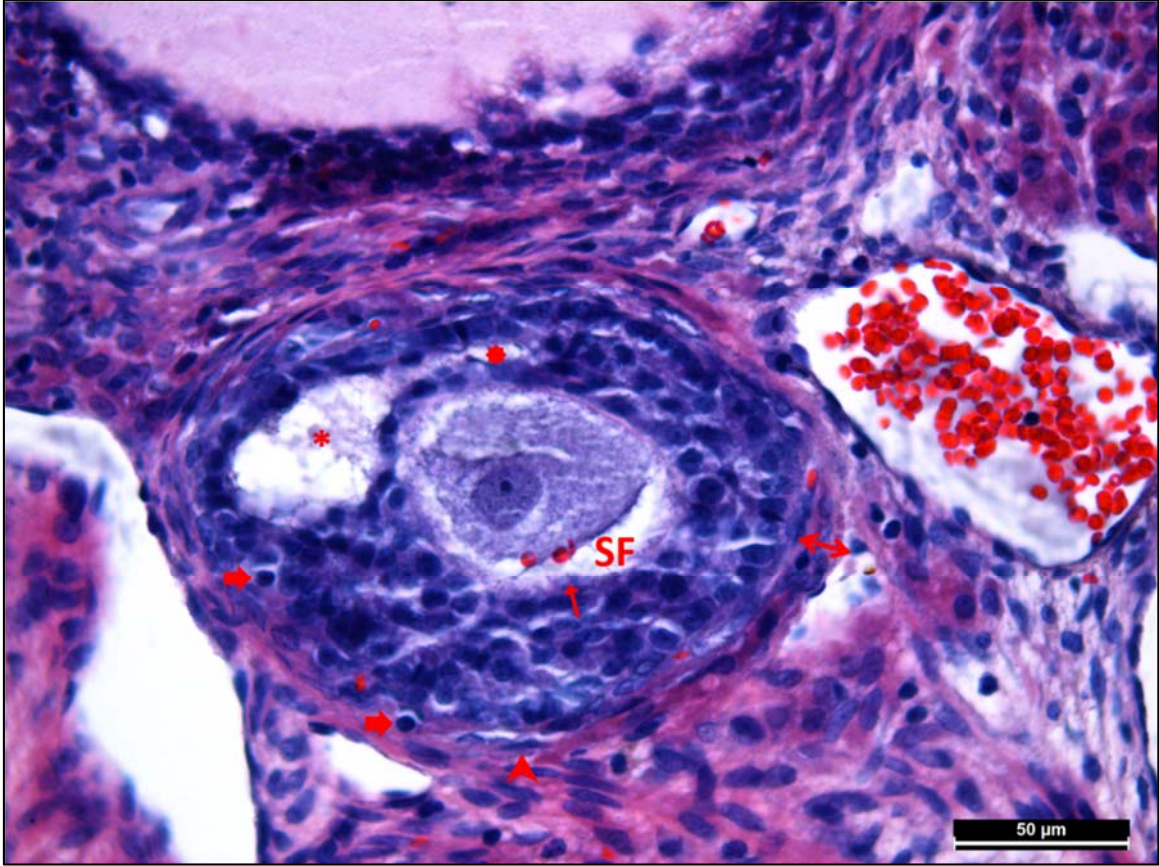
Resim 4.9. Melatonin grubu; (GF): Graff folikülü, (G): granüloza hücre katmanı, (★): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem, (*): antrum, (⇕): teka interna ve eksterna izleniyor (H-E X400)



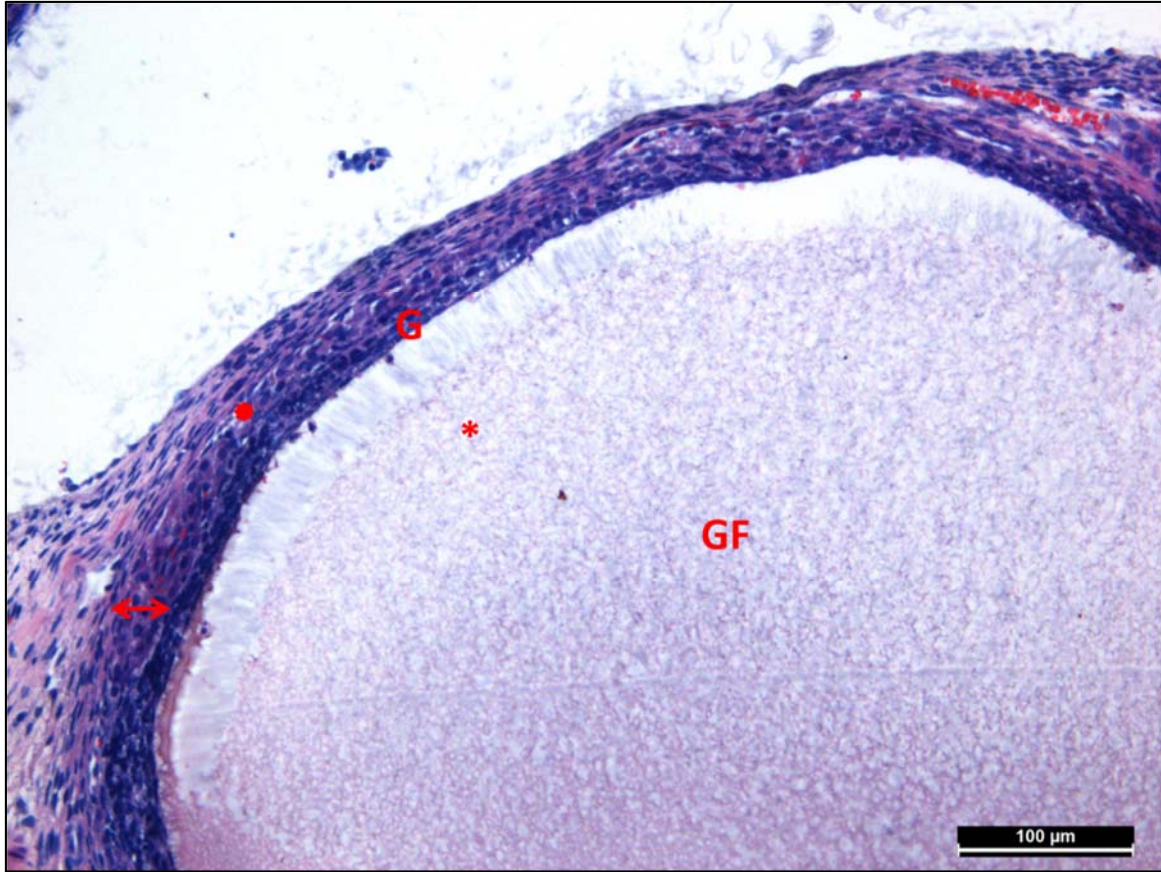
Resim 4.10. PKOS grubu; (KF): kortekste çok sayıda kistik yapı sergileyen foliküller, (M): vaskülerize medulla, (◆): korteks ve medullada vasküler dilatasyon (❖): hilar hücre hiperplazisi görülüyor (H-E X100)



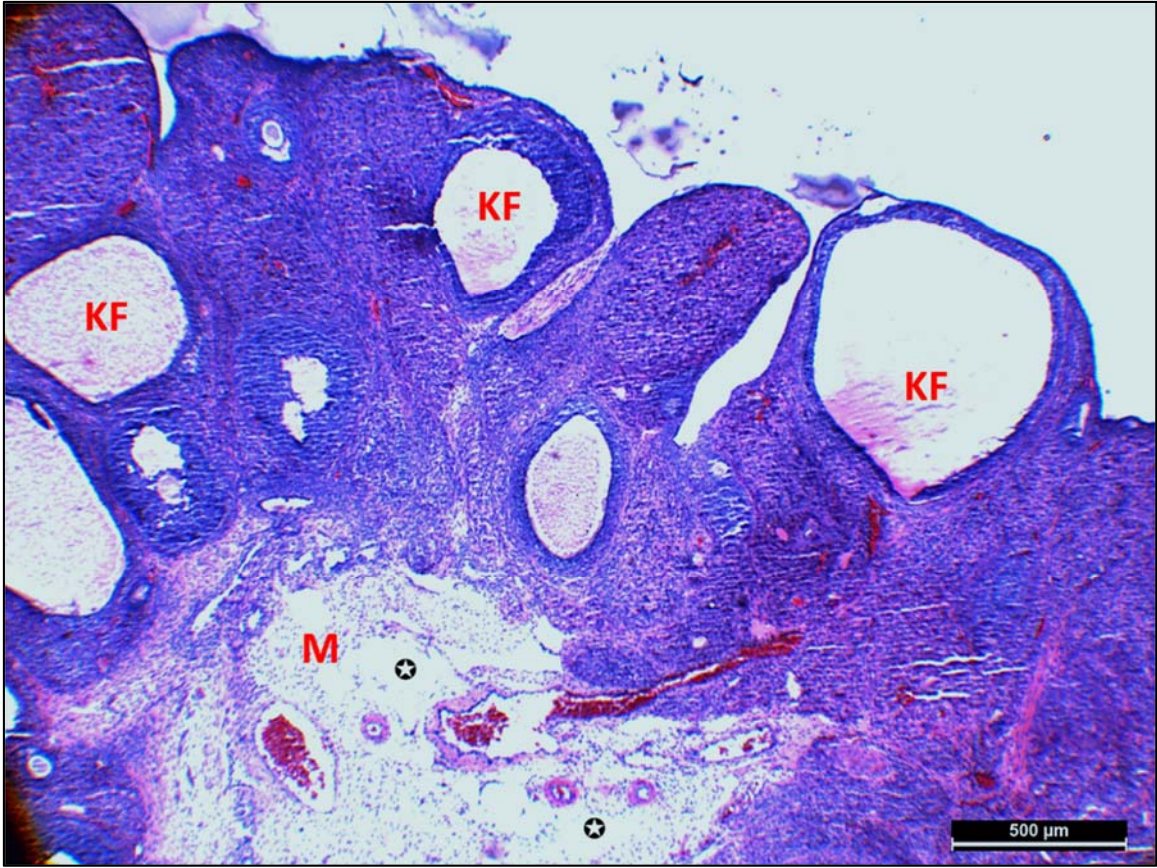
Resim 4.11. PKOS grubu; (A): primordiyal foliküller (P), (B): Multilaminar primer folikülde (MP) zona pellusidanın düzensiz olduğu (→), minimal ekstrasellüler ödemin varlığı (★) ve yer yer folikül sınırının ayırt edilemediği (◄) izleniyor (H-E X400)



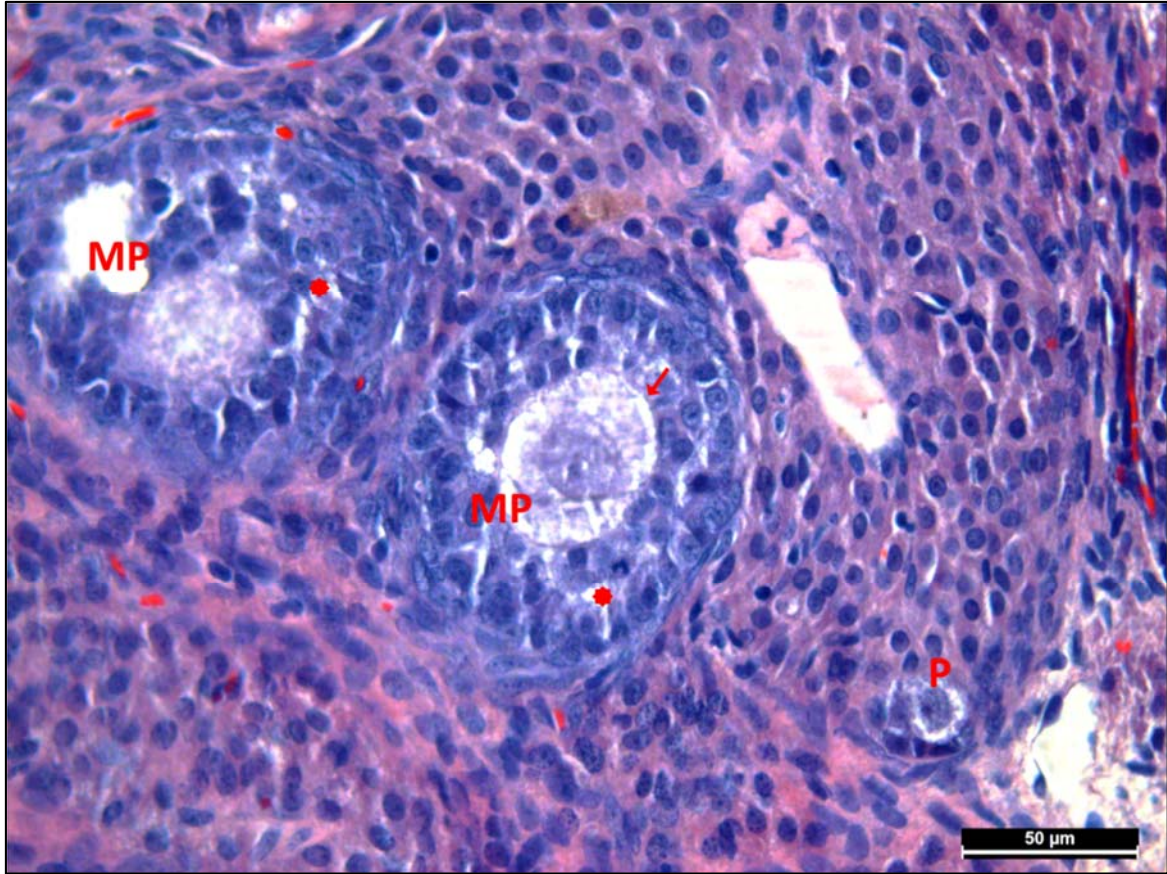
Resim 4.12. PKOS grubu; (SF): sekonder folikül, (→): çoğu alanda silinmiş zona pellusida, (*): oluşmaya başlamış antrum, (◆): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem, (⌘): ince teka interna ve eksterna, ➡: apoptotik granüloza hücreleri (◀): folikül sınırının yer yer kaybolduğu izleniyor (H-E X400).



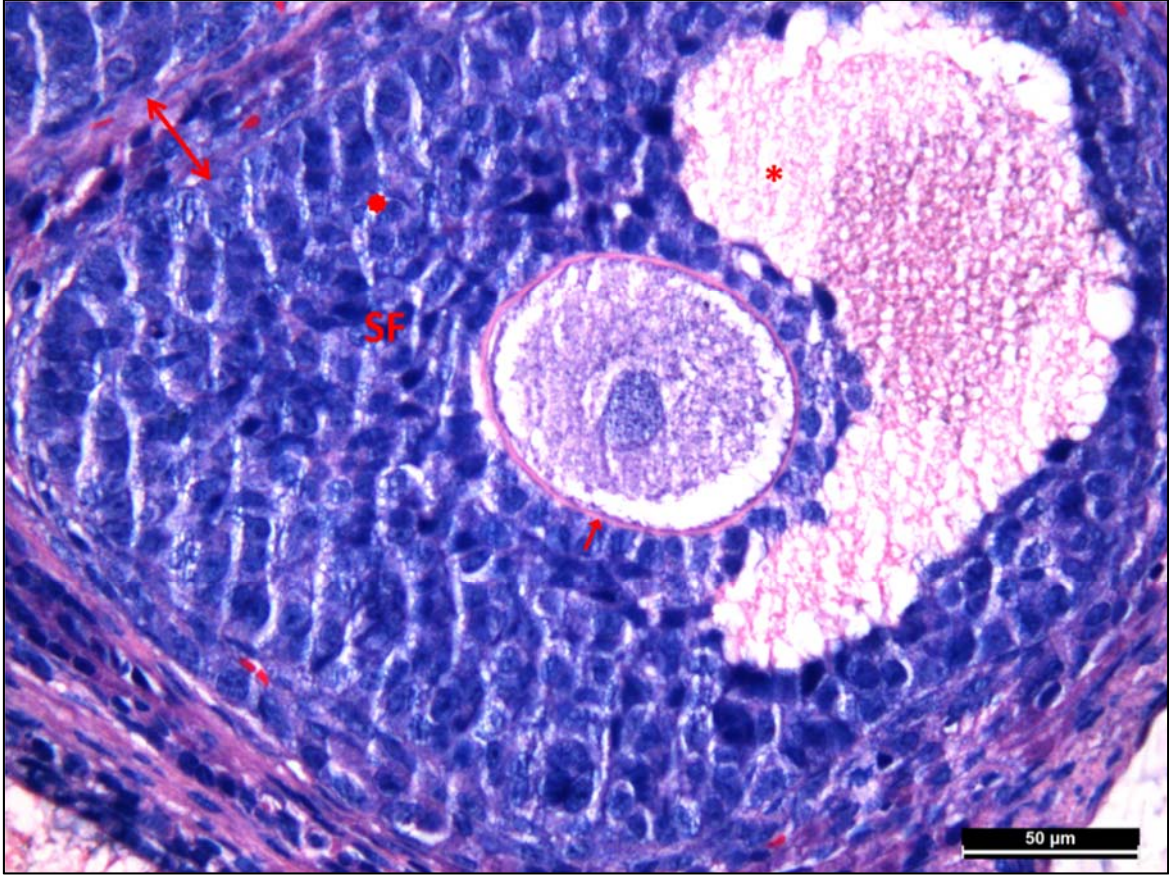
Resim 4.13. PKOS grubu; (GF): Graff folikülü, (G): oldukça ince granüloza hücre katmanı, (●): granüloza katmanında ekstrasellüler ödem (*): antrum, (♠): teka interna ve eksterna (H-E X400)



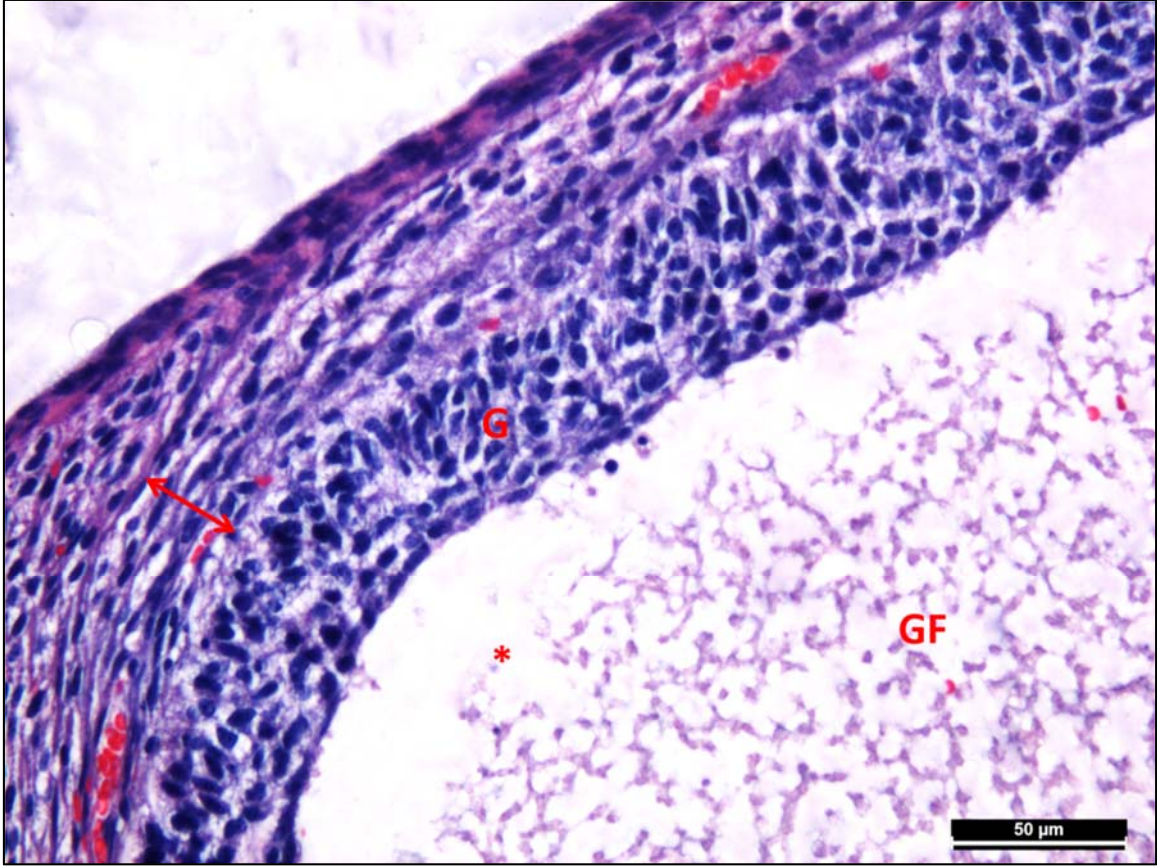
Resim 4.14. PKOS + melatonin grubu; (KF): kortekste kistik yapı sergileyen foliküller, (M): vaskülerize medulla, (☆): Medullada yaygın ekstrasellüler ödem (H-E X100)



Resim 4.15. PKOS + melatonin grubu; (P): primordiyal folikül, (MP): Multilaminar primer folikül, (→) düzensiz zona pellusida, (★): minimal ekstrasellüler ödem izleniyor (H-E X400)



Resim 4.16. PKOS + melatonin grubu; (SF): sekonder folikül, (→): zona pellusida, (★): minimal ekstrasellüler ödem, (*): oluşmaya başlamış antrum, (♠): teka interna ve eksterna normal yapıları ile görülüyor (H-E X400)



.Resim 4.17. PKOS + melatonin grubu; Graff folikülleri (GF), antrum (*), granüloza hücre katmanı (G) ile teka interna ve eksterna (↕) normal histolojik yapıda izleniyor (H-E X400)

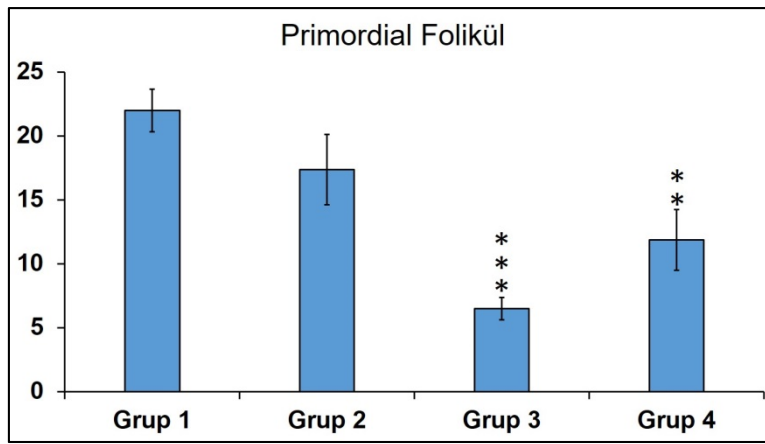
4.1.3. Folikül sayımı bulguları

Deney gruplarında, folikül sayıları temel alınarak oluşturulan istatistiksel analizler için kontrol grubuyla diğer grupları karşılaştırma temeline dayanan çoklu Holm-Sidak metodu kullanılmıştır. Bu metod neticesinde primordiyal folikül sayısı, melatonin grubu için anlamlı değil iken, PKOS ve melatonin+PKOS grubunda ($P<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Unilaminar primer folikül sayısı, melatonin, PKOS ve melatonin+PKOS gruplarının hepsi için istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Multilaminar primer folikül sayısı melatonin ve melatonin+PKOS gruplarında anlamlı seviyede azalma gösterirken bu durum PKOS grubu için geçerli değildir. Tüm bunların yanı sıra PKOS indüklenen grupta sendromun patofizyolojisiyle uyumlu olarak sekonder ve tersiyer folikül sayılarının Sham grubuna karşı anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu foliküllerin sayısı melatonin uygulanan grupta Sham grubuna yakın bulunmuştur. Folikül sayılarının istatistiksel analizlerinde Sigma Stat 4.0 programında One Way Repeated

Measures varyans analizi ve Holm-Sidak metodu kullanılmıştır. 0,05'ten küçük P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Primordiyal folikül

İstatistiksel analizler sonucunda primordiyal folikül sayısı Sham grubu ile PKOS grubu ve PKOS+melatonin grubu arasında oldukça anlamlı iken, melatonin + CMC uygulanan grupta anlamlı değildir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.1) ($p<0.05$).



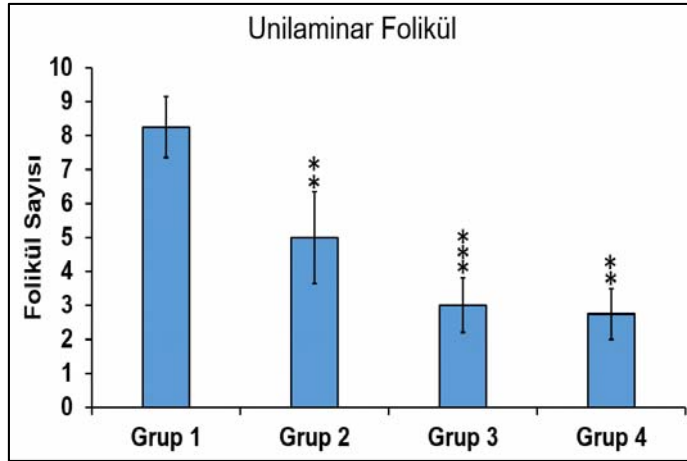
Şekil 4.1. Primordial folikül

Çizelge 4.6. Primordial folikül

Gruplar	P değerleri
1. ve 2. grup	0,121
1. ve 3. grup	0,001
1. ve 4. grup	0,003

Unilaminar primer folikül

İstatistiksel analizler sonucunda unilaminar primer folikül sayısı Sham grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir (Çizelge 4.7.) (Şekil 4.2.). ($p<0.05$).



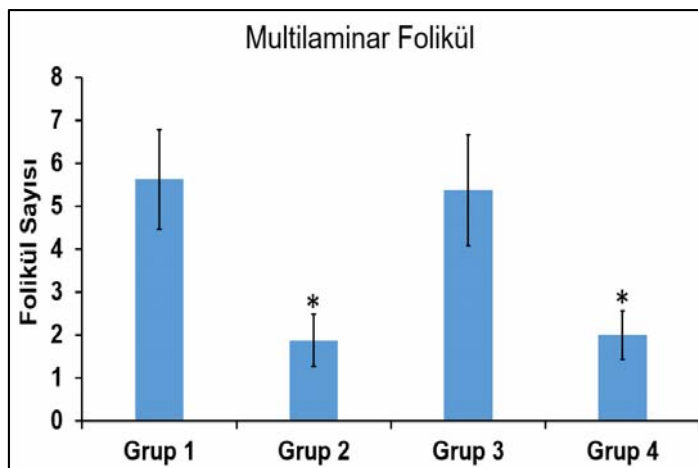
Şekil 4.2. Unilaminar folikül

Çizelge 4.7. Unilaminar folikül

Gruplar	P değerleri
1. ve 2. grup	0,003
1. ve 3. grup	0,001
1. ve 4. grup	0,002

Multilaminar primer folikül

İstatistiksel analizler sonucunda multilaminar primer folikül sayısı Sham grubu ile melatonin + CMC uygulanan grupta ve PKOS+Melatonin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı iken PKOS grubunda değildir (Çizelge 4.8.) (Şekil 4.3). ($p < 0.05$).



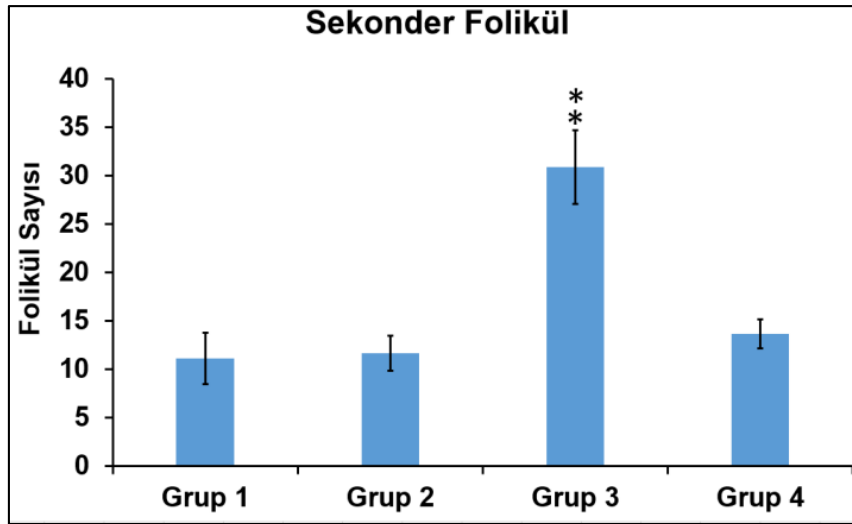
Şekil 4.3. Multilaminar folikül

Çizelge 4.8. Multilaminar folikül

Gruplar	P değerleri
1. ve 2. grup	0,031
1.ve 3. grup	0,856
1.ve 4. grup	0,026

Sekonder folikül

İstatistiksel analizler sonucunda sekonder folikül sayısı Sham grubu ile PKOS grubu arasında anlamlı fark gözlenirken, PKOS+Melatonin grubu ve melatonin uygulanan grupta anlamlı fark görülmemiştir (Çizelge 4.9) (Şekil.4.4) ($p<0.05$).



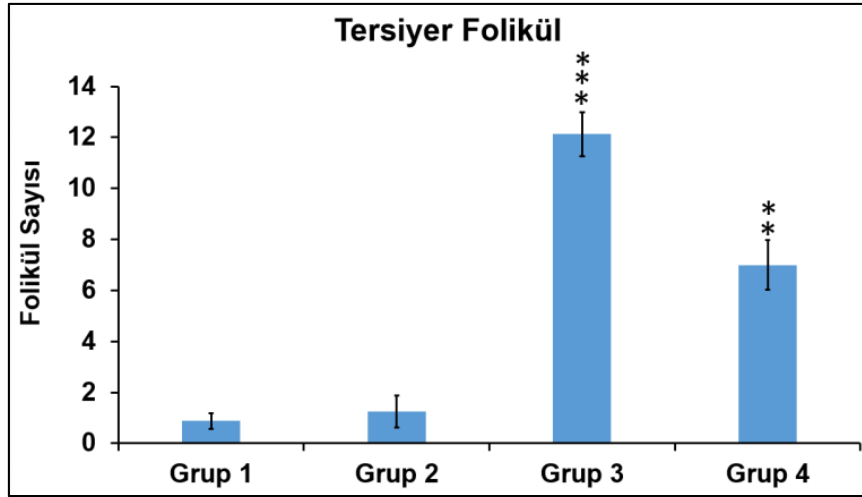
Şekil 4.4. Sekonder folikül

Çizelge 4.9. Sekonder folikül

Gruplar	P değerleri
1. ve 2. grup	0,623
1.ve 3. grup	0,047
1.ve 4. grup	0,501

Tersiyer folikül

İstatistiksel analizler sonucunda tersiyer folikül sayısında Sham grubu ile PKOS grubu ve PKOS+Melatonin grubu arasında anlamlı bir fark gözlenirken, melatonin uygulanan grupta fark anlamlı bulunmamıştır. (Çizelge 4.10) (Şekil 4.5.) ($p<0.05$).



Şekil 4.5. Tersiyer folikül

Çizelge 4.10. Tersiyer folikül

Gruplar	P değerleri
1. ve 2. grup	0,528
1.ve 3. grup	0,001
1.ve 4. grup	0,528

4.1.4. İmmünohistokimyasal boyama bulguları

MT1 immünohistokimya sonuçları

Çalışmamızda deney protokolünde uygulanan melatoninin dokuda kullanımını değerlendirmek amacıyla özgün reseptörü olan MT1 dağılımını anti-MT1 antikoru kullanarak incelendi.

Sham grubu MT1 immünboyamasında çeşitli gelişim aşamasındaki foliküllerde, oosit ve granüloza hücrelerinde immünreaktivite saptandı. MT1 tutulumunun folikül gelişimine paralel azaldığı dikkati çekti. Primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde özellikle oositte kuvvetli reaksiyon izlenirken, multilaminar primer folikülde kuvvetli tutulumun oosite ek olarak granüloza katmanında da yaygınlaştığı saptandı. Antral folikül evresinde ise MT1 tutulumunun dramatik şekilde azaldığı; oositte orta dereceli, granüloza hücrelerinde ise yer yer negatif, bazal membrana yakın alanlarda ise zayıf olduğu izlendi (Resim 4.18 A).

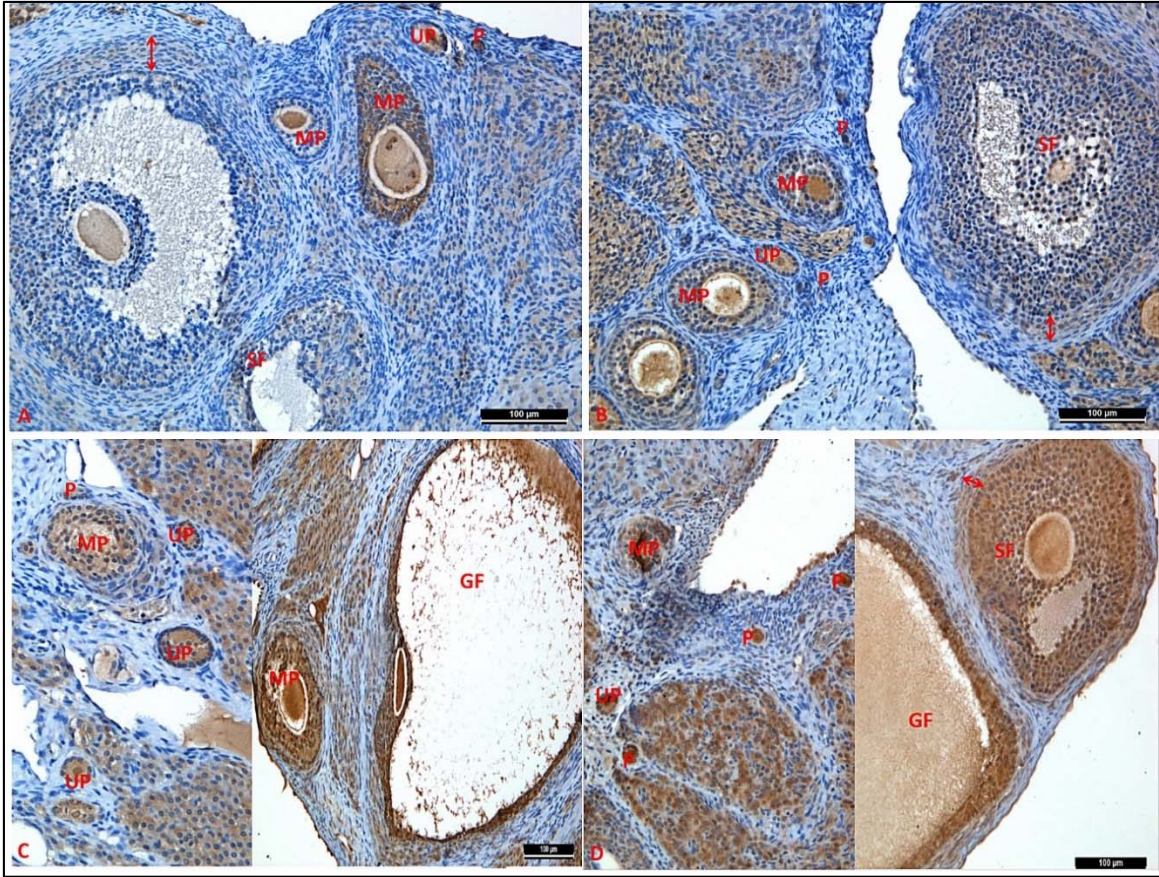
Melatonin uygulanan grupta MT1 immünboyamasında preantral foliküllerde tutulumun sham grubuna benzer olduğu; primordiyal ve unilaminar primer folikülde oositte kuvvetli, multilaminar primer folikül evresinde granüloza katmanında da aynı tutulumun varlığı

izlendi. Bu grupta ayrıcalı olarak antral foliküllerde tüm granüloza ve teka katmanı genelinde zayıftan ortaya değişen MT1 immünreaksiyonu dikkati çekti. Bu bulgu, melatonin uygulamasının melatonin reseptör ekspresyonunu arttırdığını, downregüle olmadığını, kullanılan dozun ratlarda aktif işlev yaptığını gösterdi (Resim 4.18 B).

PKOS grubunda MT1 immünreaktivitesinin tüm gelişim aşamasındaki foliküllerde belirgin olduğu izlendi. Preantral foliküllerde diğer gruplara benzer olarak gözlenen kuvvetli immünreaksiyon, bu grupta antral foliküllerde de belirgindi. Ancak teka katmanlarında orta dereceli tutulum ilgiyi çekti (Resim 4.18 C).

PKOS + melatonin uygulanan grupta MT1 immünboyamalarında tüm gelişim evresindeki foliküllerde kuvvetli MT1 tutulumu dikkati çekti. Preantral ve antral foliküllerde hem oosit hem de granüloza katmanını oluşturan hücrelerde kuvvetli immünreaktivite gözlenirken, teka katmanında da ortadan kuvvetli değişen yaygın tutulum dikkati çekti (Resim 4.18 D).

Bu bulgular, melatonin reseptörünün ovaryum dokusunda hem oosit hem de granüloza ve teka katmanını oluşturan hücrelerce eksprese edildiğini, sitoplazmik ve nükleer tutulum gösterebileceğini kanıtladı. Dolayısıyla deney protokolünde uygulanan melatoninin, dokuda reseptörüne bağlanarak, işlevsel olabildiğinin göstergesi olarak kabul edildi. Ayrıca, PKOS uygulaması ile ratlarda ovaryum dokusunda melatonin reseptörünün arttığı da izlenmiş oldu.



Resim 4.18. MT1 immünboyaması. (A): Sham kontrol, (B) Melatonin, (C): PKOS, (D): PKOS + melatonin grubu. P: primordiyal folikül, UP: unilaminar primer folikül, MP: Multilaminar primer folikül, SF: sekonder folikül, GF: Graff folikülü, ⇕: teka interna ve teka eksterna (İmmünperoksidaz – Hematoksilen X200)

GDF 9 ve BMP 15 immünhistokimya sonuçları

Folikülogeneziste, özellikle preantral folikül gelişiminde önemli belirteçler olarak kabul edilen GDF 9 ve BMP 15'in deney gruplarımızda dağılımını göstermek amacıyla anti-GDF 9 ve anti-BMP 15 antikorları kullanılarak doku içerisinde dağılımları incelendi;

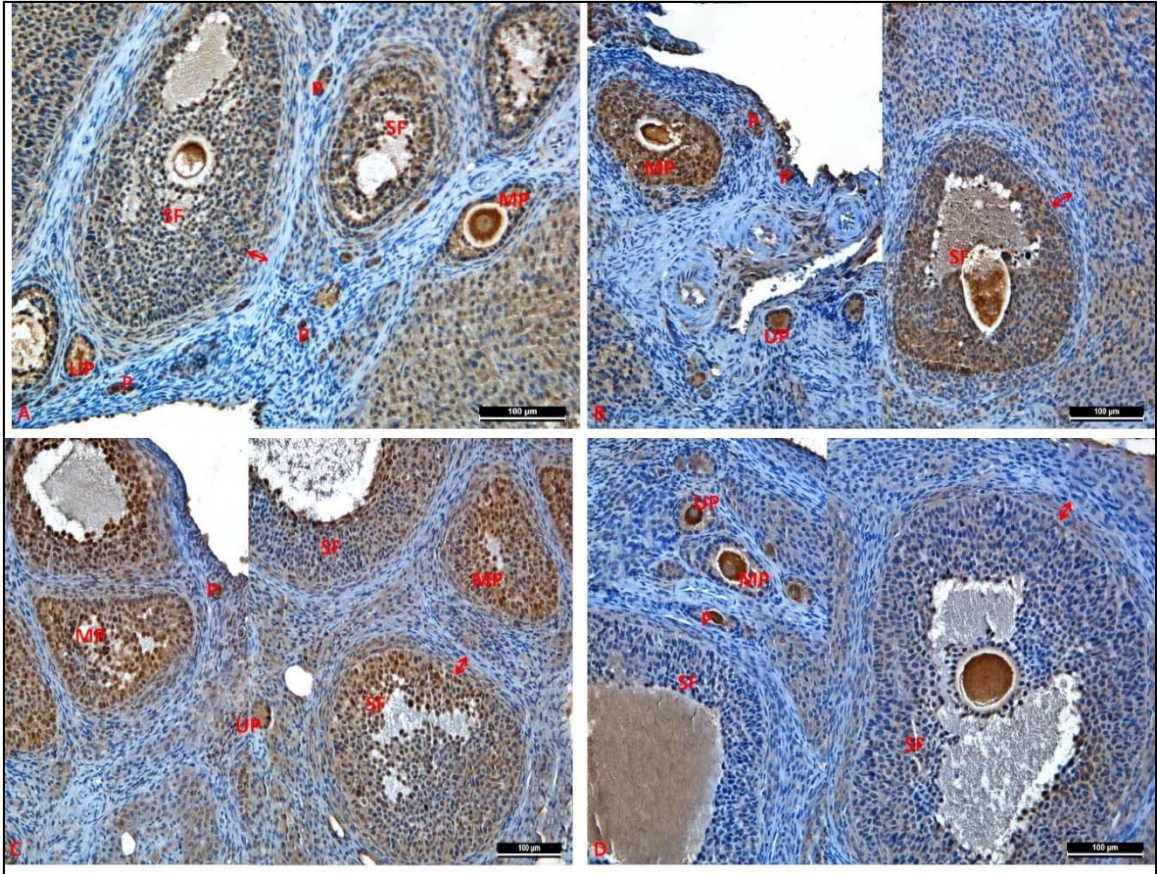
Sham kontrol grubunda yapılan GDF 9 immünboyamalarında, özellikle primordiyal ve unilaminar primer folikül aşamasındaki preantral foliküllerde GDF 9 tutulumunun oosit düzeyinde kuvvetli olduğu saptandı. Bu foliküllerde folikül epitel hücrelerinde tutulum izlenmedi. Ancak multilaminar primer folikülden itibaren gelişen tüm foliküllerde granüloza ve teka hücre katmanlarında da zayıftan ortaya değişen GDF 9 immünreaksiyonu saptandı (Resim 4.19 A). Bu bulgu oositte eksprese olduğu bilinen GDF 9 'un granüloza hücre proliferasyonunu indüklemek için bu hücrelere göç ettiğinin bir göstergesi olarak kabul

edildi. Granüloza hücrelerinde depo edilmediğinden dolayı da bu hücrelerde oosite benzer yoğunlukta bir tutulumun olmadığı kanısına varıldı.

Melatonin uygulanan grupta GDF 9 tutulumu değerlendirildiğinde, sham kontrol grubuna benzer tüm preantral foliküllerde oosit düzeyinde kuvvetli immünreaktivite izlenirken, ayrıcalı olarak bu grupta multilaminar primer foliküllerde granüloza katmanını oluşturan hücrelerde de kuvvetli GDF 9 immünreaktivitesi saptandı. Antral foliküllerde oositteki kuvvetli tutulumu ek olarak granüloza katmanında orta deceli yaygın tutulum ilgiyi çekti. Teka katmanında zayıf immünreaksiyon saptandı (Resim 4.19 B). Bu bulgu melatoninin GDF 9 üzerinden folikül epitel hücre proliferasyonunu arttırmış olabileceği kanısına yol açtı.

PKOS uygulanan grupta GDF 9 immünreaktivitesi incelendiğinde, Preantral foliküllerde tutulumun kuvvetli olduğu, antral foliküllerde ise zayıftan ortaya değiştiği izlendi. Bu grupta teka katmanını oluşturan hücrelerde de orta dereceli tutulum saptandı (Resim 4.19 C). Bu bulgu; PKOS patofizyolojisinde gözlenen artan antral folikül sayısını desteklediği kanısını doğruladı. Antral folikülde gözlenen artmış GDF 9 ekspresyonunun folikülün gelişmesini indüklediği, bu nedenle olması gereken dominant folikülden bağımsız, çok sayıda folikülün gelişimini sürdürdüğü düşünüldü.

PKOS + melatonin uygulanan grupta GDF 9 immünreaktivitesi değerlendirildiğinde, diğer tüm gruplardan ayrıcalı olarak tüm gelişim evresindeki foliküllerde oosit düzeyinde kuvvetli tutulum dikkati çekti. İmmünreaktivitenin granüloza katmanını oluşturan hücrelerde zayıftan ortaya değiştiği izlendi. Teka katmanında GDF 9 immünreaksiyonu zayıftan ortaya değişen düzeydeydi (Resim 4.19 D). Bu grupta gözlenen bu bulgular ışığında PKOS oluşturulan grupta GDF 9 ekspresyonunun melatonin uygulaması ile lokalizasyon farkı gösterdiği, oosite depo edildiği saptandı. Sonuç olarak GDF 9 dağılımı açısından melatoninin GDF 9 ekspresyonunu arttırdığı ancak granüloza katmanına taşınma mekanizmasında bir engel oluşturmuş olabileceği, bu yolla çok sayıda antral folikül gelişimini engelleyerek, koruyucu özellik göstermiş olabileceği kanısına varıldı.



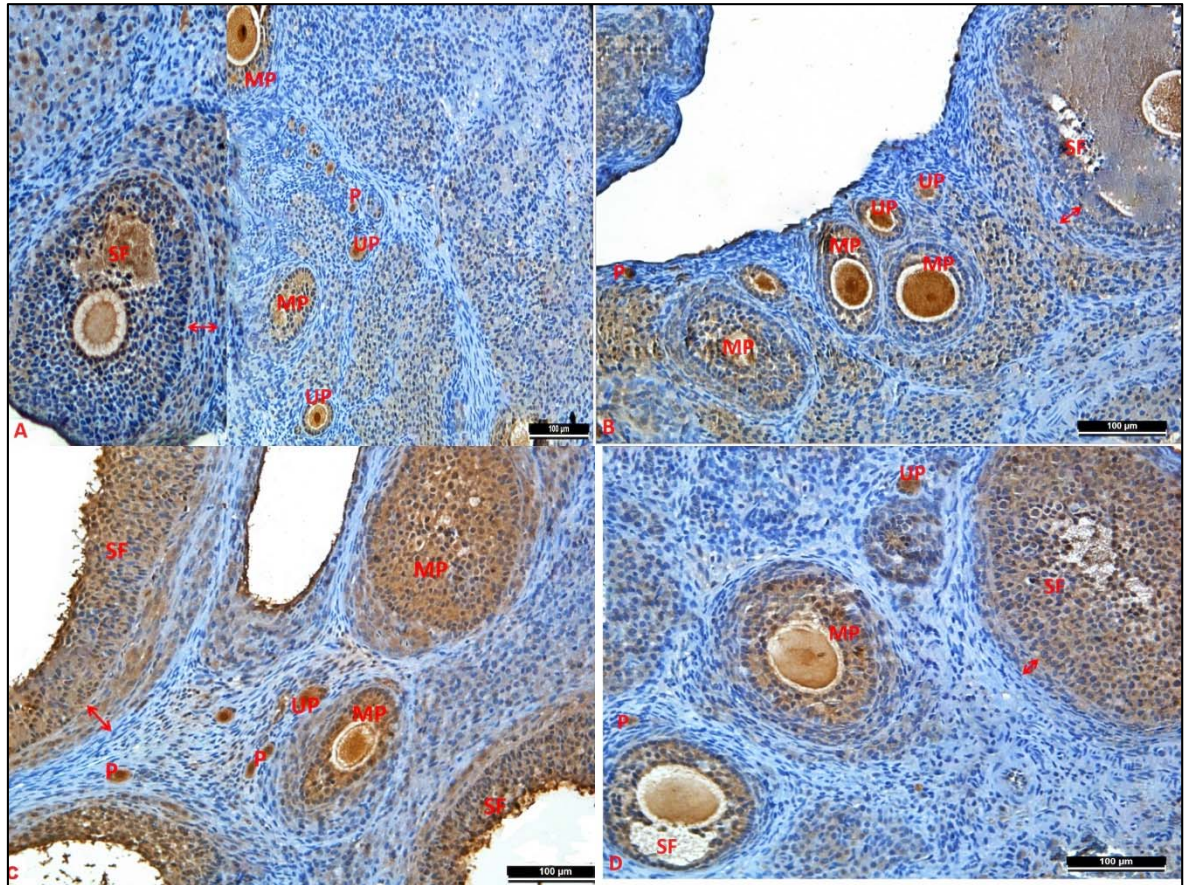
Resim 4.19. GDF 9 immünboyaması. (A): Sham kontrol, (B) Melatonin, (C): PKOS, (D): PKOS + melatonin grubu. P: primordiyal folikül, UP: unilaminar primer folikül, MP: Multilaminar primer folikül, SF: sekonder folikül, GF: Graff folikülü, o: teka interna ve teka eksterna (İmmünperoksidaz – Hematoksilen X200)

Sham kontrol grubu BMP 15 işaretlemelerinde preantrol foliküllerin genelinde oosit ve granüloza hücreleri düzeyinde orta dereceli tutulum izlendi. Antral foliküllerde ise oosit ve granüloza katmanında, ayrıca teka katmanı düzeyinde immünreaksiyonun zayıftan ortaya değiştiği dikkati çekti (Resim 4. 20 A)

Melatonin uygulanan grupta sham kontrol grubundan ayrıcalı olarak preantral foliküllerde tutulumun kuvvetli olduğu dikkati çekti. Bu bulgu, melatoninin oositteki BMP 15 ekspresyonunu arttırdığının göstergesi olarak kabul edildi. Granüloza katmanını oluşturan hücrelerde orta dereceli tutulum izlendi. Antral foliküllerde ise oositte orta dereceli, ancak granüloza ve teka katmanını oluşturan hücrelerde zayıf immünreaktivite belirlendi (Resim 4. 20 B).

Deneyisel PKOS oluşturulan grupta yapılan BMP 15 immünboyamalarında preantral ve antral foliküllerde, oosit ve granüloza hücre katmanı düzeyinde kuvvetli tutulum ilgiyi çekti. Teka katmanlarında orta dereceli BMP 15 reaksiyonu belirlendi (Resim 4. 20 C). Bu bulgu PKOS patogeneziyle uyumlu olarak artan folikülogenezde BMP 15'in de aktif rol aldığının göstergesi olarak kabul edildi.

PKOS + melatonin uygulanan grupta BMP 15 immünreaksiyonu değerlendirildiğinde, preantral foliküllerde oosit ve granüloza katmanı düzeyinde kuvvetli olarak belirlenirken, antral foliküllerde granüloza hücrelerinde tutulumunu ortadan kuvvetliye değiştiği dikkati çekti (Resim 4. 20 D). Bu bulgu, BMP 15 ekspresyonunun beklenildiği üzere deneyisel PKOS modeli ile arttığı, ancak melatoninin bu faktör üzerinden PKOS patogenezinde etkin olamadığı kanısına varıldı.



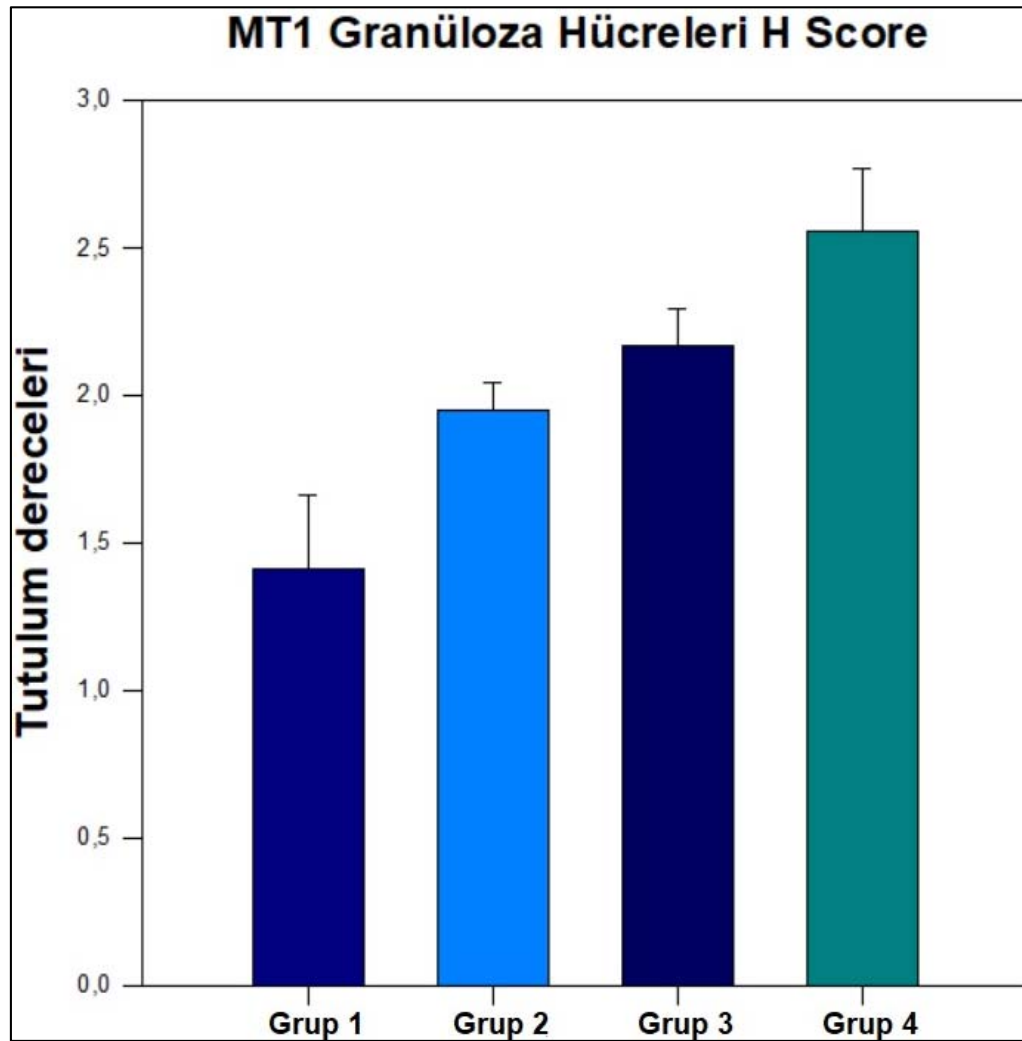
Resim 4.20. BMP 15 immünboyaması. (A): Sham kontrol, (B) Melatonin, (C): PKOS, (D): PKOS + melatonin grubu. P: primordiyal folikül, UP: unilaminar primer folikül, MP: Multilaminar primer folikül, SF: sekonder folikül, GF: Graff folikülü, o: teka interna ve teka eksterna (İmmünperoksidaz – Hematoksilen X200)

4.1.5. H Score bulguları

H score analizleri için, Sigma stat 4.0 programında, One Way Repeated Anova testinde, Holm-Sidak metodu kullanıldı. P değeri <0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Çizelge 4.11. MT1 granüloza hücreleri H score değerleri

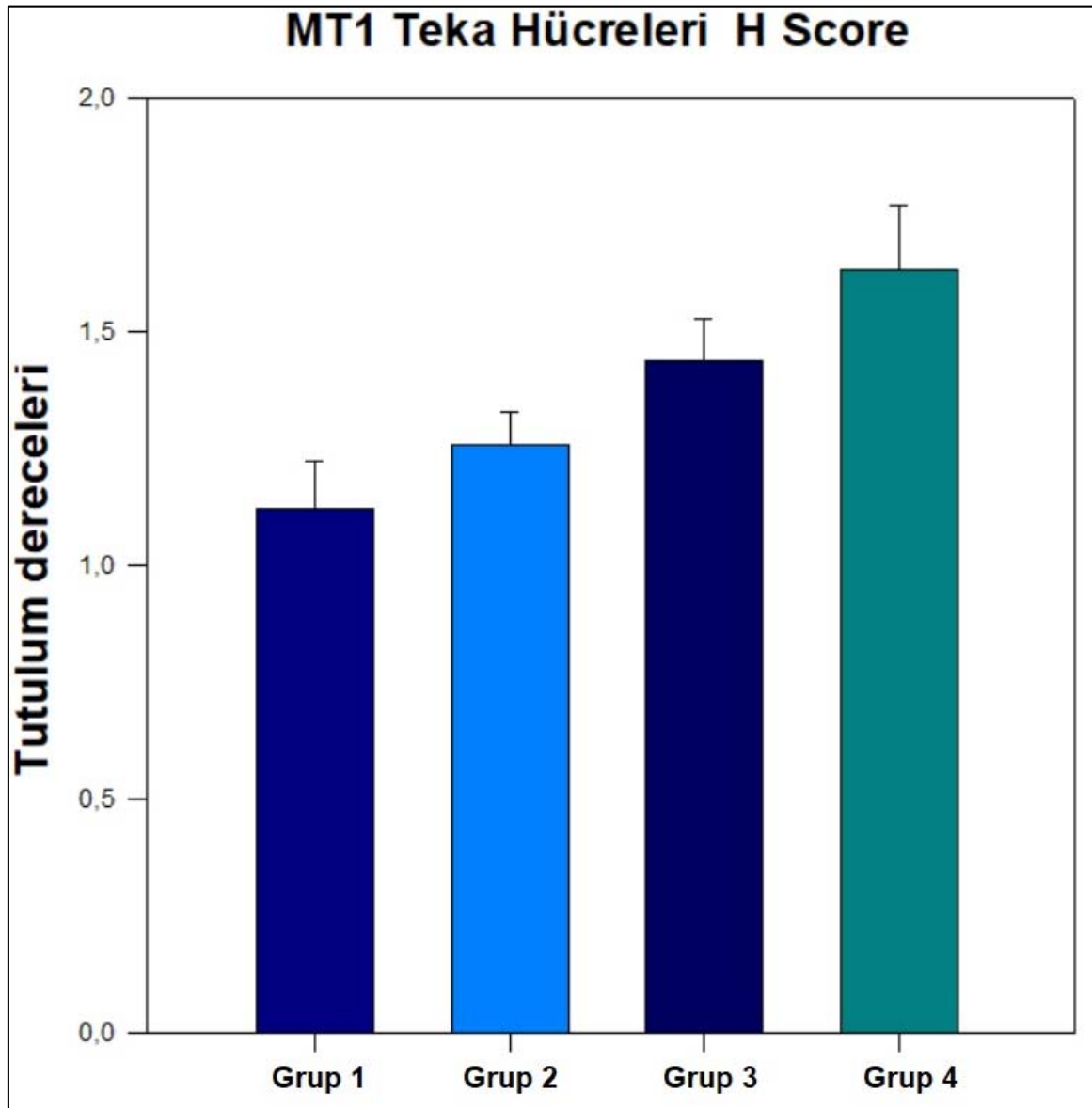
	SHAM GRUBU	MEL GRUBU	PKOS GRUBU	PKOS+MEL
1. RAT	1,3600	1,9400	2,3000	2,0800
2. RAT	1,3000	2,0500	2,0000	2,7000
3. RAT	1,5200	1,8600	2,2500	2,6000
4. RAT	1,4400	2,0100	2,2500	2,7600
5. RAT	1,1600	1,9000	2,3000	2,6400
6. RAT	1,3600	1,8000	2,1800	2,6500
7. RAT	1,2000	2,0400	2,0000	2,4200
8. RAT	1,9600	2,0100	2,0800	2,6000



Şekil 4.6. MT1 granüloza hücreleri H score değerleri; Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PKOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubu

Çizelge 4.12. MT1 teka hücreleri H score değerleri

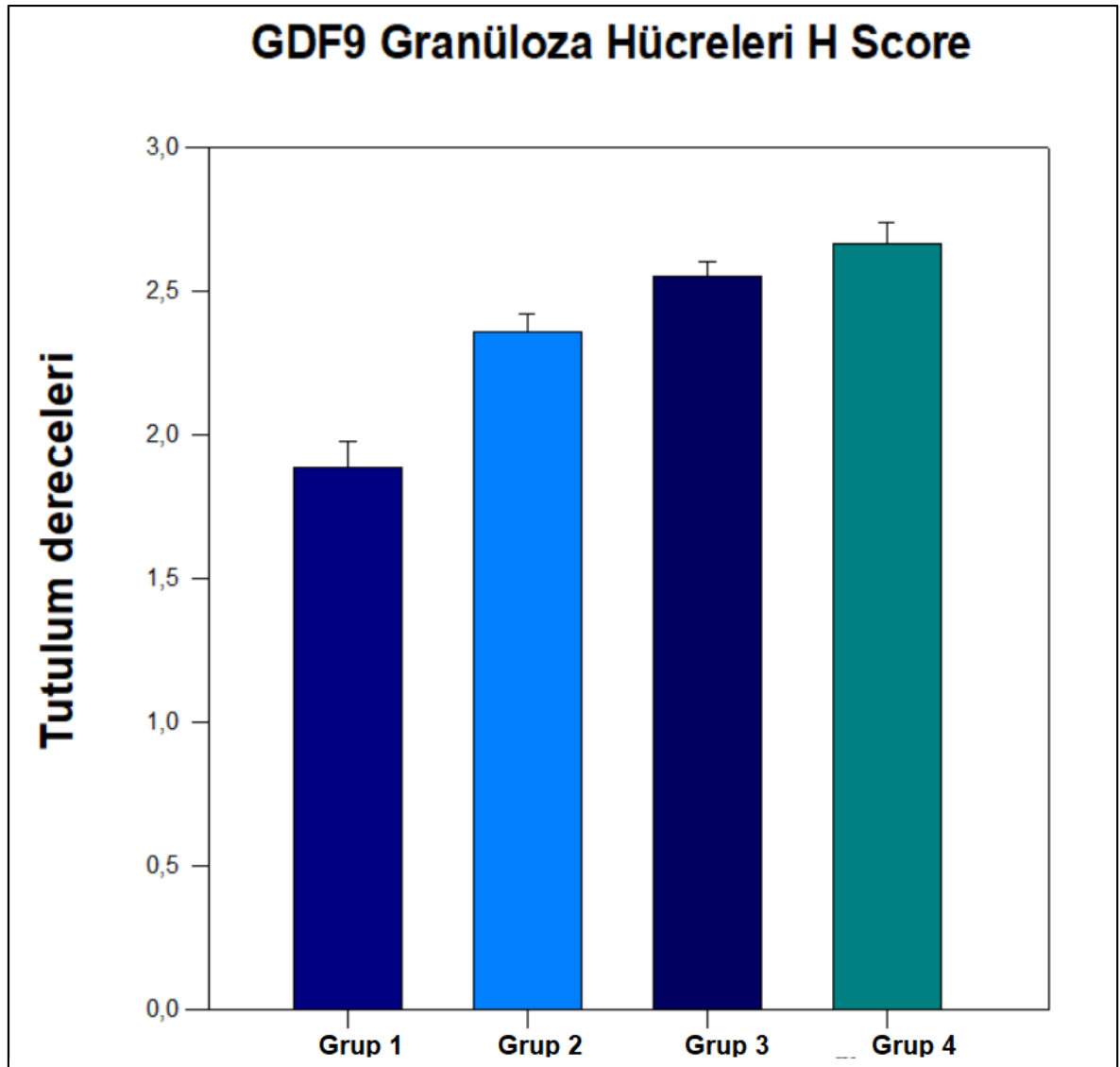
	SHAM GRUBU	MEL GRUBU	PKOS GRUBU	PKOS+MEL
1. RAT	1,0500	1,2000	1,4200	1,5200
2. RAT	1,0600	1,3200	1,3800	1,4900
3. RAT	1,3500	1,2800	1,5400	1,8800
4. RAT	1,0400	1,1900	1,4500	1,5600
5. RAT	1,1200	1,2400	1,5000	1,7800
6. RAT	1,0800	1,2200	1,3700	1,6200
7. RAT	1,1200	1,2100	1,2800	1,5300
8. RAT	1,1540	1,4000	1,5500	1,6800



Şekil 4.7. MT1 teka hücreleri H score değerleri; Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PKOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubu

Çizelge 4.13. GDF9 Granüloza hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu

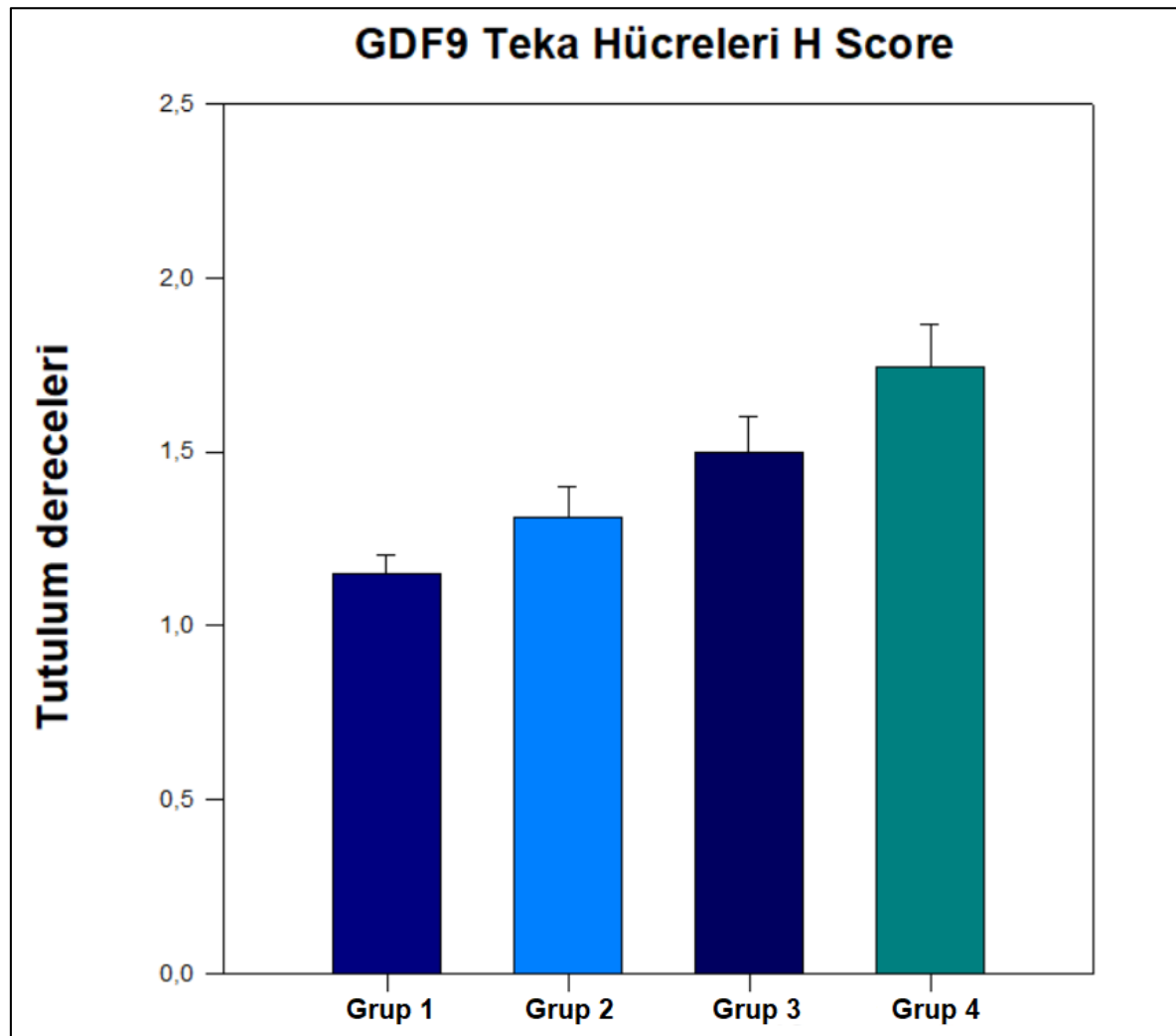
	SHAM GRUBU	MEL GRUBU	PKOS GRUBU	PKOS+MEL
1. RAT	1,9600	2,42000	2,5200	2,600
2. RAT	1,88000	2,3600	2,4800	2,7100
3. RAT	2	2,2800	2,5600	2,6600
4. RAT	1,78000	2,4400	2,5500	2,6800
5. RAT	1,9600	2,3800	2,600	2,700
6. RAT	1,8400	2,400	2,51000	2,800
7. RAT	1,7600	2,3200	2,6500	2,5800
8. RAT	1,9400	2,2600	2,5400	2,6100



Şekil 4.8. GDF9 granüloza hücrelerinde tutulum, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu

Çizelge 4.14. GDF9 Teka hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu

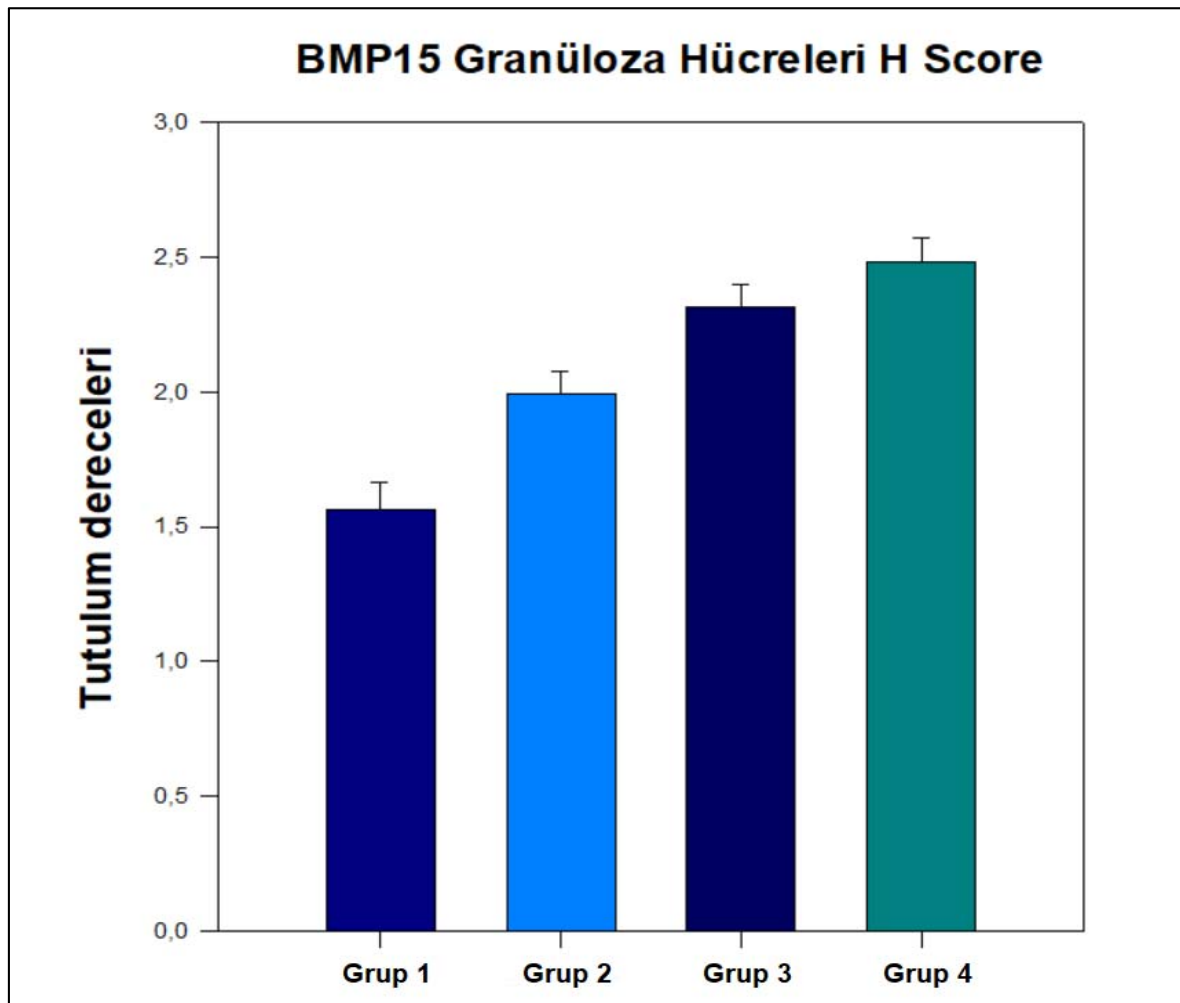
	SHAM GRUBU	MEL GRUBU	PKOS GRUBU	PKOS+MEL
1. RAT	1,200	1,22000	1,3200	1,6800
2. RAT	1,08000	1,1800	1,5400	1,5900
3. RAT	1,1200	1,2400	1,600	1,600
4. RAT	1,1600	1,3200	1,4600	1,7200
5. RAT	1,2100	1,4100	1,500	1,7600
6. RAT	1,100	1,4200	1,4000	1,8200
7. RAT	1,22000	1,3400	1,52300	1,8800
8. RAT	1,1200	1,3600	1,6400	1,9200



Şekil 4.9. GDF9 teka hücrelerinde tutulum , Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu

Çizelge 4.15. BMP15 Granüloza hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu

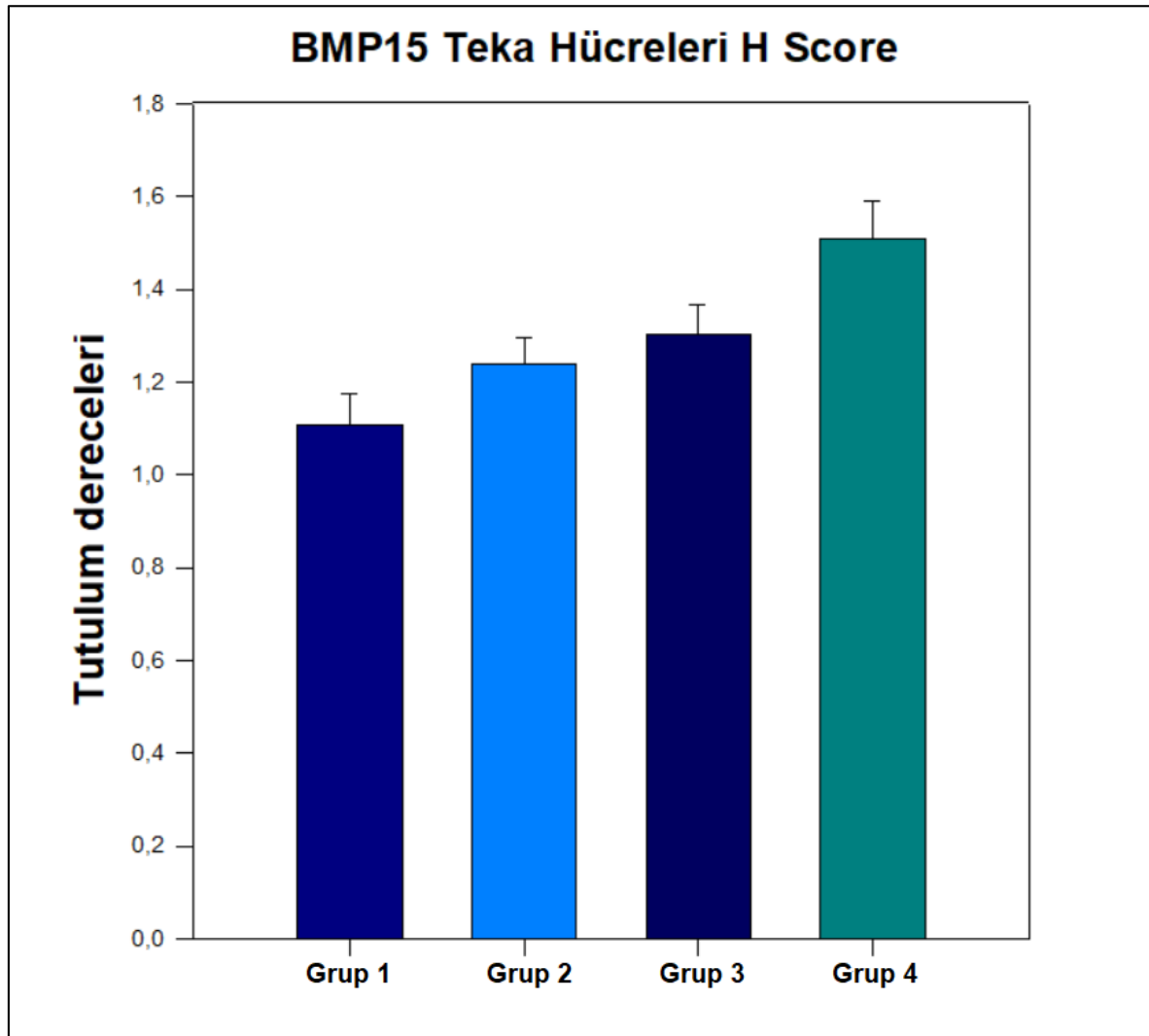
	SHAM GRUBU	MEL GRUBU	PKOS GRUBU	PKOS+MEL
1. RAT	1,56000	1,8800	2,3200	2,5600
2. RAT	1,4200	1,9800	2,4400	2,5000
3. RAT	1,4800	1,8900	2,3600	2,6200
4. RAT	1,5800	2,0200	2,2100	2,3800
5. RAT	1,6200	2,00	2,3800	2,4400
6. RAT	1,7200	1,9800	2,200	2,3600
7. RAT	1,6600	2,1200	2,2800	2,5200
8. RAT	1,4800	2,0800	2,3400	2,4900



Şekil 4.10. BMP15 Granüloza hücrelerinde tutulum, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu.

Çizelge 4.16. BMP15 Teka hücreleri H Score tablosu, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu

	SHAM GRUBU	MEL GRUBU	PKOS GRUBU	PKOS+MEL
1. RAT	1,04000	1,1600	1,2500	1,3800
2. RAT	1,0800	1,300	1,2000	1,6300
3. RAT	1,1200	1,2200	1,3000	1,4900
4. RAT	1,1400	1,2700	1,3200	1,5800
5. RAT	1,0900	1,1800	1,1000	1,4800
6. RAT	1,2200	1,3200	1,1500	1,5600
7. RAT	1,1600	1,2600	1,4000	1,5200
8. RAT	1,0200	1,200	1,2000	1,4400

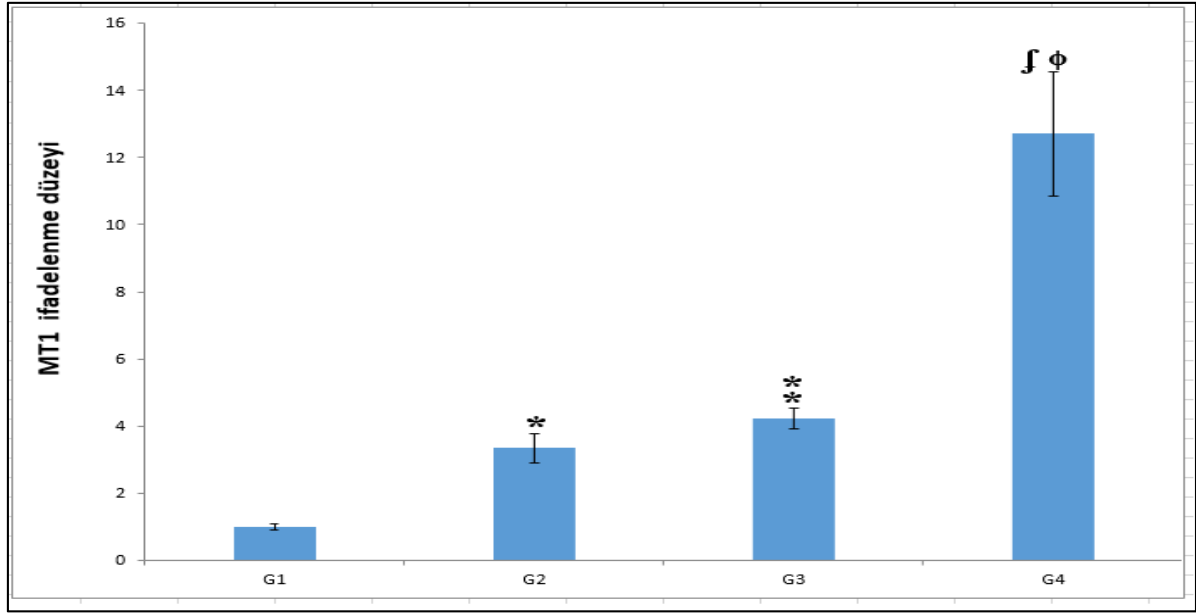


Şekil 4.11. BMP15 Teka hücrelerinde tutulum, Grup 1, CMC uygulanan grup; Grup 2, melatonin uygulanan grup; Grup 3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; Grup 4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu.

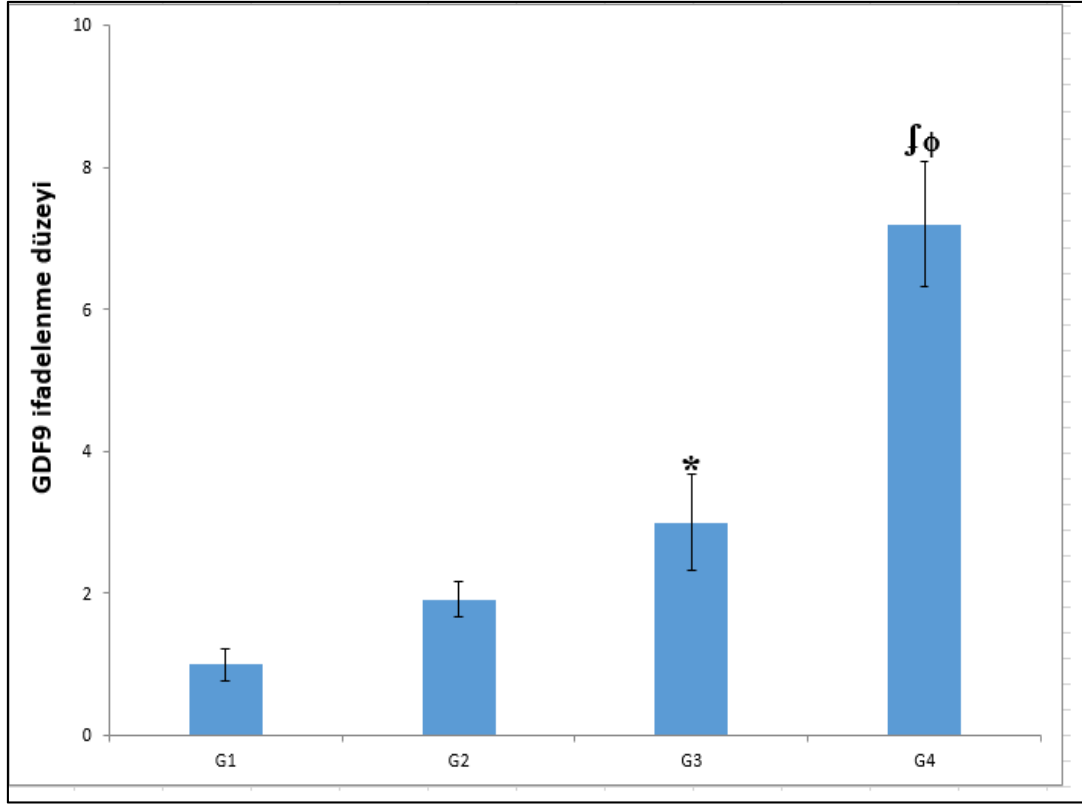
4.2. Real Time PCR Bulguları

MT1, GDF9 ve BMP15 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler cihazı kullanıldı. Rat ovaryum dokularından elde edilen MT1, GDF9 ve BMP15 ve bu genlerin ifadelenmesini normalize etmek için ACTB genlerine özgül primerler ve UPL problemleri kullanılarak çalışıldı. Real Time PCR'da primerlerin ilgili gen dizileri ile bağlanması bu genin ortamdaki derişimi ile doğru orantılıdır. Bir gene ait mRNA ortamda ne kadar fazla bulunursa eşleşmeyle doğru orantılı seyreden amplifikasyonlar ışımının o kadar erken gerçekleşmesine neden olur. Bu bilgiler ışığında, MT1, GDF9 ve BMP15 genlerinin mRNA ifadelenme düzeylerinin karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Bu genlerin mRNA düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı. İfade düzeylerinin karşılaştırmalı analizi Qiagen-REST-2009 (Relative Expression Software Tool, 1) programı ile birlikte Qiagen-RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 programı kullanılarak eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Rat ovaryum dokularında melatonin uygulanan grupta (G2), letrozol ile oluşturulan PKOS grubunda (G3) ve letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubunda (G4) MT1, geninin mRNA ifadelenme düzeylerinde CMC uygulanan gruba (G1) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$). Rat ovaryum dokularında letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubunda (G4) MT1, geninin mRNA ifadelenme düzeylerinde letrozol ile oluşturulan PKOS grubuna (G3) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu gözlemlendi ($p<0.01$) (Şekil 4.6). Rat ovaryum dokularında melatonin uygulanan grupta (G2) GDF 9 geninin mRNA ifadelenme düzeylerinde CMC uygulanan gruba (G1) kıyasla az da olsa bir artış gözlenmesine rağmen, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Rat ovaryum dokularında letrozol ile oluşturulan PKOS grubunda (G3) ve letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubunda (G4) GDF 9 geninin mRNA ifadelenme düzeylerinde CMC uygulanan gruba (G1) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$; $p<0.001$). Yine ovaryum dokularında letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubunda (G4) GDF9 geninin mRNA ifadelenme düzeylerinde letrozol ile oluşturulan PKOS grubuna (G3) kıyasla anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.01$) (Şekil 4.7). Rat ovaryum dokularında melatonin uygulanan grup (G2) ile dokularında letrozol ile oluşturulan PCOS grubunda (G3) BMP 15 geninin mRNA ifadelenme düzeylerinde CMC uygulanan gruba (G1) kıyasla az da olsa bir artış gözlenmesine rağmen, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubunda (G4) BMP 15

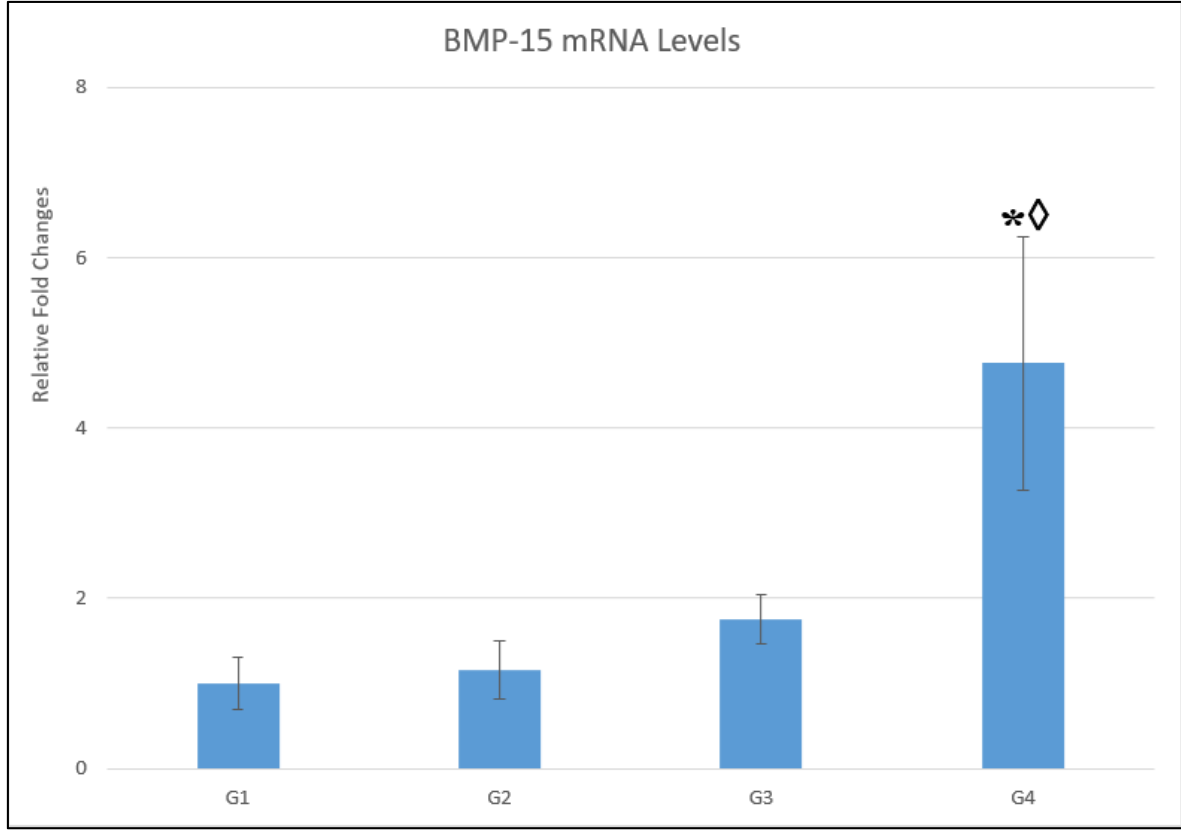
geninin mRNA ifadenme düzeylerinde CMC uygulanan gruba (G1) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$; $p<0.001$). Yine ovaryum dokularında letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubunda (G4) BMP 15 geninin mRNA ifadenme düzeylerinde letrozol ile oluşturulan PCOS grubuna (G3) kıyasla anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.01$) (Şekil 4.8).



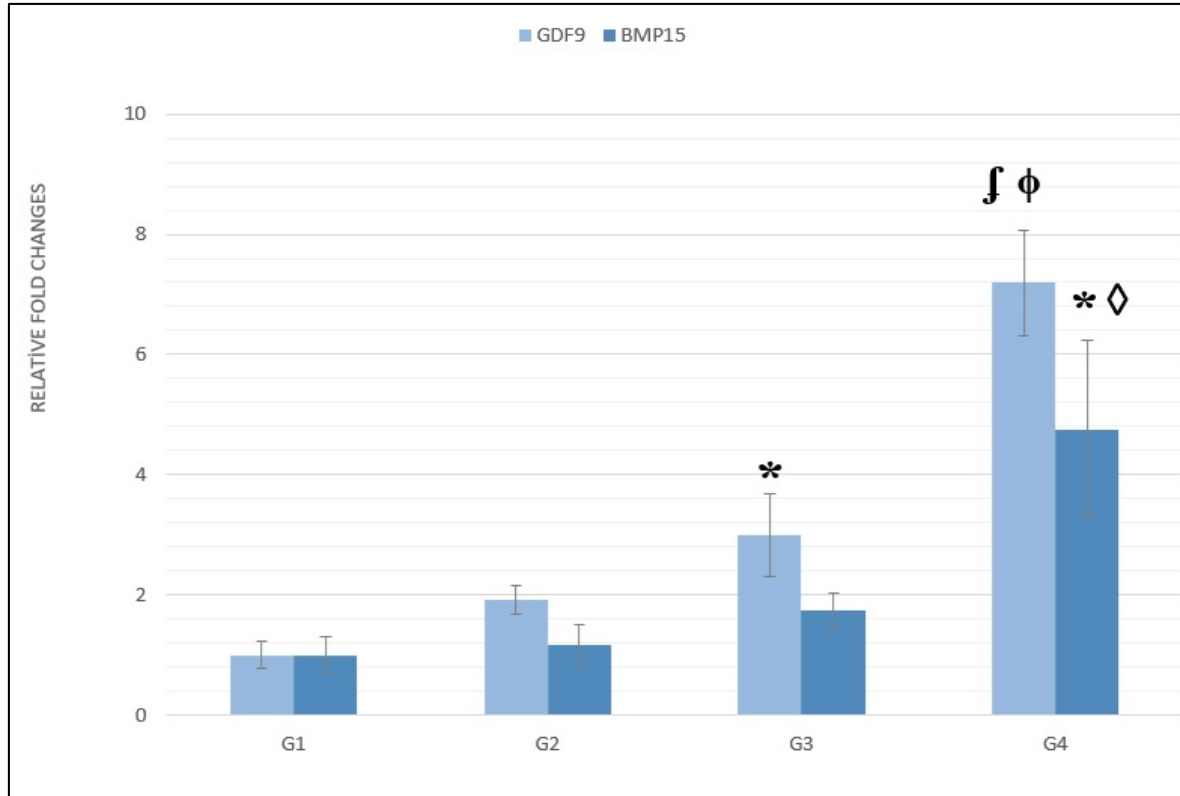
Şekil 4.12. Rat ovaryum dokusunda MT1 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik. MT1 geninin ifade düzeyi FACT mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p<0.05$ G1 grubuna kıyasla; ** $p<0.01$ G1 grubuna kıyasla; f $p<0.001$ G1 grubuna kıyasla; ϕ $p<0.01$ G3 grubuna kıyasla. G1, CMC uygulanan grup; G2, melatonin uygulanan grup; G3, letrozol ile oluşturulan PKOS grubu; G4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PKOS grubu



Şekil 4.13. Rat ovaryum dokusunda GDF9 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik. GDF9 geninin ifade düzeyi ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p < 0.05$ G1 grubuna kıyasla; ‡ $p < 0.001$ G1 grubuna kıyasla; ϕ $p < 0.01$ G3 grubuna kıyasla. G1, CMC uygulanan grup; G2, melatonin uygulanan grup; G3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; G4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu.



Şekil 4.14. Rat ovaryum dokusunda BMP15 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik. BMP15 geninin ifade düzeyi ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *, $p < 0.05$ G1 grubuna kıyasla; ‡ $p < 0.001$ G1 grubuna kıyasla; ◊ $p < 0.01$ G3 grubuna kıyasla. G1, CMC uygulanan grup; G2, melatonin uygulanan grup; G3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; G4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu



Şekil 4.15. Rat ovaryum dokusunda GDF9 ve BMP15 geninin mRNA ifadenme düzeyindeki değişiklik. Bu genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p < 0.05$ G1 grubuna kıyasla; f $p < 0.001$ G1 grubuna kıyasla; ϕ $p < 0.01$ G3 grubuna kıyasla. G1, CMC uygulanan grup; G2, melatonin uygulanan grup; G3, letrozol ile oluşturulan PCOS grubu; G4, letrozol ile oluşturulan ve melatonin uygulanan PCOS grubu.

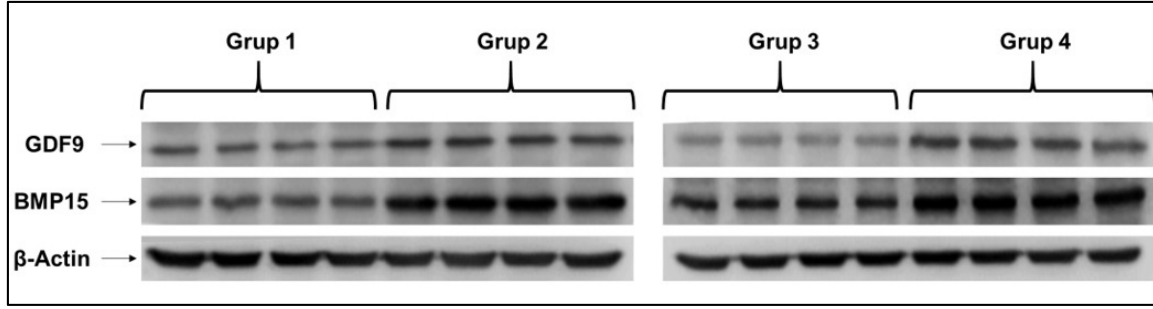
4.3. Western Blot Bulguları

PKOS patogenezinde etkili olduğunu düşündüğümüz GDF 9 ve BMP 15 western blot analizi sonuçlarına göre melatoninin her iki büyüme faktörünün ekspresyonunu protein düzeyinde artırdığı sonucuna varıldı. Bu iki büyüme faktöründen GDF 9'un BMP 15'e kıyasla PKOS patogenezinde daha etkili olabileceği belirlendi. Housekeeping olarak kullanılan β -aktinin ise gruplar içinde farklılık göstermediği görüldü (Şekil 4.16).

GDF 9 ; 51 kDa,

BMP 15 ; 45 kDa,

B-actin ; 45 kDa



Şekil 4.16. GDF 9 ve BMP 15 western blot analizi sonuçları

5. TARTIŞMA

Polikistik over sendromu üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluk olarak bilinmektedir. Sendromun epigenetik mekanizmalar ve obezite gibi çevresel faktörleride içeren multifaktoriyel etiyojisi tedavide heterojeniteye neden olmakta ve bağlantılı olarak sendromun patofizyolojisinin anlaşılmasını güçleştirmektedir. Dünya genelinde etkilenen kadın popülasyonu göz önüne alındığında sendromun tedavisi önem arz etmektedir. Sendromun semptomlarındaki heterojeniteyle de ilişkili olarak klinik hedefe göre tedavi prosedürleride çeşitlenmektedir [164].

Literatürde sendromun patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması açısından Kafali ve arkadaşları (2003) ratlarda % 1'lik CMC'de çözünmüş, letrozole ile indüklenebilen PKOS modeli geliştirmişlerdir [165]. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada 34 adet ratı 1'i kontrol grubu olmak üzere 4 deney grubuna ayırıp, 21 gün süresince 0,1, 0,5 ve 1 mg/kg dozlarda letrozole uygulayıp, östros döngünün uzunluğuna karar verilmesi için vajinal smear toplamışlar ve serum hormon seviyelerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar deney sonunda, PKOS gruplarında subkapsüler kist sayısında artış, kapsüler kalınlaşma ve korpus luteum sayısında azalma, teka hücrelerinde hiperplazi, olduğunu belirlemişlerdir. Hormonal analizler neticesinde ise PKOS gruplarından özellikle 1 mg/kg doz uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran serum LH, FSH ve testosteron seviyelerinde artış tespit etmişlerdir. Bu model çok sayıda kriteriyle insanlardaki polikistik over sendromuyla uyumludur.

Androstenedion ve testosteronun östrojene dönüşümünü sağlayan aromataz enzimi baskılayan, aromataz inhibitör olan, letrozole ovulasyon indüksiyonu için kullanılan bir etken maddedir [166] ancak aşırı dozları östrojen sentez mekanizmasını hasarlayarak PKOS'u indüklemektedir. Bu modeli temel alan bir başka çalışma gurubu olan Jahan ve arkadaşları da (2016) 6 haftalık 155 ± 10 g ağırlığında 25 adet Sprague-Dawley cinsi ratı 5 deney grubuna rastgele seçip, PKOS indüksiyonu için letrozole kullanmışlardır. Deney süresince östros döngünün uzunluğunu takip etmişlerdir. Deney grupları şu şekilde dizayn edilmiştir; 2 mg/kg CMC verilen kontrol grubu, 1 mg/kg letrozole verilen PKOS grubu, 2 mg/kg metformin verilen 3. deney grubu ile 21. günden 36. güne kadar rutin olarak 100 mg/kg/day metformin verilen rutin-1 grubu ve 150 mg/kg/day metformin verilen rutin-2 grubu. Araştırmacılar, subkapsüler kist sayısında artış, granüloza katmanında incelme ve

teka hücrelerinde hiperplazi gibi histopatolojik veriler neticesinde PKOS'un indüklendiğini göstermişlerdir [167].

Bu çalışmada letrozole ile indüklenen PKOS modeli kullanıldı. PKOS patofizyolojisiyle uyumlu olarak aromataz inhibitör olan letrozolün, antral folikül sayısında artışa ve östros döngüde bozulmalara, granüloza hücre katmanında incelmelere, hilar hücrelerinde hiperplaziye, granüloza hücreleri arasında apoptoza neden olduğu gözlemlendi. PKOS patofizyolojisiyle ilişkili olarak bozulmuş oksidatif stres dengesinin, hücresel hasarı indüklediği ve minimal ekstraselüler ödem oluşumu sağladığı, granüloza hücrelerinin organizasyonunu bozduğu, ve bu hücre katmanında minimal ekstraselüler ödem oluşumunun yanısıra zona pellusida da düzensiz organizasyona neden olduğu görüldü. Tüm bu etkilerinin yanısıra aynı zamanda letrozolün folikül sayısında da değişimlere neden olduğunu belirlendi. Bu bağlamda literatürde PKOS patofizyolojisinin, primordiyal folikül sayısında artışa [168] veya anlamlı olmayan bir azalışa [169] neden olduğuyla ilgili çalışmalar olsa da, bu çalışmaların aksine, söz konusu çalışmada primordiyal folikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu gözlemlendi. Literatürle uyumlu olarak antral folikül sayısında artış olduğu belirlendi.

Polikistik over sendromu tedavisinde, yaşam standartlarının değiştirilmesi, ameliyat veya ilaç kullanımı gibi çok çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bu metodlardan özellikle ilaç kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Kullanılan bu ilaçların arasında Klomifen Sitrat, Metformin ve Tamoxifen sayılabilir. Ancak söz konusu ilaçların yan etkileri göz önüne alındığında alternatif yöntemlerin tedavideki yeri gün geçtikçe önem teşkil etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ovaryumdaki oksidatif stres, inflamasyon ve endotel hücrelerin aktivasyonunun, PKOS patofizyolosinin temelini oluşturduğu ifade edilmektedir [170]. Buradan yola çıkılarak hücresel oksidatif stresin azaltılmasının oositin olgunlaşmasını indüklerken, ilişkili olarak infertilitenin azalmasına neden olacağı ifade edilmektedir [168]. Hücresel oksidatif stresin azaltılmasında en önemli ajan ise antioksidanlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda gittikçe önem kazanan antioksidanlar arasında en üst sırayı melatonin almaktadır. Lipofilik yapıdaki melatonin hücresel stres üzerindeki etkisini reseptör aracılı mekanizma, non-reseptör aracılı mekanizma ve protein reseptör aracılı mekanizma ile gerçekleştirmektedir. Bu çalışmada mevcut literatür bilgisinden yola çıkılarak ekzojen melatoninin PKOS patofizyolojisindeki reseptör aracılı mekanizmasının

anlaşılması için, üreme döngüsünde görev alan melatonin reseptör olan , MT1 reseptörü tercih edildi.

Literatürde Li ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada melatonin reseptör 1A geninin sirkadyan ritim ve reproduktif süreçlerin düzenlenmesinde görev aldığını ifade etmişlerdir. MTR1A'nın söz konu aktiviteleri, bu geni polikistik over sendromunun patofizyolojisinde rol sahibi yapmaktadır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada MTR1A gen polimorfizminin PKOS ile ilişkisinin araştırılmasını amaçlamışlardır. Bu amaçla 482 PKOS'lu ve 522 sağlıklı Çin popülasyonundan bireyle çalışmışlardır. Denekler MTR1A açısından polimorfizm, plazma glukoz seviyesi, oral glukoz tolerans testi süresince insülin seviyeleri açısından değerlendirilmişlerdir. Ve araştırmacılar sonuç olarak SNP rs2119882 polimorfizmini PKOS ile ilişkilendirmişlerdir [171].

Tian ve arkadaşları (2017) koyun oositlerinde MT1 ve MT2 melatonin reseptörlerinin varlığını germinal vezikül ve metafaz II evresindeki oositlerde ve granüloza hücrelerinde göstermişlerdir [172]. Çalışmada, kumulus-oosit kompleksi $0,10^{-3}$, $0,10^{-5}$, $0,10^{-7}$, $0,10^{-9}$, $0,10^{-11}$ M konsantrasyonda melatonin eklenmiş medyumlarla kültüre edilmiştir. Western blot ve immunofloresans metodlarıyla MT1 ve MT2 reseptörlerin kumulus hücre büyümesi, nükleer olgunlaşma ve embriyo gelişimine etkisini (GDF 9, DNMT1, PTX3, HAS2 ve EGFR) ilişkili gen ekspresyonları üzerinden değerlendirmişlerdir. Ve sonuç olarak $0,10^{-7}$ M melatonin konsantrasyonunun nükleer olgunlaşma, kumulus hücre genişlemesi, yarıklanma ve blastosist oranlarını artırdığını tespit etmişlerdir. Melatoninin oositte BMP 15 ekspresyon seviyesini, kumulus hücrelerinde ise PTX3, HAS2 ve EGFR ekspresyon seviyelerini artırdığını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar MT1'in kumulus hücrelerindeki yüksek seviyedeki varlığından yola çıkarak bu ilişkinin MT1 reseptör aracılığıyla gerçekleştiği sonucuna varmışlardır.

Clemens ve arkadaşları (2001) yılında yaptıkları çalışmada 2-[125I]-iodomelatoninin rat ovaryumunda granüloza hücre membranına yüksek afinite ile bağladığını göstermişlerdir. Araştırmacılar immunoblot analizleri ve anti-mt1 reseptör antikoru kullanarak da MT1 reseptörünün rat ovaryumundaki varlığını göstermişlerdir. Melatoninin ovaryumun gonadotropinlere verdiği cevabı değiştirmesi, intra-ovaryan aktivitesiyle ilişkilidir. Araştırmacılar bu bilgidan yola çıkarak melatoninin intra-ovaryan aktivitesini foliküler gelişimin in-vivo ve in-vitro modellerinde araştırmayı amaçlamışlardır. Araştırmacılar, bu

amaçla immature dişi ratlara 0,6 mg/d subkutan östradiol vererek foliküller büyümei indüklemişlerdir. Östradiol uygulamasının, in-vivoda 2-[125I]-iodomelatoninin bağlanmasını azalttığını belirlemişlerdir [173]. Östradiol uygulamasının ardından, immunoblot analizler sonucunda MT1 reseptör ekspresyonunun rat ovaryumunda down-regüle olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar bu bulgulardan yola çıkarak melatoninin intra ovaryan olarak önemli bir görevi olduğu sonucuna varmışlardır [173].

Witt-Enderby ve arkadaşları (2003) melatonin sentez ve salgı mekanizmasının gün içerisinde ritmik değişimine bağlı olarak reseptör ekspresyonunun da değiştiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, MT1 ekspresyonu yapan hücrelerin melatoninle inkübe edilmesi neticesinde, melatonin seviyesinin maksimum olduğu noktada, reseptör ekspresyonunun minimum olduğunu veya tam tersi durumunda söz konusu olduğunu ifade etmişlerdir. Bu durum melatoninin lipofilik yapısıyla bağlantılı olarak, reseptör ekspresyonunu, up-regüle veya down-regüle etmesiyle ilişkilendirilmiştir [174].

Söz konusu çalışmada PKOS patofizyolojisi ve bu patofizyolojide melatoninin etkilerinin anlaşılması için MT1 reseptörünün moleküler düzeyde incelenmesi hedeflendi. İmmünohistokimyasal analizler neticesinde literatürle uyumlu olarak, sham grubunda MT1 tutulumun foliküler gelişime paralel olarak azaldığı ilgiyi çekti. Melatonin uygulanan grupta MT1 immünboyamasında preantral foliküllerde oositte ki kuvvetli tutulumun, multilaminar primer folikül evresinde granüloza katmanında da varlığı ilgiyi çekti. Bu grupta ayrıcalık olarak antral foliküllerde tüm granüloza ve teka katmanı genelinde zayıftan ortaya değişen MT1 immünreaksiyonu dikkati çekti. Bu bulgu, melatonin uygulamasının melatonin reseptör ekspresyonunu arttırdığını, gösterdi. Gen ifade düzeylerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılan real time PCR analiz sonuçları neticesinde, immunohistokiya sonuçlarına benzer olarak, MT1 reseptör ekspresyonunun melatonin uygulanan grupta sham grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi. Mevcut literatür bilgisinden de anlaşıldığı üzere melatonin üreme döngüsündeki aktivitesini MT1 reseptörü aracılığıyla, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri üzerinden yapmaktadır. Deney süresince kullanılan dozun melatonin reseptör ekspresyonunu artığı belirlendi.

Benzeri bilgilerden yola çıkarak, Shreeve ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada melatoninin PKOS patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, Rotterdam kriterlerine göre PKOS teşhisi konulmuş olan 18-40 yaş

aralığındaki bireylerle çalışmışlardır. Kontrol grubu 18-40 yaş aralığında düzenli menstrual siklusa sahip bireylerden oluşurken gece vardiyası çalışanları, hamile kadınlar, malignite, tiroid, hiperprolaktinemi gibi patolojilere sahip olanlar çalışma dışında bırakılmıştır. Toplamda 26 kontrol grubu ve 26 deney grubu olmak üzere 52 adet denekle çalışılmıştır. Deneklerin uyku kalitesi değerleri Pittsburg Sleep Quality Index'e göre, gündüz uykusuz geçirdikleri zaman ise Epworth Uykusuzluk Skalasına (ESS) göre skorlanmıştır. Deneklerin üriner örnekleri gün boyunca belirli saatlerde toplanarak melatonin metaboliti olan 6-sulfaktoksimelatonin (aMT6s) ve 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG) değerleri kaydedilmiştir. PKOS'lu kadınlarda melatonin metaboliti, 6-sulfaktoksimelatonin (aMT6s) ve 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG) gece sentez miktarları, kontrol grubuna nazaran hayli yükselmiş olarak bulunmuştur [145]. Araştırmacılar buradan yola çıkarak, PKOS, melatonin ve oksidatif stres arasında bir ilişki olabileceğini ifade etmişlerdir.

Mevcut literatür bilgisinden yola çıkılarak PKOS ve melatonin ilişkisinin araştırılmasının amaçladığı bu çalışmada, deneysel PKOS grubunun immünohistokimyasal verilerinde MT1 reseptör immünreaktivitesi gelişmekte olan bütün foliküllerde belirgin olarak izlendi. Preantral foliküllerde diğer gruplara benzer olarak gözlenen kuvvetli immünreaksiyon, bu grupta antral foliküllerde de belirgin iken teka katmalarında orta dereceli tutulum söz konusuydu. Gen ifade düzeylerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılan Real-Time PCR analiz sonuçları PKOS grubunda da sham grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği şeklindeydi. Bu bulgu oositte ve folikül epitel hücrelerinde tutulum gösteren MT1 'in immünohistokimyasal verileriyle uyumluydu. Bu verilerden yola çıkarak PKOS'ta bozulmuş hücresel oksidatif stresin dengelenmesi için hücrelerin melatonin reseptör ekspresyonunda ve sonraki mekanizmasında gen ve protein düzeyinde artışa gitmesi şeklinde yorumlandı.

Benzer şekilde, Ahmadi ve arkadaşları (2017) araştırmalarında, farelerde indükledikleri PKOS modelinde melatoninin ovaryum histolojisi üzerine etkilerini incelemeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla 30 adet NMRI türü fare, distile su verilen kontrol grubu, 5 gün boyunca 10 mg/kg melatonin verilen grup, PKOS indüksiyonu için 20 gün boyunca 6 mg/kg dehydroepiandrosteronedione (DHEA) uygulanan grup, PKOS indüksiyonundan sonra, 5 gün süresince sonra 10 mg/kg melatonin uygulanan grup ve 20 gün süresince 6 mg/kg dehydroepiandrosteronedione (DHEA) ve 10 mg/kg melatonin uygulanan grup olmak üzere 5 deney grubuna ayırmışlardır. Deney sonunda deney grupları granüloza hücre tabakası, teka

folikülü ve folikül çapı gibi belirteçler açısından incelenmiştir. Araştırmacılar bu verilerden yola çıkarak PKOS indüklenen gruplarda antral folikül ve korpus luteumda azalmanın yanısıra primordiyal, primer, pre-antral ve kistik folikül sayısında artış olduğunu belirlerken, melatoninin granüloza hücre tabakası kalınlığında artmaya ve 4 . ve 5 . denek gruplarında 3. denek grubuna nazaran teka folikül tabakası kalınlığında azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir. Söz konusu bulgulardan yola çıkılarak, DHEA ile indüklenen PKOS 'ta melatoninin ovaryum hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu sonucuna varılmıştır [168].

Terzieva ve arkadaşları (2013) çalışmalarında, PKOS'lu kadınlar ile sağlıklı kadınlar arasında serum melatonin düzeylerini ölçmeyi amaçlamışlardır. Vaka-kontrol olarak dizayn edilen çalışmanın amacı PKOS'lu kadınlarda gündüz ve gece melatonin seviyelerini ölçmektir. Bu amaçla 30 PKOS'lu ve 25 sağlıklı bireyden oluşan denek grubuyla çalışılmıştır. Bütün hormon ölçümleri son adet döngüsünün başlangıcından itibaren 3. ve 5. günler arasında gerçekleştirilmiştir. PKOS'lu kadınlarda sabah melatonin seviyeleri yüksek düzeyde ölçülürken gece melatonin seviyeleri sağlıklı bireylere göre daha düşük çıkmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar PKOS'lu kadınlarda melatonin değişimlerinin sendromun patofizyolojisinin anlaşılmasını kolaylaştıracağı sonucuna varmışlardır [175].

Nıkmard ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada, indükledikleri PKOS modelinde, melatoninin, oositin nükleer olgunlaşmasına etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu amaçla 77 dişi, prepubertel ratla çalışmışlardır. Modelin kontrolü için 4 hafta süresince vajinal smear örnekleri toplayıp, vajinal sitolojiden yola çıkarak östros döngünün uzunluğunu saptamışlardır. Eliza metoduyla LH, FSH ve testosteron seviyelerini ölçmüşlerdir. Ovaryum morfolojisinin tespiti için dokuları formalinle fıkse edip parafin blok hazırlayıp Hematoksilen-Eozin boyama yapmışlardır. Bu amaçla, preantral ve antral folikül ile korpus luteumun sayısına bakıp, granüloza ile teka hücre tabakalarının kalınlığını ölçmüşlerdir. Oosit toplamak amacıyla 6 haftalık ratları kullanmışlardır. Ratlar servikal dislokasyondan 48 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Ovaryumlar 2.5 ml'lik medyuma toplanmıştır. Oosit-kumulus kompleksi büyük antral foliküllerden steril iğnelerle toplanmıştır ve oositlerin nükleer maturasyonuna germinal vezikül varlığıyla karar verilmiştir. Yaklaşık 10 adet oosit-kumulus kompleksi 1ml'lik IVM medyumunda kültüre edilmiştir. Oositler olgunlaşmış mikrokapasitasyonlu epididimal spermatozoa ile ko-inkübe edilip medyuma alınmıştır. 20 hafta sonra in-vitro fertilizasyon oranları hesaplanmıştır. Ve sonuç olarak melatonin IVM oranlarını ve yarıklanma oranlarını artırdığını tespit etmişlerdir. Ancak oositte oksidatif stres

belli bir noktaya kadar gereklidir ve melatonin bu seviyeyi dengelemektedir. Melatonin folikül gelişimi için önemlidir ve oositte nükleer maturasyonu desteklemektedir. IVM medyumuna melatonin eklenmesi PKOS'ta oksidatif stres hasarlarını ve antioksidanların fizyolojik konsantrasyonda eksikliğini telafi etmektedir [176].

Kim ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmayı insan foliküler sıvısının yüksek miktarda melatonin içermesi temeline dayandırmışlardır. Bu çalışmada, IVF tedavisi gören polikistik overli dişilerin, *in vitro* IVM medyumuna eklenen melatoninin etkilerini ölçmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, PKOS tedavisi gören ve IVF embriyo transferi bekleyen bireyleri seçmişlerdir. Faz-1 ve faz-2 çalışmaları yapmışlardır. Faz-1 aşamasında 111 hasta bireyle, faz-2 aşamasında ise, 132 hasta bireyle çalışmışlardır. PKOS'lu hastaların, IVF olgunlaşma medyumuna olgunlaşma evrelerinde melatonin ekledikleri ve eklemedikleri ikişer grup oluşturmuşlardır. Deneyler sonucunda PKOS'lu bireylerin IVF medyumuna eklenen melatoninin klinikte sonuç alma ihtimalini artırdığını göstermişlerdir [177].

Tagliaferri ve arkadaşları (2018) pilot çalışmalarında, 6 ay boyunca melatonin verilen PKOS'lu kadınların metabolik, endokrin ve klinik verilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında 40 adet PKOS'lu kadınla çalışmışlardır. Gönüllü kadınlar üreme çağındadır ve Rotterdam kriterlerine göre teşhis edilmişlerdir. Çalışma menstrual siklusun erken foliküler fazına göre (3-7. günler) kurulmuştur. Melatonin uygulamasının androjen seviyelerini düşürürken, FSH seviyelerinde artışın yanı sıra, anti-Müllerian hormon serum seviyelerinde 6 aydan sonra belirli seviyede düşüşe neden olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, 6 aylık melatonin uygulamasından sonra deneklerde menstrual siklus ritimlerinde görülen düzelmeden de yola çıkarak melatoninin PKOS'tan etkilenen kadınlar için potansiyel terapotik ajan olarak ifade etmişlerdir [178].

Sarayu ve arkadaşları (2014) çalışmalarında, ratlarda oluşturdukları polikistik over sendromunda, melatoninin metabolik sistem ve üreme sistemi üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında 38 adet deney hayvanı ile 5 deney grubu oluşturmuşlardır. Sham kontrol grubu için 6, diğer 4 grup için 8 deney hayvanı kullanmışlardır. PKOS indüksiyonu için 21 günlük farelere, 20 mg/kg testosteron subkutan olarak 35 gün boyunca uygulanmıştır. Uygulamaların hepsine ratlar 21 günlükken başlanmış ve 35 gün süresince devam etmiştir. Pozitif kontrol grubu, PKOS kontrolü olarak tasarlanmış ve yalnızca testosteron uygulanmıştır. Metformin grubu, standart grup olarak tasarlanmış ve

20 mg/kg testosteron ve 500 mg/kg metformin uygulaması birlikte yapılmıştır. Standart grup, melatoninin tedavi edici etkisinin karşılaştırılmasına imkan sağlamıştır. 4. deney grubu, 1 mg/kg melatonin ve 20 mg/kg testosteron uygulanan grup olarak tasarlanırken, son grupta 2 mg/kg melatonin ve 20 mg/kg testosteron uygulanan gruptur. Araştırmacılar, vajinal smear ve biyokimyasal ölçümler ile PKOS indüklenmesini desteklerken deney süresi bitiminde melatoninin, uterus ve ovaryumlardaki etkisini histolojik olarak incelemiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar melatoninin PKOS sendromunda terapotik bir ajan olduğunu tespit etmişler ve 2 mg/kg dozda 1 mg/kg doza nazaran daha iyi sonuç elde etmişlerdir [179].

Son yıllarda yapılan benzeri çalışmalardan da anlaşıldığı üzere, melatonin folikülü oksidatif strese karşı korumaktadır ve eksikliği PKOS'u indüklemektedir ancak halen PKOS patofizyolojisinin ve bu patofizyolojinin mekanizmasında melatoninin aktivitesi tam olarak anlaşılmış değildir. PKOS ve melatonin ilişkisinin anlaşılması için üreme sisteminde görev alan MT1 reseptörü üzerinden yapılan bu çalışmada PKOS+melatonin uygulanan grupta ki immunohistakimyasal değerlendirmeler neticesinde MT1 immünboyamalarında tüm gelişim evresindeki foliküllerde kuvvetli MT1 tutulumu ilgiyi çekti. Preantral ve antral foliküllerde hem oosit hem de granüloza katmanını oluşturan hücrelerde kuvvetli immünreaktivite gözlenirken, teka katmanında da ortadan kuvvetliye değişen yaygın tutulum dikkati çekti. Gen ifade düzeylerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılan real time PCR analizleri neticesinde PKOS+melatonin uygulanan grupta MT1 reseptör ekspresyonun sham grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği görüldü. Bu bulgu oositte ve folikül epitel hücrelerinde tutulum gösteren MT1 'in immunohistokimyasal verileriyle uyumluydu. Bu verilerden yola çıkılarak PKOS'ta bozulmuş hücresel oksidatif stresin dengelenmesi için hücrelerin melatonin reseptör ekspresyonunda ve sonraki mekanizmasında gen ve protein düzeyinde artışa gittiği sonucuna varıldı.

Folikülogenezis gonadotropinler ile otokrin ve parakrin faktörlerin etkileşimi gibi çok sayıda faktör tarafından etkilenmektedir ve bu süreçte TGF- β süper aile üyeleri foliküler büyüme ve gelişmede omurgayı oluşturmaktadırlar. Bu faktörler arasında GDF9, BMP15, AMH, AMHR2 sayılabilir [180]. PKOS patofizyolojisinde BMP 15 ve GDF 9'un çok sayıda gen mutasyonuna da saptanmıştır [181, 182]. Ancak bu mekanizma halen tam olarak aydınlatılmış değildir. GDF9 ve BMP15 ilk olarak 1993 yılında McPherron e arkadaşları tarafından keşfedilmiştir [183]. Bu iki büyüme faktörünün sentezi primordiyal folikülde başlamakta ve folikülogenezis süresince giderek artarak Graaf folikülde en yüksek seviyeye

ulaşmaktadır. Bu iki büyüme faktörü yapısal olarak homolog proteinlerdir. GDF 9 hasarlı farelerle yapılan çalışmada hasarlı grupta, kontrol grubuna kıyasla ovaryumların daha küçük boyutlarda olduğu ve primordiyal ve primer folikül sayısının daha fazla olduğu belirlenmiştir [184]. BMP 15 hasarlı farelerle yapılan çalışmada ise araştırmacılar hasarın ratlarda subfertiliteye neden olduğunu ve ovaryumda histopatolojik defektlere neden olduğunu bulmuşlardır [185]. Benzeri literatür bilgisinden yola çıkılarak, bu çalışmada PKOS patofizyolojisinde melatoninin GDF 9 ve BMP 15 büyüme faktörlerinin sentezine, etkisinin araştırılması amaçlandı.

Li ve arkadaşları (2014) insanlarda kumulus granüloza hücrelerinde artmış GDF9 ve BMP15 ekspresyonlarının oosit olgunlaşması, fertilizasyon ve embriyo kalitesiyle ilişkisini araştırmayı hedeflemişlerdir. Araştırmacılar bu amaçla intrastoplazmik sperm injeksiyonu olan 196 hastadan 2426 kumulus-oosit kompleksi toplamışlardır. Oocyte secreted factors (OSF) ve genel fizyolojik parametrelerin analizi için Pearson korelasyonunu kullanmışlardır. Araştırma sonunda, GDF9 ve BMP15 seviyelerinin yaş, beden-kitle indeksi, oosit olgunlaşması ve yarıklanma oranıyla önemli seviyede ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Bu iki protein grubunun ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu gruptaki embriyo kalitesinin, düşük olanlarınkinden hayli yüksek olduğunu ve gebe olan grupta da GDF9 ve BMP15 seviyelerinin gebe olmayan gruba kıyasla daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonunda GDF9 ve BMP15 seviyelerinin oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarıyla ilişkili olduğunu ve böylece bu iki proteinin oositin gelişimsel potansiyeli ile ilgili belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varmıştır [186].

Cui ve arkadaşları (2017) çalışmalarında, foliküler displazinin ovaryum granüloza hücrelerinin apoptozunun düzenlenmesiyle ilişkili olup olmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. Bu amaçla kontrol grubunu deney grubuyla, vücut kitle indeksi, Luteinleştirici hormon ve testosteron düzeylerinde karşılaştırmışlardır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında PKOS grubunda S fazını daha uzun iken, G2/M fazının uzunluğu daha kısadır ve PKOS grubunda hücreler apoptoza uğramaktadır. Araştırmacılar PKOS grubunda granüloza hücrelerinde BMP15 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla azaldığını belirlemişlerdir [187]. Benzer şekilde söz konusu çalışmada

Melatoninin PKOS patogenezinde BMP15 ekspresyon paternine etkisini protein ve gen düzeyinde belirlemesinin hedeflendiği bu çalışmada immunohistokimya, real time PCR ve western blot metodları uygulandı. BMP15'in immunohistokimyasal bulguları neticesinde, sham grubunda preantral foliküllerin genelinde oosit ve granüloza hücreleri düzeyinde orta dereceli tutulum izlenirken, antral foliküllerde oosit, granüloza katmanında ve teka katmanı düzeyinde immünreaksiyonun zayıftan ortaya değiştiği dikkati çekti. Bu bulgu Real Time PCR ve western blot sonuçlarıyla uyumluydu. Melatonin uygulanan grupta ise sham grubundan ayrıcalı olarak preantral foliküllerde tutulumun kuvvetli olduğu ilgiyi çekti bu bulgu Real Time PCR ve western blot sonuçlarıyla uyumluydu. PKOS oluşturulan grupta BMP15 immünreaktivitesinin prenatral ve antral foliküllerde, oosit ve granüloza hücre katmanı düzeyinde kuvvetli, teka katmanında ise orta dereceli olması ilgiyi çekti. PKOS oluşturularak melatonin uygulaması yapılan grupta tutulumun preantral foliküllerde oosit ve granüloza katmanı düzeyinde kuvvetli olduğu belirlenirken, antral foliküllerde, granüloza hücrelerinde ortadan kuvvetliye değiştiği dikkati çekti. Bu verilerden yola çıkılarak, BMP 15 ekspresyonunun deneysel PKOS modeli ile arttığı, ancak melatoninin bu faktör üzerinden PKOS patogenezinde etkin olamadığı sonucuna varıldı.

Karagül ve arkadaşları (2017) çalışmasında, PKOS'lu GDF9 ve BMP15'in folikülogenezis süresince sentez miktarındaki değişiklikleri ölçmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, DHEA ile PKOS indüklenmiş 45 dişi prepubertel rat ile çalışmışlardır. Modelin indüksiyon kontrolü için aldıkları vajinal smear sonucuna göre kontrol grubunda siklusları normal uzunluklarında gözlemlerken, deney grubunda bu sürelerin bozulduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar in-vivo çalışmaları sonucunda, PKOS grubunda primer folikülde tersiyer folikül geçişte GDF9 ve BMP15'in ekspresyon seviyelerinde azalma tespit etmişlerdir. Bu iki büyüme faktörü anti-apoptotik aktiviteye sahiptir ve GDF9'un granüloza hücrelerinde apoptozu ve antral folikülde foliküler atreziyi baskıladığını, BMP15'in ise kumulus hücre apoptozunda azalmaya neden olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuç olarak, araştırmacılar GDF9 ve BMP15'in, ekspresyonunun primer folikül evresinde başladığını ve bu evrede, her iki faktöründe sentezindeki azalmanın oositin olgunlaşmasında bozulmaya ve söz konusu durumunda subfertilite veya infertiliteye neden olacağını ifade etmişlerdir [169].

Wei ve arkadaşları (2014) çalışmalarında PKOS'lu kadınlardan aldıkları ovaryum dokularında foliküler gelişimde ve olgunlaşmada temel büyüme faktörleri olan GDF9 ve BMP15'in ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçlamışlardır. Araştırmacılar bu amaçla

28 PKOS'lu birey ile 26 sağlıklı bireyle çalışmışlardır. Bu iki büyüme faktörünün oosit ve granüloza hücrelerindeki ekspresyonunu ölçmek için immunohistokimya protokolü uygulamışlardır. Deney sonucunda araştırmacılar, kontrol grubunda GDF9 ve BMP15'in ilk olarak primordiyal follikülde ekspresse edildiğini ve folikül büyüdükçe bu büyüme faktörlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığını ve Graaf folikülde en yoğun tutulumun olduğunu ifade etmişlerdir [188]. Ancak PKOS grubunda GDF9 ve BMP15 tutulum oranları kontrol grubuna nazaran primordiyal, primer ve sekonder folikülde istatistiksel manada azalmış olarak belirlendi. Ancak iki grup arasında Graaf folikülde bu iki büyüme faktörünün tutulum oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıkta çıkmadığı ifade edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar GDF9 ve BMP15'in oosit ve granüloza hücrelerinde tutulumunun, foliküler gelişim evrelerine göre çeşitlilik gösterdiğini ve bu proteinlerin ekspresyonlarının PKOS grubunda özellikle erken foliküler fazda azaldığını ifade etmişlerdir [188].

Wei ve arkadaşları (2011) çalışmalarında, polikistik over sendromunda, oositin salınan parakrin sinyal molekülleri olan GDF9 ve BMP15'in ekspresyon seviyelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu olmuş polikistik overli dişi bireyler ve normal ovaryan siklusa sahip kontrol grubunu oluşturacak dişi bireyler üzerinde bu araştırmayı gerçekleştirmişlerdir. PKOS hasta bireylerde Rotterdam kriterlerine göre teşhis edilmişlerdir. Oositler intrastoplazmik sperm enjeksiyonundan toplanarak 24 saat süreyle kültür ortamında büyütülmüştür. Oositin çevresindeki hücreler soyulmak suretiyle mekanik olarak çıkarılmış ve oosit çıplak olarak bırakıldıktan sonra birinci polar cisim baz alınarak germinal vezikül, metafaz-I ve metafaz-II evlerine göre tanımlanmıştır. Araştırmacılar 12 polikistik overli hastadan elde edilen 25 oositle, 56 bireyden oluşan kontrol grubundan elde edilen 82 oositle çalışmışlardır. Araştırmacılar spesifik primerlerle nested PCR yöntemini GDF9 ve BMP15 genleri için uygulamışlardır. Deneyler sonucunda her iki geninde GV, MT-I ve MT-2 evrelerinde ekspresse olduklarını ancak kontrol grubuna nazaran ekspresyon seviyelerinde ciddi bir azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Buradan yola çıkarak araştırmacılar, oositin ekspresse edilen bu parakrin sinyal faktörlerinin, oosit gelişimi ve olgunlaşması için önemli olduklarını PKOS'lu hastalarda ise oosit gelişimi ve olgunlaşması esnasında hasarın söz konusu olduğunu ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar bağlamında PKOS'lu hastalarda azalan oositin salınan parakrin sinyal moleküllerinin polikistik over patogenezinin sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir [189].

Zhao ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada GDF9 ve BMP15'in polikistik ovaryumlu dişilerin oosit ve kumulus hücrelerindeki ekspresyon paternlerini araştırmışlardır. Bu amaçla 15 PKOS'lu bireyden 22 oosit ve 16 PKOS'lu hastanın kumulus granüloza hücreleri ile 58 kontrol grubu bireyinden 67 oositle çalışmışlardır. Kontrol grubu bireylerine intrastoplazmik sperm injeksiyonu yapılmıştır. GDF9 ve BMP15 protein ekspresyon paternlerinin araştırılması için konfokal mikroskopi ile immunohistkimya metodları kullanılmıştır. Kontrol grubu ile deney grubu arasında oositteki GDF9 ve BMP15 protein ekspresyon miktarları arasında farklılık yok iken, kumulus granüloza hücrelerinde GDF9 ekspresyonu PKOS'lu bireylerde intrastoplazmik sperm injeksiyonu yapılmış bireylere nazaran azalmış olarak belirlenmiştir ve sonuç olarak GDF9 ekspresyon paternindeki bu azalma PKOS'la ilişkilendirilmiştir [153].

Mevcut literatür bilgisinden yola çıkılarak, melatoninin PKOS patogenezinde GDF 9 ekspresyon paternine etkisinin protein ve gen düzeyinde belirlemesinin hedeflendiği bu çalışmada, GDF9'un immunohistokimyasal bulguları neticesinde, sham grubunda primordiyal ve unilaminar primer folikül aşamasındaki preantral foliküllerde, GDF 9 tutulumunun oosit düzeyinde kuvvetli olduğu izlenirken, folikül epitel hücrelerinde tutulumun olmaması ilgiyi çekti. Ancak multilaminar primer folikülden itibaren gelişen tüm foliküllerde granüloza ve teka hücre katmanlarında zayıftan ortaya değişen GDF 9 immünreaktivite saptandı. Bu veriler Real-Time PCR ve western blot sonuçlarıyla da uyumluydu. Bu bulgular, oositte eksprese olduğu bilinen GDF 9 'un granüloza hücre proliferasyonunu indüklemek için bu hücrelere göç etmesinin bir göstergesi olarak kabul edildi. Melatonin uygulanan grupta ise GDF 9 tutulumunun sham grubuna benzer şekilde preantral foliküllerde oositte kuvvetli olarak izlendi. Ayrıcalıklı olarak bu grupta multilaminar primer foliküllerde granüloza katmanını oluşturan hücrelerde de benzer şekilde kuvvetli immünreaktivite saptandı. Antral foliküllerde oositteki kuvvetli tutulumu ek olarak granüloza katmanında orta deceli yaygın tutulum ilgiyi çekti. Teka katmanında zayıf immünreaksiyon saptandı. Bu bulgudan yola çıkılarak melatoninin GDF 9 üzerinden folikül epitel hücre proliferasyonunu arttırmış olabileceği sonucuna varıldı. Bu bulgular Real – Time PCR ve western blot sonuçlarıyla da uyumluydu. PKOS oluşturulan grupta preantral ve antral foliküllerde orta dereceli tutulum ilgiyi çekti. Antral folikül sayısında gözlenen artmış GDF 9 ekspresyonunun folikülün gelişmesini indüklediği, bu nedenle çok sayıda folikülün dominant folikülden bağımsız olarak gelişim gösterdiği sonucuna varıldı. Bu veriler Real-time PCR ve western blot sonucuyla da uyumluydu. PKOS + melatonin

uygulanan grupta GDF 9 immünreaktivitesi değerlendirildiğinde ise diğer tüm gruplardan ayrıcalı olarak tüm gelişim evresindeki foliküllerde oosit düzeyinde çok kuvvetli tutulum olması ilgiyi çekti. İmm nreaktivitenin granüloza katmanını oluşturan hücrelerde zayıftan ortaya değiştiği izlendi. Teka katmanında GDF 9 immünreaksiyonu zayıftan ortaya değişen düzeydeydi . Bu veriler Real-Time PCR ve western blot sonuçlarıyla da uyumluydu. Sonuç olarak GDF 9 dağılımı açısından melatoninin GDF 9 ekspresyonunu arttırdığı ancak granüloza katmanına geçişte bir engel mekanizması oluşturmuş olabileceği, bu yolla çok sayıda antral folikül gelişimini engelleyerek, koruyucu özellik göstermiş olabileceği kanısına varıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ratlarda deneysel PKOS modelinde melatonin uygulamasının folikülogenez regülasyonu üzerine etkisi incelendi.

Histolojik analizler sonucunda PKOS'un ovaryumda çeşitli gelişim evresindeki foliküllerde dejeneratif değişikliklere neden olduğu ve antral folikül sayısını arttırdığı belirlendi.

Uygulanan melatoninin dokuda aktif kullanılıp kullanılmadığını belirlemek adına yapılan RT-PCR yönteminde, melatonin uygulanan gruplarda MT1 reseptör gen ekspresyonunun arttığı ve melatonin reseptör immün boyamalarında da protein düzeyinde artış olduğu belirlendi. Bu bulgular, sistemik uygulanan melatoninin literatüre göre belirlenen dozunun ovaryum dokusunda kullanıldığının göstergesi olarak kabul edildi.

Bu çalışmada folikülogeneziste iki önemli etkin molekül olan GDF 9 ve BMP 15 deneysel PKOS modelinde uygulanan melatonin ile dağılımının gen ve protein düzeyinde belirlenmesi amaçlandı. Yapılan deneyler sonucunda her iki genin de PKOS ve PKOS+melatonin gruplarında ekspresyonlarının arttığı izlenirken, protein ekspresyonlarının da benzer şekilde artış gösterdiği, western blot yöntemi ile saptandı. Ancak proteinlerin dokuda lokalizasyonunu belirlemek amaçlı yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda, moleküler analiz sonuçlarına benzer olarak PKOS oluşturulan grupta ve PKOS+melatonin grubunda her iki antikora ait immünreaksiyonun arttığı belirlendi. PKOS oluşturulan grupta protektif melatoninin, BMP 15 dağılımı açısından değişikliğe neden olmadığı belirlenirken, GDF 9 immünlokalizasyonunun oositte arttığı ancak granüloza hücrelerine aktarılmadığı saptandı. Bu analiz sonuçlarına göre, PKOS oluşturulan grupta GDF 9 ve BMP 15 ekspresyonlarının, indüklenen folikülogenezise paralel arttığı, melatoninin ise BMP 15 üzerinden regülatör etki gösteremeyip, GDF 9 üzerinden folikülogenezisi düzenlemede yardımcı olabileceği, bu etkisini GDF 9 ekspresyonunu baskılamaktan ziyade, granüloza katmanına aktarmayı engelleyerek granüloza hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı ve bu sayede folikülogenezisi yavaşlattığı kanısına varıldı.

Yapılacak çalışmalarda GDF 9 yolağında bu transportu engelleyen moleküllerin açığa çıkartılması, PKOS'un önlenmesinde etkin olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Dudek, R.W. (2009). *Embryology BRS*. (Sixth edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 169-174.
2. Sadler, T.W. (2011). *Langman's medical embryology*. (Twelfth edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 232-259.
3. Moore, K.L. Persaud, T.V.N. and Torchia, M.G. (2011). *The Developing Human E-Book*. (Tenth edition). United States:Saunders Elsevier.
4. Block, E. (1952). Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. *Cells Tissues Organs*, 14, 108-123.
5. Gardner, D.K. and Simón, C. (2017). *Handbook of in vitro fertilization*.(Fourth edition).Florida : CRC press.
6. Markstrom, E. Svensson, E. Shao, R. Svanberg, B. and Billig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis--dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123, 23-30.
7. Katz, V.L. (2007). *Comprehensive gynecology*. (Sixth edition). Philadelphia: Elsevier Mosby, 39-68.
8. Alaittin-Elhan, K.A. (2001). *Anatomi* (Birinci baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 859. 22-23
9. Aydın, S. (2000). *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi*.(Birinci baskı). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.
10. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2006). *Histology*. (Sixth edition). Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 831-840.
11. Blaustein, A. (1994). Human Ovary. *Pathology of the Female Genital Tract*. (Fourth edition). Newyork: Springer-Verlag, 185-201.
12. Gray, H. (1999). *Anatomy, descriptive and surgical*. (Thirteenth edition) Philadelphia:Running Press.
13. Aliye, E. (1982). *Özel Histoloji*. (Dördüncü baskı) .Ankara:Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Basım Evi.
14. Eşrefoğlu, M. (2009). *Özel Histoloji*. (İkinci baskı). Malatya: Medipres Matbaacılık.
15. Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. (2006). *Color Textbook of Histology E-Book*. (Sixth edition).Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 416-421.
16. Boke, E. and Mitchison, T.J. (2017). The balbiani body and the concept of physiological amyloids. *Cell Cycle*, 16, 153-154.

17. Hertig, A.T. (1968). The primary human oocyte: some observations on the fine structure of Balbiani's vitelline body and the origin of the annulate lamellae. *Developmental Dynamics*, 122, 107-137.
18. Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology*, 76, 185-202.
19. Louros, N.N. Chrysina, E.D. Baltatzis, G.E. Patsouris, E.S. Hamodrakas, S.J. and Iconomidou, V.A. (2016). A common 'aggregation-prone' interface possibly participates in the self-assembly of human zona pellucida proteins. *FEBS Letters*, 590, 619-630.
20. Clark, G.F. (2011). The molecular basis of mouse sperm-zona pellucida binding: a still unresolved issue in developmental biology. *Reproduction*, 142, 377-381.
21. Gupta, S.K. and Bhandari, B. (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian Journal of Andrology* 13, 97-105.
22. Wallach, E.E. and Goldzieher, J.W. (1981). Polycystic ovarian disease. *Fertility and Sterility*, 35, 371-394.
23. Rodgers, R.J. Irving-Rodgers, H.F. and Russell, D.L. (2003). Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction*, 126, 415-424.
24. Oktay, K. Briggs, D. and Gosden, R.G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 3748-3751.
25. Young, J.M. and McNeilly, A.S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, 140, 489-504.
26. Masserdotti, C. De Lorenzi, D. and Gasparotto, L. (2008). Cytologic detection of Call-Exner bodies in Sertoli cell tumors from 2 dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 37, 112-114.
27. Amsterdam, A. and Rotmensch, S. (1987). Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrine Reviews*, 8, 309-337.
28. Basuino, L. and Silveira, C.F. (2016). Human follicular fluid and effects on reproduction. *Jabra Assisted Reproduction*, 20, 38-40.
29. Gartner, L.P. (2015). *Textbook of Histology E-Book*. (Fourth edition). Philadelphia :Elsevier Health Sciences,
30. Trau, H.A. Brannstrom, M. Curry, T.E. and Duffy, D.M. (2016). Prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor A mediate angiogenesis of human ovarian follicular endothelial cells. *Human Reproduction*, 31, 436-444.
31. Christenson, L.K. and Stouffer, R.L. (1997). Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial

- growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 2135-2142.
32. Jeremy, J.Y. Okonofua, F.E. Thomas, M. Wojdyla, J. Smith, W. Craft, I.L. and Dandona, P. (1987). Oocyte maturity and human follicular fluid prostanoids, gonadotropins, and prolactin after administration of clomiphene and pergonal. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 65, 402-406.
 33. Carson, R. Salamonsen, L. and Findlay, J. (1986). Permeability of rat ovarian follicles to LH during development and luteinization. *Journal of Reproduction And Fertility*, 76, 663-675.
 34. Okuda, Y. Okamura, H. Kanzaki, H. and Takenaka, A. (1983). Capillary permeability of rabbit ovarian follicles prior to ovulation. *Journal of Anatomy*, 137 (2), 263-269.
 35. Fraser, H.M. and Duncan, W.C. (2005). Vascular morphogenesis in the primate ovary. *Angiogenesis*, 8, 101-116.
 36. Duffy, D.M. and Stouffer, R.L. (2002). Follicular administration of a cyclooxygenase inhibitor can prevent oocyte release without alteration of normal luteal function in rhesus monkeys. *Human Reproduction*, 17, 2825-2831.
 37. Wulff, C. Wilson, H. Wiegand, S.J. Rudge, J.S. and Fraser, H.M. (2002). Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology*, 143, 2797-2807.
 38. Pauerstein, C.J. Eddy, C.A. Croxatto, H.D. Hess, R. Siler-Khodr, T.M. and Croxatto, H.B. (1978). Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in women and infrahuman primates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 130, 876-886.
 39. Hoff, J.D. Quigley, M.E. and Yen, S.S. (1983). Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 57, 792-796.
 40. Beverly, G. and Reed, B.R.C. (2015). The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation . *Female Reproduction*. South Dartmouth (MA):Endotext.
 41. Espey, L.L. (1974). Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biology of Reproduction*, 10, 216-235.
 42. Falcone, T. and Hurd, W.W. (2017). *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide* (Third edition). Berlin:Springer, 113-123.
 43. Espey, L. Tanaka, N. Adams, R. and Okamura, H. (1991). Ovarian hydroxyecosatetraenoic acids compared with prostanoids and steroids during ovulation in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 260, 163-169.
 44. Lumsden, M. Kelly, R. Templeton, A. Van Look, P. Swanston, I. and Baird, D. (1986). Changes in the concentration of prostaglandins in preovulatory human follicles after administration of hCG. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77, 119-124.

45. Sherman, B.M. West, J.H. and Korenman, S.G. (1976). The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 42, 629-636.
46. O'Grady, J.P. Caldwell, B.V. Auletta, F.J. and Speroff, L. (1972). The effects of an inhibitor of prostaglandin synthesis (indomethacin) on ovulation, pregnancy, and pseudopregnancy in the rabbit. *Prostaglandins*, 1, 97-106.
47. Koos, R.D. (1989). *Potential relevance of angiogenic factors to ovarian physiology*.
48. Sheehan, K. Casper, R. and Yen, S. (1982). Luteal phase defects induced by an agonist of luteinizing hormone-releasing factor: a model for fertility control. *Science*, 215, 170-172.
49. Gore, B.Z. Caldwell, B.V. and Speroff, L. (1973). Estrogen-induced human luteolysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 36, 615-617.
50. Young, K. Hennebold, J. and Stouffer, R. (2002). Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, 8, 833-840.
51. Speroff, L. and Fritz, M.A. (2005). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. (Seventh edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,
52. Gervásio, C.G. Bernuci, M.P. Silva-de-Sá, M.F. and Rosa-e-Silva, A.C.J.d.S. (2014). The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. 2014: 81-92
53. McNatty, K. Fidler, A. Juengel, J. Quirke, L. Smith, P. Heath, D. Lundy, T. O'Connell, A. and Tisdall, D. (2000). Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163, 11-20.
54. Erickson, G.F. and Shimasaki, S. (2001). The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and Sterility*, 76, 943-949.
55. Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17, 121-155.
56. Erickson, G.F. (2000). The graafian follicle: a functional definition. *Ovulation*. Berlin: Springer, Endotext , 31-48.
57. Zeleznik, A.J. Hutchison, J.S. and Schuler, H.M. (1985). Interference with the gonadotropin-suppressing actions of estradiol in macaques overrides the selection of a single preovulatory follicle. *Endocrinology*, 117, 991-999.
58. Hsueh, A.J. Adashi, E. Jones, P.B. and Welsh Jr, T.H. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Reviews*, 5, 76-127.

59. Richards, J.S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, 15, 725-751.
60. Richards, J.S. Russell, D.L. Robker, R.L. Dajee, M. and Alliston, T.N. (1998). Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, 47-54.
61. Minegishi, T. Tano, M. Abe, Y. Nakamura, K. Ibuki, Y. and Miyamoto, K. (1997). Expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 3, 101-107.
62. Erickson, G.F. Magoffin, D.A. Dyer, C.A. and Hofeditz, C. (1985). The Ovarian Androgen Producing Cells: A Review of Structure/Function Relationships 1, 2. *Endocrine Reviews*, 6, 371-399.
63. Erickson, G.F. and Shimasaki, S. (2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11, 193-198.
64. McGrath, S.A. Esquela, A.F. and Lee, S.J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*, 9, 131-136.
65. Dube, J.L. Wang, P. Elvin, J. Lyons, K.M. Celeste, A.J. and Matzuk, M.M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology*, 12, 1809-1817.
66. Lyons, K.M. Pelton, R. and Hogan, B. (1989). Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes & Development*, 3, 1657-1668.
67. Ingman, W.V. and Robertson, S.A. (2002). Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*, 24, 904-914.
68. Valve, E. Penttilä, T.-L. Paranko, J. and Härkönen, P. (1997). FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232, 173-177.
69. Dong, J. Albertini, D.F. Nishimori, K. Kumar, T.R. Lu, N. and Matzuk, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383, 531-535.
70. Galloway, S.M. McNatty, K.P. Cambridge, L.M. Laitinen, M.P. Juengel, J.L. Jokiranta, T.S. McLaren, R.J. Luiro, K. Dodds, K.G. and Montgomery, G.W. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25, 279.
71. Su, Y.Q. Sugiura, K. Wigglesworth, K. O'Brien, M.J. Affourtit, J.P. Pangas, S.A. Matzuk, M.M. and Eppig, J.J. (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135, 111-121.

72. Carabatsos, M.J. Elvin, J. Matzuk, M.M. and Albertini, D.F. (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology*, 204, 373-384.
73. Elvin, J.A. Yan, C. Wang, P. Nishimori, K. and Matzuk, M.M. (1999). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology*, 13, 1018-1034.
74. Hayashi, M. McGee, E. Min, G. Klein, C. Rose, U.M. Duin, M. and Hsueh, A.J. (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, 140, 1236-1244.
75. Otsuka, F. McTavish, K.J. and Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*, 78, 9-21.
76. Sugiura, K. Pendola, F.L. and Eppig, J.J. (2005). Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental Biology*, 279, 20-30.
77. Orisaka, M. Orisaka, S. Jiang, J.Y. Craig, J. Wang, Y. Kotsuji, F. and Tsang, B.K. (2006). Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Molecular Endocrinology*, 20, 2456-2468.
78. Elvin, J.A. Yan, C. and Matzuk, M.M. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 10288-10293.
79. Otsuka, F. Yao, Z. Lee, T.H. Yamamoto, S. Erickson, G.F. and Shimasaki, S. (2000). Bone morphogenetic protein-15 identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 39523-39528.
80. Otsuka, F. Moore, R.K. Iemura, S.I. Ueno, N. and Shimasaki, S. (2001). Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 961-966.
81. Shimasaki, S. Moore, R. Erickson, G. and Otsuka, F. (2003). The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction Supplement*, 61, 323-337.
82. Yoshino, O. McMahon, H.E. Sharma, S. and Shimasaki, S. (2006). A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 10678-10683.
83. Drummond, A.E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 16.
84. Vendola, K. Zhou, J. Wang, J. Famuyiwa, O.A. Bievre, M. and Bondy, C.A. (1999). Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biology of Reproduction*, 61, 353-357.

85. Murray, A. Gosden, R. Allison, V. and Spears, N. (1998). Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113, 27-33.
86. Rice, S. Mason, H.D. and Whitehead, S.A. (2006). Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 101, 216-225.
87. Miller, W.L. and Auchus, R.J. (2010). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32, 81-151.
88. Hillier, S.G. Whitelaw, P.F. and Smyth, C.D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100, 51-54.
89. Kousteni, S. Bellido, T. Plotkin, L. O'brien, C. Bodenner, D. Han, L. Han, K. DiGregorio, G. Katzenellenbogen, J. and Katzenellenbogen, B. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 104, 719-730.
90. Weil, S. Vendola, K. Zhou, J. and Bondy, C.A. (1999). Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 2951-2956.
91. Wu, Y.-G. Bennett, J. Talla, D. and Stocco, C. (2011). Testosterone, not 5 α -dihydrotestosterone, stimulates LRH-1 leading to FSH-independent expression of Cyp19 and P450scc in granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 25, 656-668.
92. Abbott, D. Barnett, D. Bruns, C. and Dumesic, D. (2005). Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Human Reproduction Update*, 11, 357-374.
93. Xue, K. Liu, J.-y. Murphy, B.D. and Tsang, B.K. (2012). Orphan nuclear receptor NR4A1 is a negative regulator of DHT-induced rat preantral follicular growth. *Molecular Endocrinology*, 26, 2004-2015.
94. Cardenas, H. and Pope, W. (2002). Increased ovulation rate in gilts treated with dihydrotestosterone. *Reproduction*, 123, 527-533.
95. Okutsu, Y. Itoh, M.T. Takahashi, N. and Ishizuka, B. (2010). Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary. *Fertility and Sterility*, 93, 927-935.
96. Lerner, A.B. Case, J.D. Takahashi, Y. Lee, T.H. and Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2587-2587.
97. Lerner, A.B. Case, J.D. and Takahashi, Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *Journal of Biological Chemistry*, 235, 1992-1997.

98. Vessely, L. and Lewy, A. (2002). Melatonin as a hormone and as a marker for circadian phase position in humans. *Hormones, Brain and Behavior*, 5, 121-141.
99. Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Aasada, H., Yamagata, Y. and Sugino, N. (2014). Melatonin and female reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40, 1-11.
100. Cruz, M., Leal, C. Cruz, J. Tan, D. and Reiter, R. (2014). Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology*, 82, 925-932.
101. Cruz, M.H. Leal, C.L. Cruz, J.F. Tan, D.X. and Reiter, R.J. (2014). Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology*, 82, 925-932.
102. Reiter, R.J. Tamura, H. Tan, D.X. and Xu, X.Y. (2014). Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertility and Sterility*, 102, 321-328.
103. Dubocovich, M.L. and Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27, 101-110.
104. Acuña-Castroviejo, D. Reiter, R.J. Menendez-Pelaez, A. Pablos, M.I. and Burgos, A. (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *Journal of Pineal Research*, 16, 100-112.
105. Talpur, H.S. Chandio, I.B. Brohi, R.D. Worku, T. Rehman, Z. Bhattarai, D. Ullah, F. JiaJia, L. and Yang, L. (2018). Research progress on the role of melatonin and its receptors in animal reproduction: A comprehensive review. *Reproduction in Domestic Animals*, 4, 831-849
106. Carnevali, O. Gioacchini, G. Maradonna, F. Olivotto, I. and Migliarini, B. (2011). Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *Plos One*, 6, 199-78.
107. Tamura, H. Nakamura, Y. Takiguchi, S. Kashida, S. Yamagata, Y. Sugino, N. and Kato, H. (1998). Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *Journal of Pineal Research*, 25, 135-141.
108. Acuña-Castroviejo, D. Martin, M. Macías, M. Escames, G. León, J. Khaldy, H. and Reiter, R.J. (2001). Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *Journal of Pineal Research*, 30, 65-74.
109. Brännström, M.U. and Norman, R. (1993). Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Human Reproduction*, 8, 1762-1775.
110. Tamura, H. Takasaki, A. Miwa, I. Taniguchi, K. Maekawa, R. Asada, H. Taketani, T. Matsuoka, A. Yamagata, Y. and Shimamura, K. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44, 280-287.

111. Richards, J.S. (2005). Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234, 75-79.
112. Woo, M.M. Tai, C.J. Kang, S.K. Nathwani, P.S. Pang, S.F. and Leung, P.C. (2001). Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 4789-4797.
113. Yie, S.-M. Brown, G. Liu, G.Y. Collins, J. Daya, S. Hughes, E. Foster, W. and Younglai, E. (1995). Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. *Human Reproduction*, 10, 50-55.
114. Sakaguchi, K. Itoh, M.T. Takahashi, N. Tarumi, W. and Ishizuka, B. (2013). The rat oocyte synthesises melatonin. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 674-682.
115. Danforth, D.R. (1995). Endocrine and paracrine control of oocyte development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 172, 747-752.
116. Matikainen, T. Perez, G.I. Zheng, T.S. Kluzak, T.R. Rueda, B.R. Flavell, R.A. and Tilly, J.L. (2001). Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology*, 142, 2468-2480.
117. Kierszenbaum, L.A. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. (Birinci baskı) Ankara: Palme Yayınları, 566-584
118. Nakamura, Y. Tamura, H. Takayama, H. and Kato, H. (2003). Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and Sterility*, 80, 1012-1016.
119. Ginsburg, J. H.C. (1976). Polycystic ovary syndrome. *British Medical Journal*, 2, 737-740.
120. Stein, I.F. and Leventhal, M.L. (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 29, 181-191.
121. Smith, K.D. Steinberger, E. and Perloff, W.H. (1965). Polycystic ovarian disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 93, 994-1001.
122. Green, J.A. and Goldzieher, J.W. (1965). The Polycystic Ovary. Iv. Light And Electron Microscope Studies. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 91, 173-181.
123. Franks, S. (1995). Polycystic Ovary Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 333, 853-861.
124. Kawadzki, J. Dunaif, A. Givens, J. Haseltine, F. and Merriam, G. (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: a rational approach. *Polycystic Ovary Syndrome. Blackwell Scientific*, 377-384.

125. Adams, J. Polson, D.W. and Franks, S. (1986). Prevalence Of Polycystic Ovaries In Women With Anovulation And Idiopathic Hirsutism. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, 293, 355-359.
126. Franks, S. (1989). Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clinical Endocrinology*, 31, 87-120.
127. Franks, S. (1991). The ubiquitous polycystic ovary. *Journal of Endocrinology*, 129, 317-319.
128. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. (2004). *Fertility and Sterility*, 81, 19-25.
129. Nestler, J.E. Jakubowicz, D.J. Evans, W.S. and Pasquali, R. (1998). Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 338, 1876-1880.
130. Prelevic, G.M. Wurzbarger, M.I. and Balint-Peric, L. (1993). 24-hour serum cortisol profiles in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 7, 179-184.
131. Azziz, R. Carmina, E. Dewailly, D. Diamanti-Kandarakis, E. Escobar-Morreale, H.F. Futterweit, W. Janssen, O.E. Legro, R.S. Norman, R.J. Taylor, A.E. and Witchel, S.F. (2009). The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertility and Sterility*, 91, 456-488.
132. Livadas, S. Christou, M. Economou, F. Karachalios, A. Xyrafis, X. Boutzios, G. Zerva, A. Tantalaki, E. Palimeri, S. and Diamanti-Kandarakis, E. (2011). "Menstrual irregularities in PCOS. Does it matter when it starts?". *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 119, 334-337.
133. Ferriman, D. and Gallwey, J.D. (1961). Clinical Assessment of Body Hair Growth in Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21, 1440-1447.
134. Bednarska, S. and Siejka, A. (2017). *The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new?* Advances in clinical and experimental medicine: official organ ,Wroclaw Medical University, 26, 359.
135. Nimkarn, S. Gangishetti, P.K. Yau, M. and New, M.I. (2016). 21-Hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *GeneReviews* , 1993-2018.
136. Brzana, J. Yedinak, C.G. Hameed, N. Plesiu, A. McCartney, S. and Fleseriu, M. (2014). Polycystic ovarian syndrome and Cushing's syndrome: a persistent diagnostic quandary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 175, 145-148.
137. Pugeat, M. Raverot, G. Plotton, I. de la Perrière, A.B. Mirakian, P. Déchaud, H. Berger, N. and Peix, J.L., (2006). Androgen-secreting adrenal and ovarian neoplasms. (editörler). *Androgen excess disorders in women*. Springer, 75-84.
138. Azziz, R. Sanchez, L. Knochenhauer, E. Moran, C. Lazenby, J. Stephens, K. Taylor, K. and Boots, L. (2004). Androgen excess in women: experience with over 1000

- consecutive patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 453-462.
139. Omar, H.A. Logsdon, S. and Richards, J. (2004). Clinical profiles, occurrence, and management of adolescent patients with HAIR-AN syndrome. *The Scientific World Journal*, 4, 507-511.
 140. Nestler, J. and Strauss 3rd, J. (1991). Insulin as an effector of human ovarian and adrenal steroid metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 20, 807-823.
 141. Markovski, M. Hall, J. Jin, M. Laubscher, T. and Regier, L. (2012). Approach to the management of idiopathic hirsutism. *Canadian Family Physician*, 58, 173-177.
 142. Homburg, R. (2008). Polycystic ovary syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 22, 261-274.
 143. Kiddy, D.S. Hamilton-Fairley, D. Bush, A. Short, F. Anyaoku, V. Reed, M.J. and Franks, S. (1992). Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, 36, 105-111.
 144. Pasquali, R. Antenucci, D. Casimirri, F. Venturoli, S. Paradisi, R. Fabbri, R. Balestra, V. Melchionda, N. and Barbara, L. (1989). Clinical and hormonal characteristics of obese amenorrheic hyperandrogenic women before and after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 68, 173-179.
 145. Shreeve, N. Cagampang, F. Sadek, K. Tolhurst, M. Houldey, A. Hill, C.M. Brook, N. Macklon, N. and Cheong, Y. (2013). Poor sleep in PCOS; is melatonin the culprit? *Human Reproduction*, 28, 1348-1353.
 146. Diamanti-Kandarakis, E. (2008). Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10.
 147. Adams, J.M. Taylor, A.E. Crowley, J.W.F. and Hall, J.E. (2004). Polycystic Ovarian Morphology with Regular Ovulatory Cycles: Insights into the Pathophysiology of Polycystic Ovarian Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 4343-4350.
 148. Dumesic, D.A. and Abbott, D.H. (2008). Implications of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) on Oocyte Development. *Seminars in Reproductive Medicine*, 26, 53-61.
 149. Franks, S. Stark, J. and Hardy, K. (2008). Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*, 14, 367-378.
 150. Van Der Spuy, Z.M. and Dyer, S.J. (2004). The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18, 755-771.
 151. Kurzawa, R. Ciepiela, P. Baczkowski, T. Safranow, K. and Brelik, P. (2008). Comparison of embryological and clinical outcome in GnRH antagonist vs. GnRH

- agonist protocols for in vitro fertilization in PCOS non-obese patients. A prospective randomized study. *Journal Of Assisted Reproduction and Genetics*, 25, 365-374.
152. Webber, L. Stubbs, S. Stark, J. Trew, G. Margara, R. Hardy, K. and Franks, S. (2003). Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *The Lancet*, 362, 1017-1021.
 153. Zhao, S.Y. Qiao, J. Chen, Y.J. Liu, P. Li, J. and Yan, J. (2010). Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 94, 261-267.
 154. Teixeira Filho, F.L. Baracat, E.C. Lee, T.H. Suh, C.S. Matsui, M. Chang, R.J. Shimasaki, S. and Erickson, G.F. (2002). Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 1337-1344.
 155. Das, M. Gillott, D. Saridogan, E. and Djahanbakhch, O. (2008). Anti-Mullerian hormone is increased in follicular fluid from unstimulated ovaries in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 23, 2122-2126.
 156. Guo, Y. Qi, Y. Yang, X. Zhao, L. Wen, S. Liu, Y. and Tang, L. (2016). Association between polycystic ovary syndrome and gut microbiota. *Plos One*, 11, e0153196.
 157. Yildirim, G. Attar, R. Ozkan, F. Kumbak, B. Ficicioglu, C. and Yesildaglar, N. (2010). The effects of letrozole and melatonin on surgically induced endometriosis in a rat model: a preliminary study. *Fertility and Sterility*, 93, 1787-1792.
 158. Noorafshan, A. Ahmadi, M. Mesbah, S.F. and Karbalay-Doust, S. (2013). Stereological study of the effects of letrozole and estradiol valerate treatment on the ovary of rats. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 40, 115-121.
 159. Akalan, M.A. and Demirkan, A.Ç. (2013). Stereoloji ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24, 95-100.
 160. Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 75, 469-486.
 161. Pfaffl, M.W. Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 36-36.
 162. Kang, X. Jia, L. and Shen, X. (2015). Manifestation of hyperandrogenism in the continuous light exposure-induced PCOS rat model. *BioMed Research International*, 943694.
 163. Singh, K.B. (2005). Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertility and Sterility*, 84(2), 1228-1234.
 164. Jin, P. and Xie, Y. (2017). Treatment strategies for women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 1-6.

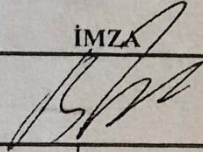
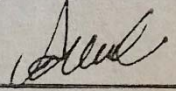
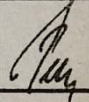
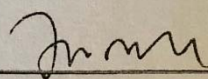
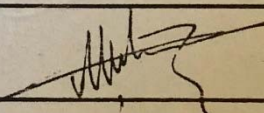
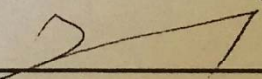
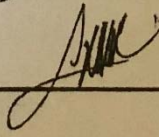
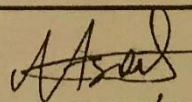
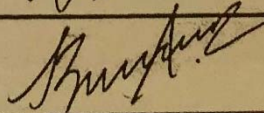
165. Kafali, H. Iriadam, M. Ozardali, I. ve Demir, N. (2004). Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Archives of Medical Research*, 35, 103-108.
166. Kar, S. (2013). Current evidence supporting “letrozole” for ovulation induction. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6, 93-98.
167. Jahan, S. Munir, F. Razak, S. Mehboob, A. Ain, Q.U. Ullah, H. Afsar, T. Shaheen, G. and Almajwal, A. (2016). Ameliorative effects of rutin against metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *Journal of Ovarian Research*, 9, 86.
168. Ahmadi, M. Rostamzadeh, A. Fathi, F. Mohammadi, M. and Rezaie, M.J. (2017). The effect of Melatonin on histological changes of ovary in induced polycystic ovary syndrome model in mice. *Middle East Fertility Society Journal*, 22, 255-259.
169. Karagul, M.I. Aktas, S. Coskun Yilmaz, B. Yilmaz, M. ve Orekici Temel, G. (2018). GDF9 and BMP15 Expressions and Fine Structure Changes During Folliculogenesis in Polycystic Ovary Syndrome. *Balkan Medical Journal*, 35, 43-54.
170. Bañuls, C. Rovira-Llopis, S. Martinez de Marañon, A. Veses, S. Jover, A. Gomez, M. Rocha, M. Hernandez-Mijares, A. and Victor, V.M. (2017). Metabolic syndrome enhances endoplasmic reticulum, oxidative stress and leukocyte–endothelium interactions in PCOS. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 71, 153-162.
171. Li, C. Shi, Y. You, L. Wang, L. and Chen, Z.-J. (2011). Melatonin receptor 1A gene polymorphism associated with polycystic ovary syndrome. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 72, 130-134.
172. Tian, X., Wang, F., Zhang, L., He, C., Ji, P., Wang, J., Zhang, Z. L.V. D., Abulizi, W., Wang, X., Lian, Z. and Liu, G. (2017). Beneficial Effects of Melatonin on the In Vitro Maturation of Sheep Oocytes and Its Relation to Melatonin Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 834.
173. Clemens, J., Jarzynka, M. and Witt-Enderby, P. (2001). Down-regulation of mtl melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sciences*, 69, 27-35.
174. Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.J., Firestine, S. and Melan, M.A. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Science*, 72, 2183-2198.
175. Terzieva, D.D., Orbetzova, M.M., Mitkov, M.D. and Mateva, N.G. (2013). Serum melatonin in women with polycystic ovary syndrome. *Folia Medica (Plovdiv)*, 55, 10-15.
176. Nikmard, F., Hosseini, E., Bakhtiyari, M., Ashrafi, M., Amidi, F. and Aflatoonian, R. (2017). Effects of melatonin on oocyte maturation in PCOS mouse model. *Animal Science Journal*, 88, 586-592.

177. Kim, M.K., Park, E.A., Kim, H.J., Choi, W.Y., Cho, J.H., Lee, W.S., Cha, K.Y., Kim, Y.S., Lee, D.R. and Yoon, T.K. Does supplementation of in-vitro culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS? *Reproductive BioMedicine Online*, 26, 22-29.
178. Tagliaferri, V., Romualdi, D., Scarinci, E., Cicco, S., Florio, C.D., Immediata, V., Tropea, A., Santarsiero, C.M., Lanzone, A. and Apa, R. (2018). Melatonin Treatment May Be Able to Restore Menstrual Cyclicity in Women With PCOS: A Pilot Study. *Reproductive Science*, 25, 269-275.
179. Pai, S.A. and Majumdar, A.S. (2014). Protective effects of melatonin against metabolic and reproductive disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66, 1710-1721.
180. Sproul, K., Jones, M.R., Mathur, R., Azziz, R. and Goodarzi, M.O. (2010). Association study of four key folliculogenesis genes in polycystic ovary syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 117, 756-760.
181. Mehdizadeh, A., Sheikhha, M.H., Kalantar, S.M., Aali, B.S. and Ghanei, A. (2016). Mutation analysis of exon1 of bone morphogenetic protein-15 gene in Iranian patients with polycystic ovarian syndrome. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14, 527.
182. Wang, B., Zhou, S., Wang, J., Liu, J., Ni, F., Yan, J., Mu, Y., Cao, Y. and Ma, X. (2010). Identification of novel missense mutations of GDF9 in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Reproductive BioMedicine Online*, 21, 344-348.
183. McPherron, A.C. and Lee, S.J. (1993). GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *Journal Biological Chemistry*, 268, 3444-3449.
184. Laitinen, M., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen, J., Lehtonen, E., Heikinheimo, M. and Ritvos, O. (1998). A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of Development*, 78, 135-140.
185. Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J. and Matzuk, M.M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15, 854-866.
186. Li, Y., Li, R.Q., Ou, S.B., Zhang, N.F., Ren, L., Wei, L.N., Zhang, Q.X. ve Yang, D.Z. (2014). Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 81.
187. Cui, X., Jing, X., Wu, X., Bi, X., Liu, J., Long, Z., Zhang, X., Zhang, D., Jia, H., Su, D. and Huo, K. (2017). Abnormal expression levels of BMP15/Smad1 are associated with granulosa cell apoptosis in patients with polycystic ovary syndrome. *Molecular Medicine Reports*, 16, 8231-8236.

188. Wei, L.N., Huang, R., Li, L.L., Fang, C., Li, Y. and Liang, X.Y. (2014). Reduced and delayed expression of GDF9 and BMP15 in ovarian tissues from women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31, 1483-1490.
189. Wei, L.N., Liang, X.Y., Fang, C. ve Zhang, M.F. (2011). Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 96, 464-468.

EKLER

EK-1. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Toplantı Katılım Listesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ :05.05.2017	TOPLANTI SAYISI : 04
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Uzm.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	KATILAMADI
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	KATILAMADI
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	KATILAMADI
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	KATILAMADI

EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası



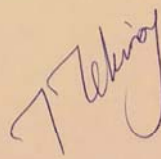
**XIX. DENEY HAYVANLARI
UYGULAMA VE ETİK KURSU**
23-31 Mayıs 2016
KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Gökçe Nur YÜCEL

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 23-31 Mayıs 2016 tarihleri arasında düzenlenen “Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kurs XIX” a katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.


Prof. Dr. Süleyman BÜYÜKBERBER
REKTÖR


Prof. Dr. Leyla AÇIK
ETİK KURUL BAŞKANI


Doç. Dr. Turgay TEKİNAY
MERKEZ MÜDÜRÜ

Sertifika no: 2016/19-04

EK-3. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Evrak Tarih ve Sayısı: 08/12/2016-E.148676



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Gülnur KAPLANOĞLU (TAKE)
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Cemile Merve SEYMEN, Gökçe Nur YÜCEL, Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU, Atiye Seda YAR SAĞLAM ve Zübeyir ELMASOĞLU'ndan oluşan, G.Ü.ET-16.076 kod numaralı ve "*Melatonin Polikistik Over Sendromuna Bağlı İnfertilitede Yeni Bir Umut Olabilir mi? Deneysel Bir Çalışma*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-16.076 and entitled "*Is It Possible That Melatonin Can Be A New Hope On Infertility Associated With Polycystic Ovary Sendrome? Experimental Study*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YÜCEL, Gökçe Nur
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 18.07.1989
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05336833650
 e-mail : gnuryucel@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Devam ediyor
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2012
Lise	Kocasinan Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Yücel, G.N. (2018). Karanlığın Mucizesi: Melatonin, ve Ovaryum Etkileşimi. *Dicle Medicine Journal*, 45(1), 85-92.

Hobiler

Spor yapmak.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

